

**Entwicklung einer Methode der zufälligen Domänenkombination zur
Optimierung von Peptidoglykan-Hydrolasen für die Anwendung im
Lebensmittel am Beispiel von *Listeria* spp. mit anschließender
Charakterisierung ausgewählter Proteine**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Anna Sophie Scherzinger

aus
Freyung-Grafenau

April 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 21. April 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2011

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

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Christoph Oberprieler
1. Prüfer:	Prof. Dr. Reinhard Sterner
2. Prüfer:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
3. Prüfer:	Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2007 bis Dezember 2008 bei der Profos AG in Regensburg und von Mai 2009 bis April 2011 am Max von Pettenkofer-Institut in Zusammenarbeit mit der Hyglos GmbH in Bernried in Kooperation mit dem Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner angefertigt.

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens.
Andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Regensburg, den 21.04.2011

Anna Scherzinger

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Die Gattung <i>Listeria</i>.....	3
1.1.1 Taxonomische Einordnung, Charakteristika und Vorkommen.....	3
1.1.2 Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> und Folgen der Listeriose	4
1.1.3 Therapie und Prävention von Listeriose	5
1.2 Peptidoglykan-Hydrolasen gegen <i>Listeria</i>.....	6
1.2.1 Die Zellwand von <i>Listeria</i>	6
1.2.2 Zellwandlytische Enzyme.....	9
1.2.2.1 Spezifitäten zellwandlytischer Enzyme	9
1.2.2.2 Funktion und Struktur zellwandlytischer Enzyme aus Phagen und Bakterien	11
1.3 Chimäre Zellwand-Hydrolasen.....	15
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
2 MATERIAL	19
2.1 Organismen.....	19
2.1.1 <i>E. coli</i> Labor-Stämme	19
2.1.2 Bakterien-Stämme.....	19
2.1.3 Phagen.....	20
2.2 Plasmide.....	20
2.3 Oligodesoxyribonukleotide.....	21
2.4 Längenstandards.....	23
2.4.1 DNA-Längenstandard	23
2.4.2 Protein-Längenstandard	23
2.5 Enzyme.....	23
2.6 Chemikalien.....	24
2.7 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.8 Geräte.....	25

2.9	Nährmedien, Medienzusätze und Antibiotika.....	25
2.9.1	Nährmedien	25
2.9.2	Medienzusätze und Antibiotika	26
2.10	Lösungen und Puffer.....	26
2.11	Software.....	29
3	METHODEN	31
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	31
3.1.1	Vorbereitung von Materialien und Lösungen	31
3.1.2	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	31
3.1.3	Präparation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	31
3.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen.....	32
3.1.5	Anzucht und Lagerung von <i>Listeria</i>	32
3.1.6	Gewinnung von hitzeinaktivierten <i>Listeria</i> Zellen.....	32
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	33
3.2.2	DNA-Freisetzung aus Bakteriophagen über Denaturierung der Kapsid-Proteine	33
3.2.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	33
3.2.3.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten	33
3.2.3.2	Mutagenese über <i>Sequential Overlap Extension-PCR</i> (SOE-PCR)	34
3.2.4	Restriktionsverdau von DNA.....	34
3.2.5	Reinigung von DNA-Fragmenten	35
3.2.6	Ligation von DNA-Enden	35
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.2.8	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	35
3.2.9	Konzentrationsbestimmung von DNA	36
3.2.10	DNA-Sequenzierung.....	36
3.2.11	Herstellung des modifizierten Vektors pET14b-linsyn.....	36
3.2.12	Klonierung des <i>Screening</i> -Vektors pQE60-lib	37
3.2.13	Bindung von biotinylierter DNA an magnetische Streptavidin-Partikel.....	38
3.2.14	Generierung der zufällig ligierten Domänen-Genbank	39
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	41
3.3.1	Expression von Proteinen im analytischen Maßstab	41
3.3.2	Expression von Proteinen im präparativen Maßstab	41
3.3.3	Proteinreinigung	42
3.3.3.1	Zellaufschluss im präparativen Maßstab	42
3.3.3.2	<i>Inclusion Body</i> Reinigung	42
3.3.3.3	Solubilisierung und Rückfaltung.....	43
3.3.3.4	Affinitätschromatographie	44
3.3.3.5	Kationenaustauscher-Chromatographie	45
3.3.4	Dialyse von Proteinlösungen	46
3.3.5	Einkonzentrieren von Proteinlösungen.....	46
3.3.6	Lagerung von gereinigtem Protein	47
3.4	Analytische Methoden.....	47
3.4.1	UV-Spektroskopie zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	47
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
3.4.3	Assays zur Proteinstabilität.....	49
3.4.3.1	Limitierte Proteolyse	49
3.4.3.2	Fluoreszenz-Spektroskopie.....	49
3.4.3.3	Chemische Denaturierung mit Guanidin-Hydrochlorid	50
3.4.3.4	Bestimmung der Restaktivität nach thermischer Inkubation	52

3.5	Bestimmung der Proteinaktivität.....	52
3.5.1	Lyseplatten.....	52
3.5.2	Folienlyseplatten zur verzögerten Induktion	52
3.5.3	Flüssiglysetest mit Zellaufschluss im ELISA.....	53
3.5.4	Photometrischer Flüssiglysetest.....	54
3.5.5	Minimale bakterizide Konzentration (MBC) bei pH 6.....	55
3.5.6	Bakterizide Wirkung in Milch.....	56
3.5.7	Minimale inhibitorische Konzentration (MIC)	56
3.5.8	Inhibition von Listerienwachstum mit induziertem <i>E. coli</i> Zellaufschluss-Überstand	57
3.5.9	Zellbindetestung mittels ELISA	57
3.5.9.1	Zell-ELISA	57
3.5.9.2	Sandwich-ELISA.....	58
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Konzeption und Validierung der Klonierungsstrategie.....	62
4.1.1	Auswahl der Domänen	63
4.1.1.1	Domänenanzahl.....	63
4.1.1.2	Auswahl der Zellbindedomänen	64
4.1.1.3	Auswahl der enzymatisch aktiven Domänen	66
4.1.1.4	Auswahl geeigneter Proteinabschnitte der Domänen	69
4.1.2	Klonierung und Funktionstestung der Domänen.....	71
4.1.2.1	Klonierung der Domänen	71
4.1.2.2	Löslichkeit der Domänen.....	73
4.1.2.3	Funktionstestung der enzymatisch aktiven Domänen	74
4.1.2.4	Funktionstestung der Zellbindedomänen.....	74
4.1.3	Vorbereitung der Genbank.....	77
4.1.3.1	Erstellung positionsspezifischer DNA-Fragmente	77
4.1.3.2	Bindung biotinylierter DNA-Fragmente an Streptavidin-Partikel	79
4.1.4	Prinzipitestung anhand 8 ausgewählter Domänen	80
4.1.4.1	Zufällige Ligation von 4 N-terminalen und C-terminalen Domänen.....	80
4.1.4.2	Transformation und <i>Screening</i>	81
4.1.4.3	Validierung	82
4.1.4.4	Expression und Funktionstestung	83
4.2	Generierung und <i>Screening</i> einer Genbank aus 19 zufällig kombinierten Domänen.....	86
4.2.1	2-Domänen Kombinationen	87
4.2.1.1	Ligation.....	87
4.2.1.2	Transformation und Initial- <i>Screening</i>	87
4.2.1.3	Spezifitäts- <i>Screening</i>	88
4.2.1.4	Auswertung	88
4.2.1.5	Validierung	91
4.2.2	3-Domänen Kombinationen	92
4.2.2.1	Ligation.....	92
4.2.2.2	Transformation und Initial- <i>Screening</i>	93
4.2.2.3	Spezifitäts- <i>Screening</i>	93
4.2.2.4	Auswertung	94
4.2.3	<i>Screening</i> auf gewünschte Eigenschaften.....	98
4.2.3.1	Aktivität im Flüssiglysetest	100
4.2.3.2	Aktivität bei saurem pH	101
4.2.3.3	Aktivität in Gegenwart von EDTA	103
4.2.3.4	Fähigkeit zur Inhibition von Listerienwachstum.....	105
4.2.3.5	Auswahl der geeigneten Kandidaten	107

4.3	Proteinreinigung und Charakterisierung.....	109
4.3.1	Proteinreinigung.....	109
4.3.1.1	Löslichkeit der Proteine.....	109
4.3.1.2	Rückfaltung von EcoGQ6	110
4.3.1.3	Säulen-Chromatographie von PlyP40, PlyP825, M1, K1, EcoGU3, EcoGP8 und rückgefaltetem EcoGQ6	111
4.3.2	Aktivität der gereinigten Proteine	114
4.3.2.1	Spezifische Aktivität.....	114
4.3.2.2	pH-Optimum.....	114
4.3.2.3	Salz-Optimum.....	115
4.3.2.4	Aktivität in Gegenwart von EDTA	117
4.3.2.5	Minimale inhibitorische Konzentration bei pH 6	118
4.3.2.6	Minimale bakterizide Konzentration bei pH 6.....	120
4.3.2.7	Bakterizide Wirkung in Milch	122
4.3.3	Proteinstabilität.....	124
4.3.3.1	Proteolytische Stabilität.....	124
4.3.3.2	Thermische Stabilität	126
4.3.3.3	Chemische Stabilität gegen Guanidin-Hydrochlorid.....	128
5	DISKUSSION	131
5.1	Generierung und <i>Screening</i> einer Genbank aus 19 zufällig kombinierten Domänen.....	131
5.1.1	Konzeption der Klonierungsstrategie	131
5.1.2	Auswertung von Initial- und Spezifitäts- <i>Screening</i>	136
5.1.3	<i>Screening</i> auf gewünschte Eigenschaften	142
5.2	Charakterisierung der 5 ausgewählten Kandidaten.....	149
5.2.1	Aktivität der gereinigten Proteine in Flüssigsettests	149
5.2.2	Testung mit lebenden Zellen.....	153
5.3	Ausblick.....	160
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	163
7	ANHANG	175
	DANKSAGUNG	181

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Transmissions-Elektronenmikroskopie von <i>Listeria monocytogenes</i>	3
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der grampositiven Zellwand	7
Abbildung 1.3: Modell der Anordnung von Peptidoglykan in der Zellhülle von <i>B. subtilis</i>	8
Abbildung 1.4: Spezifitäten von Peptidoglykan-Hydrolasen bei Peptidoglykantyp A1γ	10
Abbildung 1.5: Reaktion der lytischen Transglykosylasen (LT) führt zur Bildung von N-Acetylglucosamin und 1,6-Anhydromuraminsäure (1,6-anhydroMurNAc)	11
Abbildung 1.6: Lyse von Listerien-Zellen durch das Phagen-Endolysin Ply511	12
Abbildung 1.7: Strukturen des Listerien-Endolysins PlyPSA (A) und der EAD von Ply500 (EAD500, B).	13
Abbildung 1.8: A: Morphologie der Caudovirales: 1: Siphoviridae, 2: Myoviridae, 3: Podoviridae. B: Penetration der Zellwand während der Infektion	14
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der veränderten Multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pQE30nH	21
Abbildung 3.1: Schema des modifizierten pET14b-Vektors pET14b-linsyn	37
Abbildung 3.2: Multiple Klonierungsstelle im <i>Screening</i> -Vektor pQE60-lib	38
Abbildung 4.1: Übersicht der geplanten Vorgehensweise von Klonierung und <i>Vorscreening</i> (beige), <i>Screening</i> auf gewünschte Eigenschaften (blau) und zusammenfassender Analyse (grün)	61
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Amplifikation der Domänenabschnitte mit positionsspezifischen Primern	62
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der sukzessiven Ligation von DNA-Fragmenten	63
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Verwandtschaft beschriebener Endolysine aus <i>Listeria</i> - Phagen mit Bindung der korrespondierenden CBDs an Listerien-Serovare 1 bis 6	65
Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Homologien zwischen EADP825 und EAD500 sowie CBDP825 und CBD511	66
Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von Gp29 aus P100, MurA, IspC, Sle1 und Cellosyl	68
Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der klonierten Varianten der Zellbindedomäne von PlyP40.	70
Abbildung 4.8: Beispiele zum Löslichkeitstest der Domänen bei Raumtemperatur (RT), 30 und 37°C in <i>E. coli</i> M15 (T5-System)	73
Abbildung 4.9: Abbau von CDBP40-CHis während der Reinigung über Ni-NTA Agarose-Säule bei Raumtemperatur (A) im Vergleich zu Reinigung über Ni-NTA Sepharose-Partikel bei 4° mit Proteaseinhibitor (B)	75
Abbildung 4.10: Schema des Zell-ELISA (A) und Bindeergebnisse der C-terminal His-markierten Domänen CDBP35 (B), CBD500 (C) und CBD511 (D) mit <i>L. monocytogenes</i> ProCC S1095 sv 1/2a, S1135 sv 3a, S776 sv 4b und <i>L. innocua</i> ProCC S1147 sv 6a	76
Abbildung 4.11: Schema des Sandwich-ELISA (A) und Bindeergebnisse von C-His markierter CBDB025 (B)	77
Abbildung 4.12: Ermittlung der idealen <i>Annealing</i> -Temperatur für die Amplifikation der Fragmente für Positionen 1, 2 und 3 mit den entsprechenden Primerpaaren	78
Abbildung 4.13: Analyse der Bindung von biotinylierter und nicht biotinylierter DNA an Streptavidin- Partikel über Agarose-Gelelektrophorese	80
Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der Folienlyseplatten	81
Abbildung 4.15: Ein Teil der induzierten <i>E. coli</i> -Zellen bilden nach Plasmidtransformation und Koloniewachstum Lysehöfe	82

Abbildung 4.16: Identifikation der Domänenkombinationen über <i>Pst</i> I-Verdau der Kolonie-PCR.....	83
Abbildung 4.17: Expressionstest der 16 Varianten bei 37°C	83
Abbildung 4.18: Lysehofbildung der 16 Varianten nach Inkubation über Nacht.	85
Abbildung 4.19: Häufigkeit und Position der Domänen in den Klonen ohne Redundanz.....	95
Abbildung 4.20: Allgemeine Häufigkeit der EADs und CBDs an den Positionen N-Terminus, Mitte und C-Terminus mit und ohne PlyP40-Domänen.....	96
Abbildung 4.21: Position von EADP40 und CBDP40L bzw. CBDP40nls in den PlyP40-Varianten mit 3 Domänen (A) sowie von EAD511 und CBD511 in Ply511-Varianten mit 3 Domänen (B).	97
Abbildung 4.22: Schema zum folgenden <i>Screening</i> -Verlauf der 2- und 3-Domänen Proteine.....	99
Abbildung 4.23: Beispiele zu Abnahme der OD von hitzeinaktivierten Zellen von S1095 sv 1/2a in Puffer pH 6 im Vergleich zu Puffer von pH 4,5.	102
Abbildung 4.24: Schema zum <i>Screening</i> -Verlauf der 2- und 3-Domänen Proteine.	107
Abbildung 4.25: Analyse der gewaschenen <i>Inclusion Bodies</i> von EcoGQ6 und der Rückfaltung über SDS-Gelelektrophorese.....	111
Abbildung 4.26: SDS-Gel-Analysen der gereinigten Proteine.....	113
Abbildung 4.27: Relative lytische Aktivitäten in Abhängigkeit des pH-Werts.....	115
Abbildung 4.28: Relative lytische Aktivitäten bei verschiedenen Salzkonzentrationen bei pH 6.	116
Abbildung 4.29: Relative lytische Aktivitäten nach Inkubation mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen.	117
Abbildung 4.30: Zusammenfassung der MIC-Werte nach 24 h in TB pH 6 in pmol/ml.....	119
Abbildung 4.31: Beispiele zu Messergebnissen der MIC von Ply511 (A) und K1 (B)	119
Abbildung 4.32: Darstellung der MBC von Ply511, PlyP40, PlyP825, K1, M1, EcoGQ6, EcoGU3 und EcoGP8 gegen 4 verschiedene <i>Listerien</i> stämme.....	121
Abbildung 4.33: <i>Listerien</i> reduktion in Milch der gereinigten Proteine.....	123
Abbildung 4.34: Analyse des Trypsinverdaus der gereinigten Proteine über SDS-Gelelektrophorese.	124
Abbildung 4.35: Erhalt der Aktivität nach Inkubation bei 55°C.....	126
Abbildung 4.36: Denaturierung der gereinigten Proteine über GdnHCl.....	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> Labor-Stämme.	19
Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Stämme.....	19
Tabelle 2.3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten <i>Listeria</i> -Phagen.	20
Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide.	20
Tabelle 2.5: Erstellte Plasmide dieser Arbeit.....	21
Tabelle 2.6: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung der Domänen.	21
Tabelle 2.7: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung der Wildtyp-Endolysine PlyP40 und PlyP825.....	22
Tabelle 2.8: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung benötigter Vektoren.....	22
Tabelle 2.9: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide zur Amplifikation von <i>Insert</i> -DNA aus Vektoren.....	23
Tabelle 3.1: Protokoll der Reinigung mittels Kationenaustauscher-Chromatographie.	46
Tabelle 3.2: Pippetierschema von 12 und 15 %igen SDS-Gelen.....	48
Tabelle 3.3: GdnHCl-Konzentrationen in den Stammlösungen und den Messansätzen.....	50

Tabelle 4.1: Kombinationsmöglichkeiten in 2- und 3-Domänenproteinen in Abhängigkeit der eingesetzten Domänenanzahl.	64
Tabelle 4.2: Ausgewählte EADs für die Domänenkombination.....	69
Tabelle 4.3: Gewählte Sequenzabschnitte der Domänen.....	71
Tabelle 4.4: Einschätzung der Löslichkeit der Domänen.....	73
Tabelle 4.5: Primerpaare, eingeführte Restriktionsschnittstellen und optimale <i>Annealing</i> -Temperatur für die Fragment-Amplifikation verschiedener Domänenpositionen.	78
Tabelle 4.6: Lösliche Expression der Domänenkombinationen im Vergleich zur löslichen Expression der einzelnen Domänen bei 30°C im T5-System.....	84
Tabelle 4.7: Zusammenfassung der ermittelten Lysespektren der 16 Varianten A-P im Vergleich zu den Bindesepezifitäten der CBDs	86
Tabelle 4.8: Ergebnis des Initial- und Spezifitäts- <i>Screenings</i> der 49 gepickten Varianten des 1147-Ansatzes	89
Tabelle 4.9: Vorkommende Domänenkombinationen in den Validierungs-Klonen	92
Tabelle 4.10: Zusammensetzung des Sequenzierungsergebnisses der 230 sequenzierbaren Klone.	94
Tabelle 4.11: Anzahl der Kombinationen zweier Domänen innerhalb der 3-Domänenproteine.	98
Tabelle 4.12: Kandidaten mit vergleichbarer OD-Abnahme bei saurem pH wie bei pH 6 im Flüssiglysetest (Verhältnis 0,4-1)	103
Tabelle 4.13: Beste Klone im <i>Screening</i> auf Toleranz gegen EDTA.....	104
Tabelle 4.14: Inhibition des Listerien-Wachstums der ausgewählten Klone nach 24, 48 und 72 h. ...	106
Tabelle 4.15: <i>Screening</i> -Daten der ausgewählten Domänenkombinationen	108
Tabelle 4.16: Einschätzung der Löslichkeiten der selektierten Proteine im Vergleich zu den Löslichkeiten der Einzel-Domänen (im T5-System).	109
Tabelle 4.17: Molekulargewicht, Extinktionskoeffizient und isoelektrischer Punkt der zu reinigenden Proteine.	112
Tabelle 4.18: Bedingungen während der Proteinexpression und -reinigungen	112
Tabelle 4.19: Spezifische Aktivitäten der untersuchten Proteine	114
Tabelle 4.20: Halbwertszeiten der Endolysine bei 55°C	127
Tabelle 7.1: Übersicht der verwendeten Primer und Matrizen zur Domänenklonierung mit und ohne synthetischen Linker.....	175
Tabelle 7.2: Ergebnisse aus Initial- und Spezifitäts- <i>Screening</i> , Sequenzierung, <i>Screening</i> auf gewünschte Eigenschaften und Inhibition von Listerien-Wachstum der 2- und 3-Domänen Proteine.	176

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden gemäß der Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Schreibweise abgekürzt.

$0,1\% A_{280}$	spezifischer Extinktionskoeffizient [cm^2/mg]
Ax	Absorption bei x nm
ABTS	2,2Azino-bis(3-ethyl)benzthiazoline 6-sulfonic acid
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxosulfid
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	<i>Brain heart Infusion</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
ca.	circa
CBD	<i>cell binding domain</i> , Zellbindedomäne
cfu	<i>colony forming unit</i>
C-His	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein (Hexahistidin-tag) am Carboxyterminalen Ende einer Polypeptidkette
C-terminal	Carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
cm	Zentimeter
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin Triphosphat
Da	Dalton [g/mol]
dCTP	Desoxycytidin Triphosphat
cGTP	Desoxyguanosin Triphosphat
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N= A, C, G oder T)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	Dithioerythritol
dTTP	Desoxythymidin Triphosphat
EAD	<i>enzymatic active domain</i> , Enzymatisch aktive Domäne
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) (<i>et alii</i>)
f	Verdünnungsfaktor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FN	Anteil an gefaltetem Protein
F	Anteil an ungefaltetem Protein?
g	Gramm, Zentrifugalbeschleunigung
GdnHCl	Guanidiniumchlorid
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GlnNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde
His-tag	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein (Hexahistidin-tag)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JS-tag	<i>In vivo</i> Biotinylierungsdomäne aus der α -Untereinheit von <i>Klebsiella pneumoniae</i> Oxalacetatdecarboxylase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton ($1 \cdot 10^3$ g/mol)
l	Liter
LB	Luria-Bertani (-Medium)
<i>L. ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
log	dekadischer Logarithmus
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LTA	Lipoteichonsäure
<i>L. seeligeri</i>	<i>Listeria seeligeri</i>
M	Molar [mol/l]
MBC	<i>minimum bactericidal concentration</i> , minimale bakterizide Konzentration; entspricht der Konzentration, bei der mindestens 3 Zehnerpotenzen an Zellen abgetötet werden
meso-DAP	meso-Diaminopimelinsäure
mg	Milligramm
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i> , minimale inhibitorische Konzentration; entspricht der Konzentration, bei der kein Wachstum mehr beobachtet wurde
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimol
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MW	Molekulare Masse
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NHis	Anhang von 6 Histidinen an ein Protein (Hexahistidin-tag) am aminoterminalen Ende einer Polypeptidkette
Ni-NTA	Nickel-NitriloTriacetic Acid
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminales Ende einer Polypeptidkette
OD	optische Dichte
OD _x	optische Dichte bei x nm
OE	<i>overlap extension</i>
p. a.	<i>pro analysi</i> (zur Analyse)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline with tween</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Ketten Reaktion
PDB	Protein Data Bank
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
Ply	<i>(Bacterio)Phage lysin</i>
POD	Peroxidase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
pfam	<i>protein families</i>
pmol	Picomol
pNPP	p-Nitrophenyl Phosphat
ppm	parts per million
ProCC	Profos <i>Culture Collection</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SLCC	<i>Special Listeria Culture Collection</i> , Universität Heidelberg
SOE	<i>sequential overlap extension</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
sv	Serovar
TA	Teichonsäure
TB	Trypse Medium
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TM	Schmelztemperatur eines Oligonukleotids
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	<i>Unit</i> , 1U entspricht der Menge an Endolysin, die in 1,0 ml einer Zellsuspension der OD ₆₀₀ 0,8-1,2 pro Minute eine Abnahme der Lichtstreuung um 0,01 bewirkt.
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumen pro Volumen
WSLC	Weihenstephaner Listeria Collection
(w/v)	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ε _x	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge x [M ⁻¹ cm ⁻¹]

Zusammenfassung

Endolysine degradieren das Peptidoglykan, wodurch die Bakterienzelle osmotisch destabilisiert wird und birst. Diese Enzyme sind äußerst spezifisch für bestimmte Bakterienarten und -gattungen, weshalb sie ein großes Potential für die gerichtete Eindämmung von Infektionskrankheiten darstellen und auf der Suche nach Lösungen für eine natürliche und gezielte Bekämpfung von pathogenen Bakterien zunehmend an Interesse gewinnen.

Endolysine sind modular aufgebaut, so dass sich die Funktionen der Zellbindung und der Hydrolyse distinkten Domänen zuweisen lassen. Durch die Bildung von Chimären können neue Moleküle mit veränderten Eigenschaften generiert werden. Somit lassen sich beispielsweise Substratspezifität, Lyseeffizienz, geringe Proteinstabilität oder die Aktivität in Gegenwart von interferierenden Substanzen verändern. Das Prinzip wird genutzt, um diese Proteine je nach gewünschten Eigenschaften für eine Anwendung zu modifizieren. Chimärenbildung erfolgte bisher über den aufwendigen rationalen Ansatz, einzelne Proteine zu entwerfen, zu klonieren und zu testen, wobei eine Vielzahl der Konstrukte nicht den Anforderungen entsprach.

Im Zuge dieser Arbeit sollte daher ein neuer Ansatz verfolgt werden, nämlich der zufälligen Kombination von Domänen aus Zellwand-Hydrolasen mit anschließendem *Screening* auf gewünschte Eigenschaften, so dass gezielt geeignete Moleküle identifiziert werden können. Dies erfolgte am Beispiel von Lysinen gegen *Listeria*. *Listeria monocytogenes* ist ein ernstzunehmender Lebensmittelpathogen, der durch seine Fähigkeit, in vakuumverpackten und gekühlten Lebensmitteln zu wachsen, nur schwer kontrollierbar ist. Der Zusatz eines listerienspezifischen Enzyms würde Kommensale und Nutzbakterien schonen und durch Eliminierung oder Inhibition des Krankheitserregers die Sicherheit von Lebensmitteln erhöhen.

Die angestrebte Strategie sah vor, verschiedene Domänen aus Zellwand-Hydrolasen zufällig miteinander zu Proteinen mit 2 und 3 Domänen zu kombinieren, wobei jede Domäne für jede mögliche Position zugelassen wird.

Hierfür wurde zunächst eine Klonierungsmethode entworfen und erfolgreich umgesetzt. Diese Methode umfasst eine zeitsparende Probenvorbereitung für die Erstellung positionspezifischer DNA-Fragmente mit anschließender zufälliger Ligation an der Festphase.

Es wurden 2- und 3-Domänen Proteine generiert unter der Verwendung von 6 Zellbindedomänen aus Listerien-Endolysinen und 12 enzymatisch aktiven Domänen aus Endolysinen, Autolysinen, einem Bakteriozin und einem lytischen Phagenschwanzprotein mit verschiedenen Spezifitäten und Domänenmotiven.

Mehr als 1057 Varianten mit 2 Domänen und 15497 Varianten mit 3 Domänen wurden analysiert. Im initialen Schritt wurde generell auf Funktionsfähigkeit gegen ein *Listerien-Serovar gescreeent*. Die anschließenden Testungen verfolgten das Ziel der späteren Anwendung im Lebensmittel, weshalb neben breiter Serovarspezifität auch auf Aktivität bei saurem pH, Toleranz von EDTA sowie Wachstumsinhibition von *Listerien* getestet wurde. Fünf selektierte chimäre Proteine wurden gereinigt und zusammen mit den Wildtyp-Endolysinen Ply511, PlyP40 und PlyP825 auf chemische, proteolytische und Temperatur-Stabilität, pH- und Salz-Optima, den Einfluss von EDTA auf die Enzymaktivität sowie minimale inhibitorische Konzentration und minimale bakterizide Konzentration untersucht. Als Beispiel für die Anwendung in einer sehr komplexen Lebensmittelmatrix wurde zudem die bakterizide Wirkung in Milch getestet.

Das beste *gescreeente* Molekül war EcoGU3, eine Chimäre aus 3 Domänen, nämlich zwei enzymatischen aktiven Domänen mit verschiedenen Spezifitäten und einer mittigen Zellbindedomäne. EcoGU3 zeigte deutlich höhere Zellzahlreduktion in der Testung der minimalen bakteriziden Konzentration im Vergleich zu den untersuchten Wildtyp-Proteinen.

In zukünftigen Arbeiten soll dieses Protein für die Anwendung in einer komplexen Lebensmittelmatrix optimiert werden.

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Listeria*

1.1.1 Taxonomische Einordnung, Charakteristika und Vorkommen

Taxonomisch wird die Gattung *Listeria* unter der Ordnung der Bacillales eingeordnet. Es besteht eine nahe Verwandtschaft zu den Gattungen *Bacillus*, *Brochothrix*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* und *Streptococcus*, welche durch niedrigen G+C-Gehalt charakterisiert sind (Jones, 1988; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Rocourt und Buchrieser, 2007). Innerhalb dieses Genus werden 6 Arten unterschieden: *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. grayi*. Sie werden wiederum in 16 Serovare unterteilt (1/2a, b, c, 3a, b, c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b, 7). Diese sind charakterisiert durch verschiedene Kombinationen von Antigenen der Zelloberfläche und sind innerhalb der Gattung unabhängig von den Artgrenzen (Donker-Voet, 1959; Seeliger, 1975). *L. grayi* weicht in seiner antigenen Struktur deutlich von den anderen Arten ab und ist deshalb nicht in diesem System enthalten. Medizinisch bedeutend ist die human-pathogene Art *L. monocytogenes*, die zur so genannten Listeriose führen kann (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Hain *et al.*, 2007).

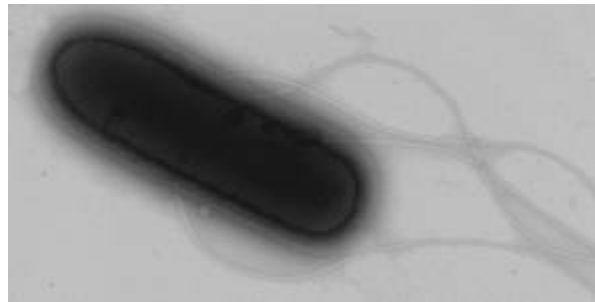


Abbildung 1.1: Transmissions-Elektronenmikroskopie von *Listeria monocytogenes* (aus Biemann, 2009).

Listerien (Abbildung 1.1) sind kurze, grampositive Stäbchen (0,4 x 1-1,5 µm), die keine Kapseln oder Sporen bilden. Sie sind bei Temperaturen zwischen 10 und 25°C beweglich, bei 37°C wird die Expression der peritrichen Geißeln reprimiert (Peel *et al.*, 1988; Shaw, 1988; Vázquez-Boland, 2001).

Diese Bakterien sind äußerst robust. Sie wachsen fakultativ anaerob, zwischen Temperaturen von -1 bis 44°C (optimal zwischen 30-37°C), tolerieren einen breiten pH-Bereich zwischen pH 4,5 und 9,5 können sich noch bei 10 % NaCl, manche Stämme sogar bei 20 % NaCl, vermehren und sind auch in der Lage zur Biofilmbildung (Krämer, 2007). Diese

Eigenschaften ermöglichen es *Listeria* selbst unter extremen Bedingungen zu überleben und führen zu einer weiten Verbreitung in der Natur. *Listeria* wurde beispielsweise aus Boden, Wasser, Pflanzen, verrottendem Pflanzenmaterial, Silage, Schlamm, Abwasser, Stuhl von Menschen und Tieren, Milchprodukten, Fleisch und Meeresfrüchten isoliert (Farber und Peterkin, 1991; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Krämer, 2007; Hain *et al.*, 2007).

1.1.2 Infektion mit *Listeria monocytogenes* und Folgen der Listeriose

Es wird geschätzt, dass 99 % der humanen Listeriose-Fälle durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln hervorgerufen wurden (Mead *et al.*, 1999). Da *Listeria* ein ubiquitär vorkommender Keim ist, kontaminiert er viele Rohmaterialien für die Lebensmittelherstellung. Häufig kommt es zu sekundärer Kontamination von Lebensmitteln während der Produktion durch das betriebliche Umfeld (Krämer, 2007), zum Beispiel vermehrt bei der Herstellung von Fertiggerichten, die keiner abschließenden Hitzebehandlung unterzogen werden. Da sich Listerien in vakuumverpackten, gekühlten Lebensmitteln vermehren können, wird das Risiko einer Infektion zusätzlich erhöht. Analysen konnten Infektionen beispielsweise auf Listerien in Fleisch und Fleischwaren, Fisch (Räucherlachs), Milchprodukten (Rohmilch, Rohkäse, Weichkäse), Geflügel, Pasteten, Salaten, rohem Gemüse und industriellen Fertiggerichten, die vor Verzehr nicht erhitzt wurden, zurückführen (Farber und Peterkin, 1991; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Krämer, 2007).

Der Erreger der Listeriose ist *Listeria monocytogenes*. Es wurden jedoch auch Fälle von Humanerkrankungen durch *L. ivanovii*, einem Tierpathogen beschrieben (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Guillet *et al.*, 2010). Obwohl alle 13 Serovaren von *L. monocytogenes* (1/2a, b, c, 3a, b, c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) Listeriose beim Menschen hervorrufen können, sind über 90 % der Listeriose-Fälle auf Stämme der Serovaren 1/2a, 1/2b und 4b zurückzuführen. Listerien mit Serovar 4b verursachen dabei weltweit über 50 % der Infektionen, als Lebensmittelkontaminanten werden aber meist antigene Gruppen von 1/2 (1/2a, 1/2b und 1/2c) isoliert (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Es wird auch diskutiert, ob die unterschiedliche Fähigkeit der Stämme zur Bildung von Biofilmen im direkten Zusammenhang steht mit der Verursachung von Krankheiten oder dem Persistieren in der Lebensmittelverarbeitung (Borucki *et al.*, 2003; Folsom *et al.*, 2006). Die minimale Infektionsdosis wird auf 10^2 bis 10^4 Listerien pro Gramm Lebensmittel geschätzt, wobei die Anfälligkeit des Individuums und die Virulenz des Stammes eine wesentliche Rolle spielen (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Zu den Risikogruppen gehören Neugeborene, ältere Menschen, Schwangere und Menschen mit geschwächtem Immunsystem (Farber und Peterkin, 1991).

Listeria ist ein fakultativ intrazellulärer Pathogen mit der Fähigkeit zur intrazellulären Teilung und Fortbewegung von Zelle zu Zelle über einen aktinbasierten Mechanismus. Durch letztere Eigenschaft ist *Listeria* in der Lage, anatomische Barrieren wie die Darmwand, die Blut-Hirn-

Schranke oder die Plazenta zu überwinden, was diesen opportunistischen Pathogen besonders gefährlich macht (Farber und Peterkin, 1991; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Cossart und Toledo-Arana, 2008). Die intrazelluläre Lokalisierung schützt *Listeria monocytogenes* weitgehend vor der körpereigenen Immunabwehr und der Wirkung von Antibiotika (Krämer, 2007).

Bei immungeschwächten Personen kann *L. monocytogenes* zu nicht invasiven, gastro-intestinalen Infektionen mit Fieber, Erbrechen und Durchfall führen. Bei Risikogruppen kann eine invasive Infektion mit schwerwiegenden Symptomen wie Meningitis oder Enzephalitis, Bakteriämie, Sepsis oder weniger häufig Endokarditis, Myocarditis oder Pneumonia folgen. Bei Schwangeren kann es zu Fehl- oder Totgeburten oder Infektion des Neugeborenen kommen (Farber und Peterkin, 1991; Schuchat *et al.*, 1991; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Schuppler und Loessner, 2010). Die Todesrate variiert innerhalb der Risikogruppen von bis zu 50 % für Neugeborene bis zu 20 % für ältere Personen (Bortolussi, 2008).

1.1.3 Therapie und Prävention von Listeriose

Listeriose ist eine seltene, aber gefährliche Infektionskrankheit, für die seit dem Jahr 2001 Meldepflicht besteht. Seit 2001 ist zu beobachten, dass die Anzahl der Erkrankungen ansteigt, was möglicherweise auf einen vermehrten Verzehr von Fertigprodukten und einer längeren Aufbewahrung von Lebensmitteln (Kälteanreicherung der Listerien während der verlängerten Haltbarkeitszeit) zurückgeführt werden kann (Robert Koch-Institut, 2010).

Eine Bestätigung von Listeriose erfolgt durch Erregernachweis (Krämer, 2007). Die Therapie muss möglichst rasch erfolgen, da die irreversible Zerstörung der Gehirnzellen in der akuten Phase schnell fortschreitet. Häufig wird Ampicillin, bei Penicillinunverträglichkeit beispielsweise auch Tetracyclin oder Chloramphenicol verwendet (Krämer, 2007), teilweise wird auch eine Kombinationstherapie von Ampicillin oder Amoxicillin mit einem Aminoglykosid eingesetzt (Schuchat *et al.*, 1991; Hof *et al.*, 1997). Antibiotikaresistente Isolate von *Listeria* sind bisher noch selten, aber deren Zahl steigt an (Gandhi, 2007).

Zur Verhinderung einer Erkrankung wird Risikogruppen geraten, Produkte mit möglichem Listerieneintrag zu meiden oder gründlich zu erhitzen (Schuchat *et al.*, 1991). Vorlagen für die Lebensmittelindustrie sollen Listeriose zudem eindämmen: Verzehrfertige Lebensmittel, die für Säuglinge oder medizinische Zwecke bestimmt sind, müssen völlig frei von Listerien sein. Verzehrfertige Lebensmittel, die eine Vermehrung von *Listeria* zulassen, dürfen bei Erreichen des Haltbarkeitsdatums, verzehrfertige Lebensmittel, die eine Vermehrung nicht zulassen, während der gesamten Haltbarkeitsdauer keine höhere Belastung als 100 Zellen von *L. monocytogenes* pro Gramm Produkt beinhalten (Krämer, 2007). Auch der Nachweis von nicht-pathogenen Listerienarten ist kritisch, denn *L. monocytogenes* ist häufig mit

anderen *Listerienspezies* vergesellschaftet und kann bei der ersten Routineuntersuchung leicht übersehen werden (Krämer, 2007).

Da herkömmliche Konservierungsmethoden wie z. B. Kühlung, geringer Wassergehalt und Ansäuerung gegen *Listeria* nur bedingt wirken und die Nachfrage nach frischen, minimal prozessierten, aber lang haltbaren Lebensmitteln steigt, werden Wege zur natürlichen Bekämpfung von *Listeria* im Lebensmittel gesucht. Ein dementsprechender Ansatz ist die Zugabe von antimikrobiellen Peptiden. Ein Beispiel hierfür ist Nisin, ein Bakteriozin aus *Lactococcus lactis subsp. lactis*, welches die bakterielle Cytoplasmamembran permeabilisiert und die Peptidoglykan-Synthese inhibiert. Nisin wirkt gegen ein breites Spektrum gram-positiver Keime und ist nicht spezifisch für Listerien. Es wurde als GRAS (*generally recognized as safe*) deklariert, und von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die Anwendung in bestimmten Lebensmitteln zugelassen (EFSA, 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass die Häufigkeit von Resistenzentwicklung von *Listeria monocytogenes* gegen Nisin je nach Stamm und Umweltbedingungen zwischen 10^{-7} und 10^{-2} liegt (Gandhi und Chikindas, 2007). Ein alternativer Ansatz führt zur spezifischen Bekämpfung von Listerien im Lebensmittel durch den Einsatz von Bakteriophagen. Es sind bereits zwei phagenbasierte Produkte zur Lebensmittel-Dekontamination in den USA und in Europa zugelassen: List-ShieldTM von Intralytix Inc. (Baltimore, MD) und ListexTM P100 von EBI Food Safety (Wageningen, Niederlande) (Mahony *et al.*, 2010; Stark *et al.* 2010).

1.2 Peptidoglykan-Hydrolasen gegen *Listeria*

1.2.1 Die Zellwand von *Listeria*

Die Zellwand eines Bakteriums stellt die Grenze zur externen Umgebung dar. Sie steht somit einerseits chemischen sowie physikalischen Widrigkeiten entgegen, andererseits muss sie Stoffaustausch zwischen Zellinnerem und Umwelt erlauben. Zur Ermöglichung einer effizienten Diffusion benötigen Bakterienzellen ein hohes Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen (Beveridge und Graham, 1991). Dies wird durch mechanische Stabilisierung der Zellform und -größe über die Zellwand gewährleistet. Die Zellwand steht dabei dem Turgor-Druck des Protoplasten entgegen, der bei grampositiven bis zu 25 Atmosphären betragen kann (Vollmer *et al.*, 2008-A).

Im Gegensatz zu den gramnegativen Bakterien haben grampositive wie *Listeria* in der Zellhülle keine äußere Membran (Abbildung 1.2). Die äußerste Schicht wird von Peptidoglykan gebildet, welches die gesamte Zelle umgibt und 30-40 % der Zellwand von Listerien ausmacht (Fiedler, 1988). Der Großteil der Listerienzellwand besteht aus Teichonsäuren, welche am Peptidoglykan gebunden sind. Zusammen mit den membranassoziierten Lipoteichonsäuren bilden sie das so genannte „Kontinuum an negativer Ladung“ (Silhavy, 2010)

der Zellhülle, welches sich über das Peptidoglykan hinaus erstreckt. Oberflächenproteine können kovalent oder nicht kovalent am Peptidoglykan oder über einen Lipidanker in der Cytoplasmamembran gebunden sein (Navarre und Schneewind, 1999). Da kohlenhydrathaltige Strukturen der grampositiven Zellwand Rezeptoren für die Bindung von zellwandlytischen Molekülen darstellen, sollen diese Strukturen im Weiteren eingehender betrachtet werden.

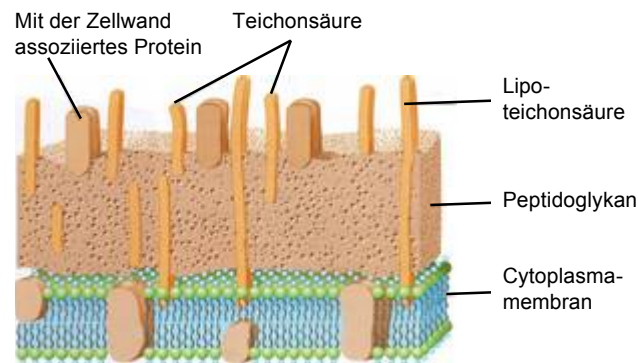


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der grampositiven Zellwand. (Aus Madigan *et al.*, 2003).

Das Peptidoglykan ist für die mechanische Stabilisierung das wichtigste Polymer der Zellwand (Fiedler, 1988). Peptidoglykan ist elastisch und porös und wirkt wie ein molekulares Sieb (Doyle und Marquis, 1994). Es ist ein Heteropolymer aus linearen Glykansträngen, die über kurze Peptide quervernetzt sind. Das Glykanpolymer besteht bei den meisten Bakterien aus Disacchariden, die von den alternierenden, β -1,4 verknüpften Zuckern N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) gebildet werden (Schleifer und Kandler, 1972). Vor allem bei Pathogenen finden sich spezifische Modifikationen wie N-Deacetylierung von GlcNAc und MurNAc sowie O-Acetylierung oder N-Glykolylierung von MurNAc. Bei *Listeria* wurde N-Deacetylierung von GlcNAc festgestellt und möglicherweise liegt zudem O-Acetylierung von MurNAc vor, da zumindest das Gen für die O-Acetyltransferase vorhanden ist (Boneca *et al.*, 2007; Vollmer, 2008).

Die quervernetzenden Peptide sind über eine Amidbindung der N-terminalen Aminosäure und der Carboxylgruppe von MurNAc mit dem Glykanstrang verbunden und bestehen aus abwechselnd L- und D-Aminosäuren. Die Zusammensetzung und die Quervernetzung der Peptide variieren je nach Organismus und bestimmen demnach die Klassifizierung von Peptidoglykan (Schleifer und Kandler, 1972). *Listeria* besitzt Peptidoglykan vom Typ A1 γ (Abbildung 1.4). Dies definiert sich über das Stammpeptid aus L-Alanin- γ -D-Glutamat-meso-Diaminopimelinsäure-D-Alanin-D-Alanin, welches anstelle der D-Lactyl-Gruppe an MurNAc gebunden ist. Die Quervernetzung erfolgt über eine Peptidbindung zwischen der ω -Amino-

gruppe von meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP) und der Carboxylgruppe von D-Alanin, der vierten Aminosäure des benachbarten Stammpeptids, wobei das D-Alanin am C-Terminus des benachbarten Stammpeptids abgespalten wird (Schleifer und Kandler, 1972). Bei *Listeria* liegt zudem eine Amidierung der Carboxylgruppe von D-Glutamat oder meso-DAP vor (Fiedler, 1988).

Hayhurst und Mitarbeiter (2008) haben die Anordnung des Peptidoglykans in der Zellhülle von *Bacillus subtilis* untersucht. *Bacillus* ist verwandt zu *Listeria* und hat ebenso Peptidoglykan vom Typ A1 γ und zusätzlich amidierte Carboxylgruppen am meso-DAP (Schleifer und Kandler, 1972). Somit könnten deren Ergebnisse auch für *Listeria* gültig sein. Das resultierende Schema für *B. subtilis* ist in Abbildung 1.3 gezeigt, wonach sich das Peptidoglykan in einer helikalen Substruktur um die Kurzachse der Zelle windet.

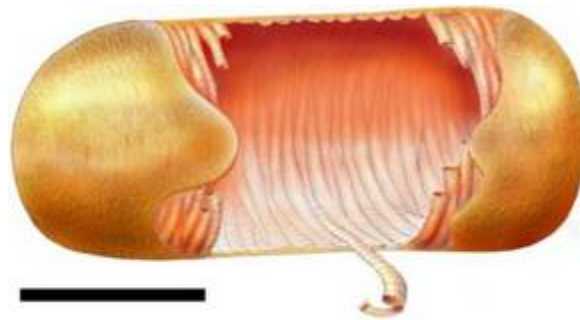


Abbildung 1.3: Modell der Anordnung von Peptidoglykan in der Zellhülle von *B. subtilis*. Über die Stammpeptide quervernetzte Glykan-Stränge bilden 25 nm breite „Taue“, die wiederum in helikale „Kabel“ gewickelt werden. Diese winden sich um die Kurzachse der Zelle, Exopolysaccharide lagern sich um die Schicht aus Peptidoglykan. Skalierungsbalken: 1 μ m. (Aus Hayhurst *et al.*, 2008).

Die Teichonsäuren sind kovalent am Peptidoglykan über eine Phosphodiester Bindungen zur C-6 OH-Gruppe von MurNAc und einer Linker Einheit bestehend aus Glc(β 1 \rightarrow 3)-Glc(β 1 \rightarrow 1/3)Gro-P-(3/4)-ManNAc(β 1 \rightarrow 4)-GlcNAc(1)-P (Glc: Glucose, Gro: Glycerol, P: Phosphat, ManNAc: N-Acetyl-Mannosamin, GlcNAc: N-Acetylglucosamin) gebunden (Kaya *et al.*, 1985). Die Teichonsäuren von *Listeria* bestehen aus Poly-Ribitol-Einheiten, die mit Monosacchariden und auch D-Alanin substituiert sein können, wobei sich die Zusammensetzung der Substituenden bei den verschiedenen Serovaren von *Listeria* unterscheidet (Uchikawa *et al.*, 1986; Neuhaus und Baddiley, 2003).

Lipoteichonsäuren (LTA) sind amphiphatische Moleküle. Sie sind bei allen Arten von *Listeria* identisch und bestehen aus 1,3 verknüpften Poly-Glycerol-Phosphaten, die mit D-Alanin und α -Galaktosyl substituiert sind (Fiedler, 1988; Dehus *et al.*, 2010). Die Lipoteichonsäuren sind über ein Disaccharid an membranständiges Diacyl-Glycerol verankert und in Abhängigkeit

von der Wachstumstemperatur werden zu einem geringen Prozentsatz LTA-Moleküle mit zwei Membranankern gebildet (Dehus *et al.*, 2010).

Die Teichonsäuren und die Lipoteichonsäuren definieren die Ladung an der Zellhülle, dabei werden von den Phosphatgruppen negative und von freien Aminogruppen wie D-Alanin positive Ladungen eingeführt (Weidenmaier und Peschel, 2008). Die negativen Ladungen sind wichtig für die Kationen-Homeostasis durch die Bindung von Kationen (Weidenmaier und Peschel, 2008) und spielen eine Rolle bei der Resistenz gegen antimikrobielle kationische Moleküle (Peschel, 1999). Zudem binden und beeinflussen sie (möglicherweise durch ihre negativen Ladungen) die Regulation von Autolysinen (Höltje und Tomasz, 1975; Jonquières *et al.*, 1999; Weidenmaier und Peschel, 2008). Zellwand-Teichonsäuren scheinen für Biofilmbildung und Virulenz benötigt zu werden (Weidenmaier und Peschel, 2008) und sind Rezeptoren zur Anheftung von Bakteriophagen (Wendlinger *et al.*, 1996). Lipoteichonsäuren werden für die Adhäsion und ebenfalls für die Virulenz benötigt. Beispielsweise wurde gezeigt, dass der Pathogenitätsfaktor Internalin B spezifisch und nicht kovalent an LTA von *L. monocytogenes* binden kann (Jonquières *et al.*, 1999).

1.2.2 Zellwandlytische Enzyme

Der Begriff Peptidoglykan-Hydrolase beschreibt Enzyme, welche kovalente Bindungen des bakteriellen Peptidoglykans lysieren. Derartige Moleküle finden sich sowohl bei Protozoen, Tieren und Pflanzen als auch bei Bakterien und Bakteriophagen. Dabei variieren die Funktionen von Immunabwehr, Instandhaltung der bakteriellen Zellwand bis zur Infektion und Lyse des Phagenwirtes (Dziarski und Gupta, 2006; Callewaert *et al.*, 2010; Callewaert und Michiels, 2010).

Im Folgenden wird auf Enzyme mit bakteriellem oder viralem Ursprung mit dem Schwerpunkt auf Zellwand-Hydrolasen gegen Listerien-Peptidoglykan näher eingegangen.

1.2.2.1 Spezifitäten zellwandlytischer Enzyme

Für nahezu jede glykosidische, Amid- oder Peptid-Bindung des Peptidoglykans existiert ein hydrolytisches Enzym. Das Substrat einer Zellwand-Hydrolase definiert sich dabei über den Peptidoglykantyp, über sekundäre Modifikationen des Peptidoglykans sowie darüber, ob es sich um hochmolekulares Peptidoglykan oder kleine Fragmente handelt (Vollmer *et al.*, 2008-B). Je nach zu spaltender Bindung werden verschiedene Spezifitäten der Peptidoglykan-Hydrolasen unterschieden (Abbildung 1.4).

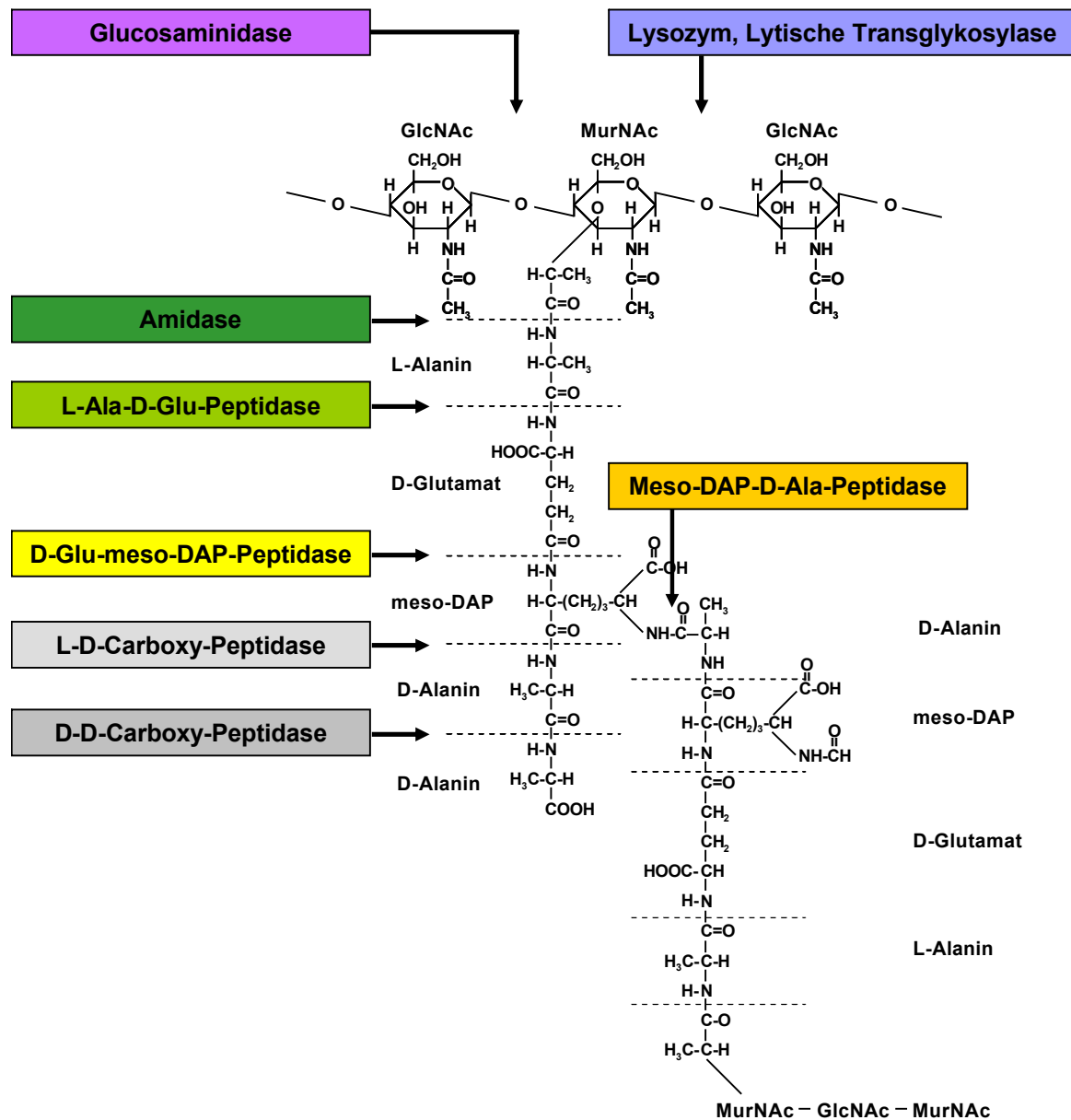


Abbildung 1.4: Spezifitäten von Peptidoglykan-Hydrolasen bei Peptidoglykantyp A1 γ . (Modifiziert nach Popowska *et al.*, 2004).

N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen (kurz Amidasen) hydrolysieren die Amidbindung zwischen Laktat an N-Acetylmuraminsäure und L-Alanin des Stammpeptids. Peptidasen spalten N-terminale Aminosäuren des Stammpeptids ab (D-Ala bzw. D-Ala-D-Ala) oder schneiden innerhalb der Peptidquervernetzung (Endopeptidasen). Die Substrate der Endopeptidasen variieren je nach Art des Peptidoglykantyps. N-Acetylmuramidasen (im Folgenden als Lysozyme bezeichnet) hydrolysieren die Bindung zwischen N-Acetylmuramylsäure und N-Acetylglucosamin. Hier wurde beobachtet, dass die Substraterkennung durch Lysozyme von Modifikationen der Zuckerreste des Peptidoglykans wie N-Deacetylierung und O-Acetylierung beeinflusst wird (Hermoso *et al.*, 2003; Vollmer, 2008). Lytische Transglykosylasen greifen dieselbe Bindung wie Lysozyme an, katalysieren jedoch zusätzlich den intra-

molekularen Transfer des O-Muramyl-Restes auf die C6-Hydroxylgruppe der Muraminsäure (Abbildung 1.5; Höltje *et al.*, 1975). N-Acetyl- β -D-Glucosaminidasen (im Folgenden Glucosaminidasen benannt) schneiden die glykosidische Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure (Loessner, 2005; Borysowski *et al.*, 2006; Layec *et al.*, 2008).

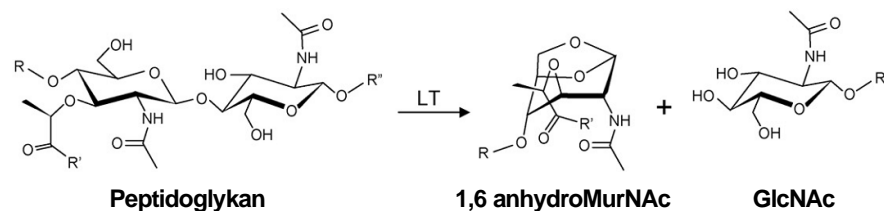


Abbildung 1.5: Reaktion der lytischen Transglykosylasen (LT) führt zur Bildung von N-Acetylglucosamin und 1,6-Anhydromuraminsäure (1,6-anhydroMurNAc). (Aus Scheurwater *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Funktion und Struktur zellwandlytischer Enzyme aus Phagen und Bakterien

Es gibt zwei Ereignisse innerhalb des Phagenzyklus, bei denen hochmolekulares bakterielles Peptidoglykan lysiert werden kann: während der Infektion des Wirtes und zur Entlassung fertiger Phagenpartikel aus der Zelle.

Endolysine

Um den Austritt der neu gebildeten Phagenpartikel aus der Wirtszelle zu ermöglichen sind bisher zwei Strategien von Bakteriophagen bekannt: Filamentöse Phagen werden aus der Wirtszelle ausgeschleust ohne diese zu zerstören, wohingegen nicht-filamentöse Phagen Proteine einsetzen, um die bakterielle Zellwand oder ihre Synthese anzugreifen. Bei den meisten Bakteriophagen mit doppelsträngiger DNA erfolgt die enzymatische Hydrolyse des Peptidoglykans zur Freisetzung der neuen Phagenpartikel über ein Holin-Endolysin-System (Bernhardt *et al.*, 2002). Endolysine aus Phagen, die grampositive Bakterien infizieren, akkumulieren im Cytosol der Wirtszelle, während Holine, kleine integrale Membranproteine, sich in der Cytoplasmamembran anhäufen, bis sie zur Permeabilisierung der Membran führen. Dadurch wird für die Endolysine die Zellwand zugänglich und der Abbau des Peptidoglykans resultiert in osmotischer Lyse der Bakterienzelle (Wang *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2002). Bei grampositiven Bakterien verdauen die zugehörigen Endolysine das Peptidoglykan auch bei exogener Zugabe (Abbildung 1.6).

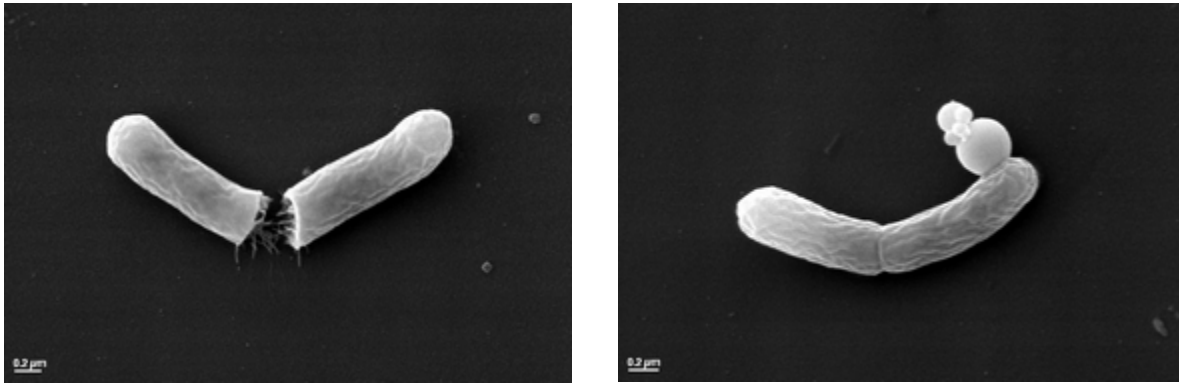


Abbildung 1.6: Lyse von Listerien-Zellen durch das Phagen-Endolysin Ply511. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach 8 min Inkubation (Abbildung der Profos AG, heute Hyglos GmbH).

Bis auf die Ausnahme des multimeren Enzyms PlyC eines Streptococcen-Phagen bestehen alle beschriebenen Endolysine von DNA-Phagen, die grampositive Organismen infizieren, aus Monomeren, die eine modulare Struktur aus mehreren Domänen aufweisen und gehören zur Kategorie 1 von modularen Enzymen, in denen Katalyse und Substratbindung separiert sind (Khosla und Harbury, 2001). Durchweg befindet sich in den N-terminalen Domänen die katalytische Aktivität, von deren Spezifitäten abhängt, welche Bindungen im Peptidoglykan hydrolysiert werden (Fischetti, 2010). In manchen Fällen, z. B. bei Endolysinen gegen *Staphylococcus*, wurden Endolysine mit 2 bis 3 enzymatisch aktiven Domänen (EADs) beschrieben (Navarre *et al.*, 1999). Die EAD ist über einen hydrophilen Linker (Hermoso *et al.*, 2007; Schmelcher *et al.*, 2010) mit der C-terminalen Zellbindedomäne (*cell wall binding domain*, CBD) verbunden. Letztere wird für die spezifische Bindung der Wirtszellwand benötigt und führt damit die enzymatisch aktive Domäne (EAD) in korrekter Orientierung zum Substrat (Hermoso *et al.*, 2003; Fischetti, 2010). Rezeptoren der Zellwandbindedomänen sind Kohlenhydrate der bakteriellen Zellwand, die nicht kovalent gebunden werden (Sánchez-Puelles *et al.*, 1990; Loessner *et al.*, 2002).

Die Bindespezifität der CBD definiert die Zielorganismen und damit das Lysespektrum des vollständigen Endolysins. Dabei sind Endolysine entsprechend dem Phagen, aus dem sie stammen, art- oder gattungsspezifisch (Fenton *et al.*, 2010). Allerdings ist das Wirkspektrum der Endolysine in manchen Fällen breiter als das des dazugehörigen Phagen (Mayer *et al.*, 2008; Fischetti, 2010).

Die Bindspektren verschiedener CBDs aus *Listeria*-Endolysinen wurden intensiv mittels GFP-Markierung (*green fluorescent protein*) untersucht (Loessner *et al.*, 2002; Schmelcher *et al.*, 2010). Es stellte sich heraus, dass der Großteil der Zellbindedomänen nur an bestimmte Listerien-Serovare binden kann. Die Bandbreite der gebundenen Serovare der jeweiligen Domänen zeigt sich auch hier größer oder entsprechend dem Infektionsspektrum der zugehörigen Phagen (Schmelcher *et al.*, 2010). So gibt es Domänen wie die CBD118, die speziell Zellen der Serovare 1/2, 3 und 7, oder Domänen wie die CBD500, welche die

Serovare 4, 5 und 6 binden (Loessner *et al.*, 2002; Schmelcher *et al.*, 2010). Andere Zellbindedomänen sind in der Lage innerhalb der Serovare einzelne Stämme zu identifizieren. Im Beispiel von der CDBP35 handelt es sich hierbei um die meisten der getesteten Stämme mit Serovar 1-6, bei der CBDB025 sind dies 4a, 5 und 6b. Bisher wurden nur zwei Zellbindedomänen mit Bindung aller *Listerien*-Serovare beschrieben, nämlich die CBDs aus den Endolysinen Ply511 und PlyP40 (Schmelcher *et al.*, 2010).

Derzeit gibt es nur wenige bekannte Strukturen von vollständigen Endolysinen. Aus Phagen grampositiver Bakterien sind dies Cpl-1 gegen *Streptococcus pneumoniae* (Hermoso *et al.*, 2003) und von PlyPSA gegen *Listeria* (Korndörfer *et al.*, 2006). Von *Listeria*-Endolysinen ist zudem die Struktur der enzymatisch aktiven Domäne von Ply500 gelöst (Korndörfer *et al.*, 2008) (Abbildung 1.7).



Abbildung 1.7: Strukturen des Listerien-Endolysins PlyPSA (A) und der EAD von Ply500 (EAD500, B). Orange: CBD, blau: Linker, grün: EAD, rot: Zn²⁺ im aktiven Zentrum der EAD. Die Strukturen wurden gelöst von Korndörfer *et al.*(2006) und Korndörfer *et al.*(2008).

Lytische Phagenschwanzproteine

Auch bereits während der Infektion muss ein Bakteriophage die Zellhülle durchqueren, um seine DNA in die Wirtszelle injizieren zu können (Abbildung 1.8-B). Bei grampositiven Bakterien ist dabei das Peptidoglykan die äußerste Barriere. Um die Zellwand zu durchdringen, haben Bakteriophagen mechanische und enzymatische Mechanismen entwickelt (Cohen *et al.*, 2009).

Als enzymatischer Mechanismus wurden unter den strukturellen Komponenten der Caudovirales (den geschwänzten Phagen, Abbildung 1.8-A) Peptidoglykan abbauende Enzyme wie Endopeptidasen, Amidasen, Glucosaminidasen, Lysozyme und lytische Transglykosylasen gefunden. Ihre Anordnung innerhalb des Viruspartikels variiert, jedoch sind sie hauptsächlich im Phagenschwanz lokalisiert (Moak und Molineux, 2004). Beispiele hierfür sind das Lysin Tal₂₀₀₉ des Phagen Tuc2009 gegen *Lactococcus lactis* (Kenny *et al.*, 2004; Grath *et al.*, 2006) und das lytische Strukturprotein des *Listeria*-Phagen A118. Auch bei den anderen *Listeria*-Phagen A500, PSA, A511, P35, B054, B025 und A006 konnte das Vorhandensein von lytischen Strukturproteinen bestätigt werden (Bielmann, 2009). Diese Zellwand-

Hydrolasen verdauen lokal die Zellwand, um die Injektion des Phagengenoms zu erleichtern (Hermoso *et al.*, 2007).

Auch bei diesen Proteinen liegt eine Organisation in Domänen vor und es wurden lytische Schwanzproteine mit mehreren enzymatisch aktiven Domänen beschrieben, wobei die Domänen wie beim Bakteriophagen $\Phi 29$ von *B. subtilis* über flexible, glycinreiche Linker oder wie bei dem $\Phi MR11$ gegen *S. aureus* über nicht-hydrolytische Domänen voneinander separiert sind (Rashel *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2008).

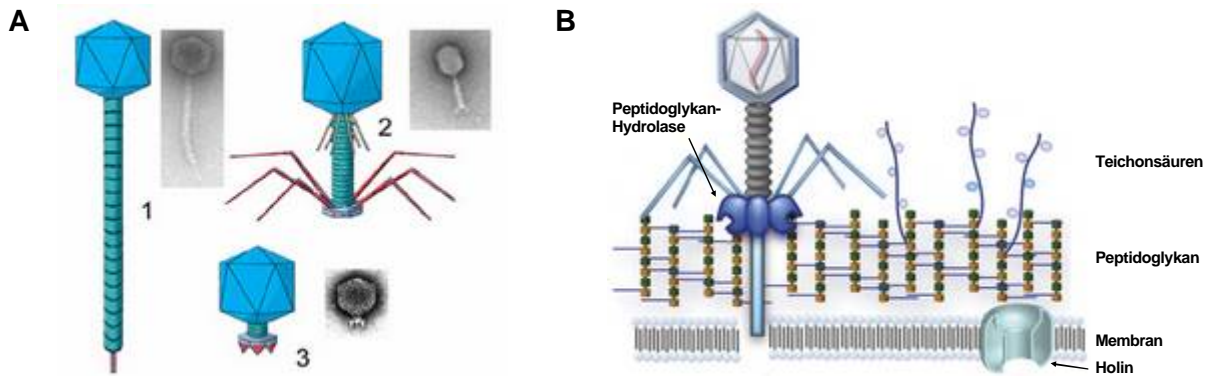


Abbildung 1.8: A: Morphologie der Caudovirales: 1: Siphoviridae, 2: Myoviridae, 3: Podoviridae. (Abbildung modifiziert nach van Regenmortel *et al.*, 2000). **B: Penetration der Zellwand während der Infektion** (modifiziert nach Hermoso *et al.*, 2007).

Von Bakterien selbst werden ebenfalls Zellwand-Hydrolasen synthetisiert, deren Substrat das vollständig assemblierte Makromolekül Peptidoglykan ist. Es handelt sich unter anderem um freigesetzte Bakteriozine zur Bekämpfung konkurrierender Bakterien und um zellgebundene Autolysine zur Regulierung der Anordnung der Zellwand.

Autolysine

Autolysine erzeugen Löcher im Peptidoglykan, wodurch Umstrukturierungen möglich sind und neues Zellwandmaterial eingegliedert werden kann. Diese Enzyme werden für eine Vielzahl an physiologischen Prozessen des bakteriellen Lebenszyklus benötigt, welche die kontrollierte Hydrolyse von Peptidoglykan benötigen, wie beispielsweise Zellwachstum, Zellteilung und -separation, Bildung von Flagellen und Pili, Sporulation und Sporenkeimung, Chemotaxis, Biofilmbildung, Assemblierung des Sekretionssystems und Pathogenität (Popowska, 2004; Vollmer *et al.*, 2008).

Wie bei Endolysinen liegt bei den Autolysinen eine distinkte funktionelle Trennung in Domänen für enzymatische Hydrolyse und Domänen für Bindung an die Zelloberfläche vor (López *et al.*, 1997; Joris *et al.*, 1992; Ghuysen *et al.*, 1994; Layec *et al.*, 2008; Humann und Lenz, 2009) und es finden sich auch Homologien in diesen Domänen zwischen Phagen-Endolysinen und Autolysinen (Romero *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 1990; Joris *et al.*, 1992;

Loessner *et al.*, 1997; Ridgen *et al.*, 2003). Die Zellbinderegion von Autolysinen beinhaltet meist Wiederholungssequenzen von Zellbindemotiven (Ghuysen *et al.*, 1994; Sanchez-Beato *et al.*, 1995; Popowska, 2004; Vollmer *et al.*, 2008-B), wobei einige wenige Autolysine (meist Carboxypeptidasen) nur aus einer einzelnen katalytischen Domäne bestehen (Layec *et al.*, 2008). Im Unterschied zu Endolysinen aus Phagen gegen grampositive Bakterien haben manche Autolysine C-terminale EADs und N-terminale Signalsequenzen für den Export aus dem Cytoplasma (Joris *et al.*, 1992; Popowska, 2004). Allerdings wurde auch für das Endolysin aus dem *Lactobacillus plantarum* Phagen Øg1e eine Signalsequenz beschrieben (Kakikawa *et al.*, 2002).

Bakteriozine

Eine andere Gruppe der bakteriellen Zellwand-Hydrolasen findet sich unter den Bakteriozinen. Der Begriff Bakteriozine beschreibt eine heterogene Gruppe von bakteriellen Proteinen, die sich in Größe (von Peptiden wie Nisin bis zu hochmolekularen Proteinen), mikrobiellen Zielorganismen, Wirkungsweise, Art der Freisetzung von der bakteriellen Zelle und Immunitätsmechanismen unterscheiden. Funktionell dienen sie der Abwehr anderer Bakterien, beispielsweise um einen Selektionsvorteil in gemischten Populationen zu erzielen (Gillor *et al.*, 2008). Viele Bakterien bilden ein oder mehrere Bakteriozine, wenn nötig zusammen mit einem Immunitätsfaktor zum Schutz der eigenen Zelle (Vollmer *et al.*, 2008-B).

Ein Beispiel für ein zellwandhydrolytisches Bakteriozin ist Lysostaphin aus *Staphylococcus simulans*. Es lysiert das Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus*. Lysostaphin zeigt ebenfalls einen modularen Aufbau und eine Gliederung in hydrolytische und zellbindende Domänen (Kumar, 2008). Andere Bakteriozine sind nicht modular aufgebaut wie das Cellosyl aus *Streptomyces coelicolor* (Rau *et al.*, 2001). Dieses Bakteriozin wirkt nicht artspezifisch, sondern auf vielen grampositiven Bakterien wie *Listeria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* und *S. aureus* (Fliss *et al.*, 1991; Rau *et al.*, 2001).

1.3 Chimäre Zellwand-Hydrolasen

Der modulare Aufbau der zellwandhydrolytischen Enzyme legte nahe, dass ein Austausch von Domänen zu neuen Enzymen mit veränderten Eigenschaften führen kann. Dies wurde anfänglich durch detaillierte Studien von Garcia und Mitarbeitern untersucht.

So führte die Neukombination von jeweils N- und C-terminaler Domäne aus einem Streptococcen-Autolysin und Endolysin zu funktionellen, chimären Enzymen, unabhängig davon, ob Homologien in den Zellbindedomänen der Ausgangsproteine vorhanden waren (Diaz *et al.*, 1990; Diaz *et al.*, 1991). Später konnte gezeigt werden, dass auch der Transfer

von Domänen zwischen Hydrolasen möglich ist, welche die Zellwände verschiedener Gattungen lysieren. So wurde ein Molekül aus der N-terminalen, lytischen Domäne eines *Clostridium*-Autolysins und einer C-terminale Zellbindedomäne eines Streptococcon-Endolysins generiert. Das Enzym besaß lytische Aktivität auf Zellwandmaterial von *Streptococcus*, nicht jedoch von *Clostridium* (Croux *et al.*, 1993). Ebenso gelang die Substitution der enzymatisch aktiven Domäne eines Streptococcon-Autolysins mit der eines Lysins von einem Lactococcon-Phagen mit einer anderen Lysespezifität und führte nachweislich zur Hydrolyse einer anderen Bindung im Peptidoglykan (Sheehan *et al.*, 1996). Auch die Aneinanderreihung von mehr als zwei Domänen wurde getestet. Durch die Kombination einer Endolysin-EAD (Lysozym) mit dem Lysin eines Streptococcon-Phagen (Amidase mit CBD) konnte ein Protein mit 3 Domänen mit höherer lytischer Aktivität als die der Wildtyp-Proteine generiert werden und über Mutagenese wurde nachgewiesen, dass beide enzymatischen Domänen innerhalb des Konstrukts aktiv waren (Sanz *et al.*, 1996). Ebenso erwies sich die Fusion eines Endolysins und auch seiner EAD mit dem Bakteriozin Lysostaphin als erfolgreich (Donovan *et al.*, 2006). Andere Experimente offenbarten die Möglichkeit, eine ursprünglich ohne Zellbindedomäne vorkommende Autolysin-EAD mit einer CBD zu fusionieren und ein funktionelles Enzym zu erhalten (Cibik *et al.*, 2001).

Diese Versuche zeigten, dass sich die Eigenschaften der Proteinchimären aus der Summe der Eigenschaften der kombinierten Domänen ergeben. Dies stellt ein großes Potential für die Kreation neuer Moleküle dar, denn bakterielle Zellwand-Hydrolasen sind äußerst interessant für eine antibakterielle Anwendung (Borysowski *et al.*, 2006; Hermoso *et al.*, 2007; Fenton *et al.*, 2010; Callewaert *et al.*, 2010; Fischetti *et al.*, 2010). Diese Enzyme agieren nur auf Bakterien, da ihr Substrat, das Peptidoglykan, in der Natur nur in Bakterien vorkommt und greifen daher keine eukaryotischen Strukturen an. Sie könnten daher im Lebensmittel, als sanftes Dekolonisierungsmittel oder in der Medizin Anwendung finden. Zudem lysieren Endolysine art- oder gattungsspezifisch, wodurch Starterkulturen oder Kommensalen nicht beeinträchtigt werden.

Allerdings gibt es bei natürlich vorkommenden Endolysinen oft Defizite für eine praktische Anwendung. So werden sie zum Teil nicht oder nur schlecht rekombinant exprimiert oder sind unlöslich (Daniel *et al.*, 2010). Auch ist die hohe Spezifität von Endolysinen zwar für viele Anwendungen ein Vorteil, doch sind natürlich vorkommende Enzyme in ihrem Erkennungsspektrum oft zu sehr eingeschränkt. Im Falle von *Staphylococcus*-Endolysinen werden beispielsweise nicht nur spezifische Endolysine gegen die Art *S. aureus*, sondern auch gegen die Gattung *Staphylococcus* gesucht (Daniel *et al.*, 2010). Gegen *Listeria* wären Enzyme interessant, deren Aktivität nicht auf bestimmte Serovare beschränkt ist wie von Ply500 und Ply118 (Loessner *et al.*, 2002).

Bisherige Arbeiten konnten zeigen, dass Defizite nativer Endolysine mit Hilfe von chimären Lysinen umgangen werden können. So konnte durch die Ligation einer EAD aus einem wenig löslichem Endolysin mit dem zellbindenden Fragment aus einem Hüllprotein ein besser lösliches Protein generiert werden (Manoharadas *et al.*, 2009). Daniel und Mitarbeiter (2010) wählten diesen Ansatz, um im Gegensatz zu natürlich vorkommenden Endolysinen ein lösliches, in *E. coli* exprimierbares Protein zu generieren, welches gegen alle Staphylococcen aktiv ist, einschließlich *S. aureus* mit Lysostaphin-Resistenz aufgrund einer Mutation in der Peptidbrücke der Peptidoglykanquervernetzung. In einem rationalen Ansatz wurden verschiedene Kombinationen von jeweils einer N-terminalen katalytischen und einer C-terminalen Zellbindedomäne designed, kloniert und untersucht. Viele der generierten Chimären waren inaktiv, andere waren unlöslich oder wurden in *E. coli* nicht exprimiert. Insgesamt wurden mehr als 15 Konstrukte getestet, bis ein Enzym mit den gewünschten Eigenschaften gefunden wurde. Die Machbarkeit der Erstellung chimärer Proteine mit neuen Binde- und Lyse-Eigenschaften wurde für die Kombination funktioneller Domänen aus Endolysinen von *Listeria*-Phagen bereits gezeigt, jedoch waren auch hier nicht alle Konstrukte aktiv (Schmelcher, 2009).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Bildung neuer Zellwand-Hydrolasen durch die Neukombination von lytischen und zellbindenden Domänen ist bedeutend für eine gezielte und für die Umgebung schonende antimikrobielle Anwendung.

Bisherige Ansätze zur Bildung effizienter Enzyme verlangten rationales Design mit anschließender Klonierung, Reinigung und Testung einzelner chimärer Proteine. Dabei besaßen viele der generierten Moleküle nicht die gewünschten Eigenschaften und eine geeignete Domänenkombination wurde oft erst durch die Erstellung verschiedener aufeinander folgender Generationen von Proteinfusionen gefunden, wodurch der damit verbundene Arbeits- und Zeitaufwand im Vorhinein kaum abzuschätzen war.

In dieser Arbeit sollte daher eine Methode entwickelt werden, die die zufällige Kombination von verschiedenen Domänen ermöglicht. Anschließende *Screening*-Schritte sollten inaktive und unlösliche Chimären herausfiltern und nur zu funktionsfähigen Proteinen führen.

Dies sollte am Beispiel von zellwandhydrolytischen Enzymen gegen *Listeria* erfolgen. Es sind mehrere Endolysine aus Phagen gegen *Listeria* bekannt, deren CBDs unterschiedliche Bindespektren innerhalb der Listerien-Serovare aufweisen. Domänen aus verschiedenen Zellwand-Hydrolasen und mit unterschiedlichen Eigenschaften sollten zufällig zu 2- und 3-

Domänenproteinen kombiniert und anschließend auf ausgesuchte Kriterien selektioniert werden.

Da *Listeria monocytogenes* ein Lebensmittelpathogen ist und eine Infektion hauptsächlich über kontaminierte Nahrung erfolgt, ist der wichtigste Schritt in der Kontrolle von Listeriose die Bekämpfung des Pathogens im Lebensmittel und der verarbeitenden Industrie. Daher sollte sich das *Screening* an Bedingungen von Lebensmitteln wie saurem pH und Gegenwart von EDTA orientieren. Das Ziel war es, ein Molekül zu finden, welches unter diesen Bedingungen in der Lage ist, sämtliche Listerien-Serovare zu lysieren.

Zusammen mit breit lysierenden Wildtyp-Proteinen sollten die besten Kandidaten gereinigt und auf Aktivität und Stabilität untersucht werden.

2 Material

2.1 Organismen

Alle Bakterienstämme und Phagen wurden aus der internen Organismenbank Profos *Culture Collection* (ProCC) der Profos AG (heute Hyglos GmbH) entnommen.

2.1.1 *E. coli* Labor-Stämme

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Labor-Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
M15 [pREP4]	NaI^S , Str^S Rif^R , Thi^- , Lac^- , Ara^+ , Gal^+ , Mit^+ , F^- , $RecA^+$, Uvr^+ , Lon^+	Qiagen AG, Hilden
NEB Express IQ	MiniF $lacI^q$ (Cam^R) / $fhuA2$ [lon] $ompT$ gal $sulA11$ $R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2$ [dcm] $R(zgb-210::Tn10--Tet^S)$ $endA$ $\Delta(mcrC-mrr)114::IS10$	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
HMS174 (DE3)	F^- $recA1$ $hsdR$ ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) Rif^R λ (DE3)	Novagen Inc., Madison, USA

2.1.2 Bakterien-Stämme

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Stämme.

ProCC S	Stamm	Serovar
773	<i>Listeria innocua</i> WSLC 2012	6b
776	<i>Listeria monocytogenes</i> ScottA WSLC 1685	4b
857	<i>Listeria ivanovii</i> WSLC 3009	5
995	<i>Listeria monocytogenes</i> SLCC 7150	1/2a
1002	<i>Listeria monocytogenes</i> SLCC 7154	1/2c
1003	<i>Listeria monocytogenes</i> SLCC 7290	1/2c
1014	<i>Listeria ivanovii</i> SLCC 4706	5
1095	<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	1/2 a
1135	<i>Listeria monocytogenes</i> WSLC1485	3a
1141	<i>Listeria monocytogenes</i> WSLC 1049	4a
1144	<i>Listeria monocytogenes</i> WSLC 1048	4d
1147	<i>Listeria innocua</i> WSLC2011	6a
1148	<i>Listeria innocua</i> WSLC 2054	6a
1150	<i>Listeria ivanovii</i> ssp <i>ivanovii</i> WSLC 30165	5''
1153	<i>Listeria seeligeri</i> WSLC 40140	1/2b
1154	<i>Listeria seeligeri</i> WSLC 40127	3b
1164	<i>Listeria ivanovii</i> ssp. <i>londoniensis</i> WSLC 30167	5
1577	<i>Listeria monocytogenes</i> , Eigenisolat	1/2a
1754	<i>Listeria seeligeri</i> WSLC 41116	6b
1803	<i>Listeria innocua</i> , Eigenisolat	unbekannt
2867	<i>Listeria monocytogenes</i> , Eigenisolat	1/2c
2919	<i>Listeria monocytogenes</i> , Eigenisolat	4d
2920	<i>Listeria monocytogenes</i> , Eigenisolat	4e
2974	<i>Listeria monocytogenes</i> WSLC 11082	3c
2975	<i>Listeria monocytogenes</i> WSLC 11083	3c
2991	<i>Listeria seeligeri</i> WSLC 41113	3b
1795	<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ1970	
2297	<i>Staphylococcus aureus</i> USA 300 MSLT type 8	

Die verwendeten Bakterien-Stämme stammen zum einen von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), der SLCC (*Special Listeria Culture Collection*, Universität Heidelberg) oder der WSLC (Weihenstephaner *Listeria Collection*). Zum anderen wurden Eigenisolate, die freundlicherweise von der Abteilung Mikrobiologie der Profos AG zur Verfügung gestellt wurden, verwendet.

2.1.3 Phagen

Die Kultivierung, Stammhaltung und Bereitstellung von Bakteriophagen wurde freundlicherweise von der Abteilung Mikrobiologie der Firma Profos AG bzw. Hyglos GmbH übernommen.

Tabelle 2.3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten *Listeria*-Phagen.

Phage	ProCC P	Referenz
P100	721	Carlton <i>et al.</i> , 2005
P35	814	Hodgson, 2000
P825	P825	Eigenisolat Hyglos GmbH

2.2 Plasmide

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide. Alle Plasmide vermitteln Ampicillin-Resistenz. His-tag: 6 Codons für Histidin.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pQE60	Expressions-Plasmid mit Codons für den His-tag zur 3'-Fusion an das jeweilige Gen (C-terminaler Proteintag); Die Transkription des klonierten Gens unterliegt der <i>E. coli</i> T5 RNA Polymerase. Die Expression ist über IPTG induzierbar.	Qiagen AG, Hilden
pET14b	Expressionsvektor mit Codons für den His-tag zur 5'-Fusion an das jeweilige Gen (N-terminaler Proteintag); Die Transkription des klonierten Gens unterliegt der T7 RNA Polymerase. Die Expression ist über IPTG induzierbar.	Novagen, Darmstadt
pQE30nH	pQE30 von Qiagen mit deletiertem His-tag und deletierter <i>NcoI</i> -Schnittstelle an bp 860 (Abbildung 2.1). Die Transkription des klonierten Gens unterliegt der <i>E. coli</i> T5 RNA Polymerase. Die Expression ist über IPTG induzierbar.	Pieper, 2005
p1319	pQE30nH- <i>ply511</i>	Pieper, 2005
p2507	pQE30-NHis- <i>plyP40</i>	Loessner M. J., ETH Zürich
p766	pQE30-NHis- <i>Ply500</i>	Loessner <i>et al.</i> , 1996
p2513	pQE30-NHis- <i>eadPSA_cbd118_A2</i>	Schmelcher, 2007
p2639	pET14b- <i>ead511-lysostaphin</i>	Hyglos GmbH, Bernried
p2674	pMA- <i>cellosyl_synthetisch</i>	Hyglos GmbH, Bernried

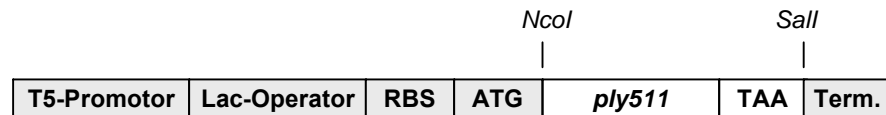


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der veränderten Multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pQE30nH. Der His-tag wurde deletiert, über NcoI und Sall kann direkt hinter das Start-Codon kloniert werden. Die vektorintrinsic NcoI-Schnittstelle (an bp 860) wurde deletiert (Pieper, 2005). RBS: Ribosomenbindestelle.

Tabelle 2.5: Erstellte Plasmide dieser Arbeit. Alle Plasmide vermitteln Ampicillin-Resistenz.

Plasmid	Beschreibung	Plasmid	Beschreibung
pQE60-lib	pQE60 von Qiagen mit veränderter multipler Klonierungsstelle (3.2.12)	p3004	pQE60-cbdP40-CHis
p2924	pQE30nH-plyP40	p3013	pQE60-cbdP40L-CHis
p3106	pQE30nH-plyP825	p3011	pQE60-cbdP40nls-CHis
p2932	pET14b-cbd006-spel-linsyn	p3003	pQE60-cbd500-CHis
p2935	pET14b-cbd511	p3006	pQE60-cbdB025-CHis
p2970	pET14b-cbdP40	p3005	pQE60-cbdP35-CHis
p3009	pET14b-cbdP40L	p3007	pQE60-cbd006-CHis
p3010	pET14b-cbdP40nls	p2930	pQE60-ead511-CHis
p2936	pET14b-cbd500	p2954	pQE60-ead500-CHis
p2964	pET14b-cbdB025	p2934	pQE60-eadP40-CHis
p2938	pET14b-cbdP35	p2931	pQE60-eadP35-CHis
p2909	pET14b-cbd006	p2927	pQE60-eadB054-CHis
p2908	pET14b-ead511	p2926	pQE60-eadPSA-CHis
p2961	pET14b-ead500	p2974	pQE60-eadgp29-CHis
p2933	pET14b-eadP40	p2925	pQE60-murA-CHis
p2905	pET14b-eadP35	p2953	pQE60-murA-Var2-CHis
p2907	pET14b-eadB054	p2972	pQE60-cellosyl-CHis
p2906	pET14b-eadPSA	p2973	pQE60-sle1-CHis
p2959	pET14b-eadgp29	p3026	pQE60-ispC-CHis
p2874	pET14b-murA	p3042 (M1)	pQE60-lib-ead500-cbd511
p2952	pET14b-murA-var2	p3115 (K1)	pQE60-lib-eadP40-cbd511
p2958	pET14b-cellosyl	p3169 (EcoGU3)	pQE60-lib-eadp40-cbd511-ead500
p2960	pET14b-sle1	p3192 (EcoGQ6)	pQE60-lib-eadp40-cbd511-eadp35
p3025	pET14b-ispC	p3291 (EcoGP8)	pQE60-lib-cbd006-eadp40-cbdp35
p3002	pQE60-cbd511-CHis		

2.3 Oligodesoxyribonukleotide

Tabelle 2.6: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung der Domänen.

Gen	Primer	Sequenz von 5' nach 3'
cbd511	fw-CBD511-lib	CACACACCATGGCGAGCACACCATCTACTAACCTAG
	rw-CBD511-Spel	TGTGTGACTAGTTTTTTTGATAACTGCTC
cbdP40	fw-CBDP40-lib	CACACACCATGGCGAGCAGCTACTAAATATGTCAATACGG
	rw-CBDP40-Spel	TGTGTGACTAGTTTTAACTCTAATTTTTTGACC
cbdP40L	fw-CBDP40-long	CGTCCATGGCGTCTAGCGACATATTGAAC
cbdP40nls	rw-CBDP40-Bam	CAGGATCCTTTAACTCTAATTTTTTGACC
cbd500	fw-CBD500-lib	CACACACCATGGCGGCAACACAAAACACTAATACAAATTC
	rw-CBD500-Spel	TGTGTGACTAGTTTTTAAGAAGTATTCTG
cbdB025	fw-CBDB025-lib	CACACACCATGGCGGGTACAGATAAATTCAC
	rw-CBDB025-Spel	GTGACTAGTTTTTTTCTTCACATATTTTG

<i>cbdP35</i>	fw-CBDP35-lib	CACACACCATGGCGGGGGAACGCAAGTAT
	rw-CBDP35-Spel	TGTGTGACTAGTTTTCTTGATGTCAAAC
<i>cbd006</i>	fw-CBD006-lib	CACACACCATGGCGACAAGCTCAAATAAGAACGTTTACTAC
	rw-CBD006-lib	CCAGGTTTGCTACCGCCAATCTTTTTCACGAACCTTCTTGTTAGCAG
	rw2-Lin_syn-lib	GCGGTAGCAAACCTGGAGGCACGAAGCCGGGTGGAAGCAAACCA GGATCCTGTAC
<i>ead511</i>	fw-EAD511-lib	CACACACCATGGCGAAATATACCGTAGAGAAC
	rw-EAD511-lib	GTGACAGGATCCTGTGCTTGGTTTAGGTGCTGG
<i>ead500</i>	fw-EAD500-lib	CACACACCATGGCGTTAACAGAGGCATGG
	rw-EAD500-lib	GTGACAGGATCCTGTATTAGTGTTTTGTGTTGCAGC
<i>eadP40</i>	fw-EADP40-lib	CACACACCATGGCGTTAGTTTTAGAC
	rw-EADP40-lib	GTGACAGGATCCTTTTGGTGCTGGTTTCGCTGG
<i>eadP35</i>	fw-EADP35-lib	CACACACCATGGCGCGAAAATTTACAAAAGCTG
	rw-EADP35-lib	GTGACAGGATCCTTCAGATGTGTCCACTTTATACTTGC
<i>eadB054</i>	fw-EADB054-lib	CACACACCATGGCGAAAAAATTAATACTAGCTATATACG
	rw-EADB054-lib	GTGATAGGATCCTGCCCGTCATGGCG
<i>eadPSA</i>	fw-EADPSA-lib	CACACACCATGGCGAATTATAGTATGTCACGAGGTC
	rw-EADPSA-lib	GTGACAGGATCCGTTTGGATTTTTTGCGGCTACTG
<i>eadgp29</i>	fw-EADgp29-lib	CACACACCATGGCGGTACAAGGTAGTGATG
	rw-gp29-Spel	GTGTGACTAGTAACAAAACGTATTACATG
<i>murA</i>	fw-MurA-lib	CACACACCATGGCGGACGAAACAGCG
	rw-MurA-lib	GTGACAGGATCCGGAGGTATTTGTGTTTCCAG
<i>murA-Var2</i>	fw-MurA-Var2-lib	CACACACCATGGCGTCAGCACTCCGTTTCG
<i>cellosyl</i>	fw-Mutlys-lib	CACACACCATGGCGACCAGCGGCGTGCAG
	rw-Mutlys-Spel	TGTGTGACTAGTCGCGGTGTTGTTGG
<i>sle1</i>	fw-Sle1-lib	CACACTCCATGGCGGTAAGTGGCAATGCATC
	rw-Sle1-Spel	GTGTGACTAGTGTGAATATATCTATAATTATTAC

Tabelle 2.7: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung der Wildtyp-Endolysine PlyP40 und PlyP825.

Gen	Primer	Sequenz von 5' nach 3'
<i>plyP40</i>	fw-EADP40-lib	CACACACCATGGCGTTAGTTTTAGAC
	CBDP40-Sall-rw	TTCATAGTCGACTTATTTAACTCTAATTTTTTGACCTGCG
<i>plyP825</i>	fw-EAD500-lib	CACACACCATGGCGTTAACAGAGGCATGG
	PlyP825VLrev	ACGCGTCGACTTAATTCTGAACATTCGGAAAATTTCC

Tabelle 2.8: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung benötigter Vektoren.

Vektor	Primer	Sequenz von 5' nach 3'
<i>pET14b-linsyn</i>	fw-CBD006-lib	CACACACCATGGCGACAAGCTCAAATAAGAACGTTTACTAC
	rw-CBD006-lib	CCAGGTTTGCTACCGCCAATCTTTTTCACGAACCTTCTTGTTAGCAG
	rw2-Lin_syn-lib	GCGGTAGCAAACCTGGAGGCACGAAGCCGGGTGGAAGCAAACCAGG ATCCTGTAC
	fw-Spel-lin	GTTCGTGAAAACCTAGTGGCGGTAGC
	rw-Spel-lin	GCTACCGCCACTAGTTTTTCACGAAC
	T7-Term	GCTAGTTTATTGCTCAGCGG
<i>pQE60-lib</i>	fw-EAD511-lib	CACACACCATGGCGAAATATACCGTAGAGAAC
	rw-pQE60-lib	TGTGTGAAGCTTAGATATCGTCGACCTGCAGTTTTTTGATAACCGC TCCTGTAC

Tabelle 2.9: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide zur Amplifikation von *Insert*-DNA aus Vektoren. Bio: Biotinmarkierung am 5'-Terminus.

Primer	Sequenz von 5' nach 3'
Bio-fw-NcoI-Lib	Bio-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCG
rw-PstI-Lib	CCTTTCGGGCTTTGTTACTGCAGGGATCC
fw-PstI-Lib	GTTTAACTTTAAGAAGGAGACTGCAGATGGCG
rw-Sall-Lib	CCTTTCGGGCTTTGTTAGTCGACGGATCC
fw-Sall-Lib	GTTTAACTTTAAGAAGGAGAGTCGACATGGCG
rw-EcoRV-Lib	CCTTTCGGGCTTTGTTAGATATCGGATCC
pQE-prom	TTATTTGCTTTGTGAGCGG
pQE-term	GTTCTGAGGTCATTACTGG

2.4 Längenstandards

2.4.1 DNA-Längenstandard

Gene Ruler™ ladder mix, Fermentas, St. Leon-Rot

Die Gene Ruler™ 1kb-DNA-Ladder diene sowohl als Längenstandard zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten als auch zur Abschätzung der DNA-Mengen im Agarose-Gel (3.2.7). Der Standard enthält DNA-Fragmente folgender Größe: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp.

2.4.2 Protein-Längenstandard

Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas St. Leon-Rot

Der Unstained Protein Molecular Weight Marker diene zur Größenbestimmung von Proteinen bei Analysen auf SDS-Gelen (6.4.2). Der Standard enthält Proteine folgender Größe: 116 (β-Galactosidase), 66,2 (BSA), 45 (Ovalbumin), 35 (Laktat-Dehydrogenase), 25 (REase Bsp981), 18,4 (β-Laktoglobulin) und 14,4 kDa (Lysozym).

2.5 Enzyme

DNase I	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
JS-CBD511*	Hyglos GmbH, Bernried
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Phusion High-Fidelity	
DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Ply511	Hyglos GmbH, Bernried
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Trypsin	Sigma, Taufkirchen

*JS-tag aus der α-Untereinheit von *Klebsiella pneumoniae* Oxalacetatdecarboxylase (Patent: WO/2008/077397).

2.6 Chemikalien

Alle nicht eigens aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), Merck KGaA (Darmstadt), Applichem (Darmstadt), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch Oldendorf), GE Healthcare (Freiburg), Gerbu Biochemicals GmbH (Gaiberg), Oxoid Deutschland GmbH (Wesel), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Serva (Heidelberg) oder Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe) verwendet und hatten den Reinheitsgrad p. a.

2.7 Verbrauchsmaterialien

96 Well Platten	96 Well Mikrotiterplatte (Polystyrol) 300 µl, Nunc GmbH, Wiesbaden 96 Well Mikrotiterplatte (MaxiSorp U96), Nunc GmbH, Wiesbaden 96 Well Mikrotiterplatte mit Deckel, Nunclon Δ (Polystyrol, steril), Nunc GmbH, Wiesbaden 96 DeepWell-Platte 2 ml (Polypropylen) Nunc GmbH, Wiesbaden 96 Well Rigid PCR Ultra Plate 0,2 µl Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Antikörper	His-Antikörper-POD-Konjugat, MicroCoat GmbH, Bernried <i>Strep-Tactin</i> AP Konjugat, IBA GmbH, Göttingen
Dialysemembran	ZelluTrans, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalspritzen	Omnifix, VWR, Melsungen
Entsorgungsbeutel	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Gradienten-Gele	NuPage Novex 4 - 12 %, Invitrogen GmbH, Darmstadt
Kits	Omega Bio-Tek, Doaville, GA, USA
Küvetten	Einmal-Küvette 1,5 ml, Brand GmbH & Co KG, Wertheim Fluoreszenz-Präzisionsküvette 1 cm, Hellma, Mülheim UV-Präzisionsküvette 1 cm, Hellma, Mülheim
Leersäule	Vantage L Laboratory Column VL 11 x 250, Millipore, Massachusetts, USA Empty Disposable PD-10 Columns, GE Medical Systems Deutschland GmbH & Co. KG, München
Magnetische Partikel	Streptavidin beschichtete Partikel, MicroCoat GmbH, Bernried Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Invitrogen GmbH, Karlsruhe Ni-NTA magnetic Agarose Beads, Qiagen AG, Hilden
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
Petrischalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	1,5 und 2 ml, Eppendorf, Hamburg
Semisynthetische Genbank	Sloning BioTechnology GmbH, Puchheim
Sterilstopfen	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Synthetische Gene	Geneart AG, Regensburg
Säulenmatrix	Toyopearl SP650M, Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart Ni-NTA Agarose, Qiagen AG, Hilden
Spritzenvorsatzfilter	Acrodisc Syringe Filter 0,2 µm, PALL Gelman Laboratory, Dreieich
Zentrifugal-Konzentrator	Vivaspin mit Membranen 10 und 30 kDa, Sartorius, Göttingen
Zentrifugenbecher	für Rotoren SS34, SLC4000, SLA1500, Kendro Sorvall, Hanau
Zentrifugenröhrchen	15 und 50 ml, Corning Inc., Corning, USA

2.8 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Analysenwaage	Kern 770 von Kern, Balingen
Autoklav	Varioklav 135 S, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank	Myrton, Heiligenstadt
Chromatographieanlage	AEKTA-FPLC, GE Healthcare, München AEKTA-Purifier, GE Healthcare, München
ELISA Reader	Sunrise Remote, Tecan GmbH, Männedorf, Schweiz
Fluoreszenzspektrometer	FluoroMax-3, Jobin Yvon Horiba, Grasbrunn
Geldokumentation	GenoPlex, VWR International GmbH, Darmstadt
Heizblock	Block Heater, Stuart Scientific, Watford Herts, UK
Hochdruckhomogenisator	Microfluics, Newton, MA, USA
Horizontalschüttler	Innova 2300 Plattform Shaker, New Brunswick Scientific, Edison, USA
Leitfähigkeitsmessgerät	HI 8733, Eurotronik, Friedewald-Motzfeld
Magnetrührer	MR 3001, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
PCR-Thermocycler	G-Storm GS1, Gene Technologies Corp, Somerville, USA
pH-Messgerät	CG 843, Schott, Mainz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Refraktometer	Krüss, Hamburg
Reinstwasseranlage	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, München
Rotator	Stuart Scientific Co. Ltd, Redhill, England
Rotoren	SS34, SLC4000, SLA1500, Kendro, Sorvall, Hanau
Schüttler für Gelfärbung	3016, GFL, Burgwedel
SDS-Gel-Apparatur	Mighty Small E250/260 von Invitrogen, Carlsbad, USA
Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Nürnberg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultra Turax	T18 basic von IKA Labortechnik, Staufen
Ultraschallgerät	Bandelin Electronic, Berlin
UV/VIS-Spektrometer	V650, Jasco, Tokyo, Japan
Vortexer	Vortex-Genie 2 G560-E, Scientific Industries Inc, Bohemia, USA
Wasserbad	Haake K H von Haake, Karlsruhe
Zentrifugen	Tischzentrifuge Biofuge Fresco von Heraeus Kendro, Hanau Multifuge 3 S-R, Heraeus Kendro, Hanau Standzentrifuge RC5C Plus von Kendro Sorvall, Hanau

2.9 Nährmedien, Medienzusätze und Antibiotika

2.9.1 Nährmedien

Luria Bertani (LB; Sambrook *et al.*, 1989)

1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt

SOB

2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,06 % (w/v) NaCl, 0,05 % (w/v) KCl
Nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ zugegeben.

Tryptose-Bouillon (TB)

Nach Angaben des Herstellers Merck KGaA, Darmstadt

Tryptose-Bouillon (TB), pH 6

Nach Angaben des Herstellers Merck KGaA, Darmstadt. Vor dem Autoklavieren wurden 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 6 zugegeben und auf pH 6 eingestellt.

HIB (Heart Infusion Broth)

Nach Angaben des Herstellers Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

Fraser Broth Base mit Fraser Selektiv Supplement

Nach Angaben des Herstellers Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

Agarplatten

Dem Medium wurde 15 g/l Agar zugesetzt, bei Top-Agar 7 g/l. Nach dem Autoklavieren wurden Antibiotika (150 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Rifampicin) bzw. Supplemente nach Angaben des Herstellers in das handwarme Medium gegeben.

2.9.2 Medienzusätze und Antibiotika

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Ampicillin Stammlösung	100 mg/mL	in H_2O bidest.
Kanamycin Stammlösung	25 mg/mL	in H_2O bidest.
Rifampicin Stammlösung	10 mg/mL	in Methanol p. a.
IPTG Stammlösung	1 M	in H_2O bidest.

2.10 Lösungen und Puffer

Alle Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Chemikalien der Reinheit p. a. und Reinstwasser angesetzt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Agarose-Gelelektrophorese		
1 % Agarose	1 % (w/v)	Agarose in 1x TBE aufgekocht, bei 60°C gelagert
1,5 % Agarose	1,5 % (w/v)	Agarose in 1x TBE aufgekocht, bei 60°C gelagert
TBE-Puffer		
	92 mM	Tris-HCl
	89 mM	Borat
	2,5 mM	EDTA
		pH 8

2x BW-Puffer	2 M 1 mM 10 mM	NaCl EDTA Tris-HCl pH 7,5
Dialysepuffer	40 mM 100 mM	Tris-HCl pH 8 NaCl
ELISA		
ABTS-Substratlösung	0,1 M 0,2 M 0,005 % (v/v) 0,1% (w/v)	Citronensäure pH 5 Na ₂ HPO ₄ H ₂ O ₂ 2,2 Azino-bis(3-ethyl) benzthiazolin 6-Sulfonsäure
ELISA-Waschpuffer	10 mM 300 mM 0,1 % (v/v)	Tris-HCl NaCl Tween 20 pH 7,6
pNPP-Substratlösung	0,1 M 0,15 M 0,5 mM 15 mM	Diethanolamin NaCl MgCl ₂ p-Nitrophenyl Phosphat pH 9,8
Proteinverdünnungs- puffer	10 mM 300 mM 0,1 % (v/v) 0,5 % (v/v)	Tris-HCl NaCl Tween 20 BSA pH 7,6
MBC-Puffer	2,35 mM 7,65 mM 50 mM 0,1 %	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl Tween 20 pH 6
PBS pH 7,2	7,75 mM 2,25 mM 0,15 mM	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl
PBST pH 8	9,41 mM 0,59 mM 0,15 mM 0,05 % (v/v)	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl Tween 20 pH 8
Proteinreinigung		
Chromatographie über Ni-NTA Agarose		
Puffer A	25 mM 500 mM 20 mM	Tris-HCl NaCl Imidazol pH 8

Puffer B	25 mM 500 mM	Tris-HCl Imidazol pH 8
Reinigung mit Ni-NTA-Sepharose Partikel		
Puffer A-P	50 mM 1 M 20 mM 0,05 %	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol Tween 20 pH 7,5
Puffer B-P	50 mM 1 M 250 mM 0,05 %	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol Tween 20 pH 7,5
Dialysepuffer-P	25 mM 250 mM 2,5 mM	Tris-HCl pH 8 NaCl EDTA
Chromatographie über Toyopearl SP650M		
Auftragspuffer SP	10 mM 25 mM 5 oder 10 mM	Tris-HCl pH 8 NaCl EDTA (optional)
Elutionspuffer SP	10 mM 1 M 5 oder 10 mM	Tris-HCl pH 8 NaCl EDTA (optional)
Reinigung unlöslich exprimierter Proteine		
IB-Aufschlusspuffer	10 mM 10 mM 25 mM	EDTA Tris-HCl pH 8 NaCl
IB-Waschpuffer	5 mM 2,5 % (v/v)	Tris-HCl pH 8 Triton X-100
Solubilisierungspuffer	8 M 25 mM 20 mM 10 mM	Harnstoff Tris-HCl Natriumcitrat DTE pH 8
Rückfaltungspuffer	50 mM 20 mM 300 mM 0,1 mM 1 mM	Tris-HCl Natriumcitrat Arginin Zinksulfat DTE pH 7,5
20x SSC-Puffer	3 M 300 mM	NaCl Natriumcitrat pH 7

SDS-Gelelektrophorese

4x Trenngel-Puffer	1,5 M 0,8 % (w/v)	Tris-HCl SDS pH 8
4x Sammelgel-Puffer	0,5 M 0,8 % (w/v) 3 mM	Tris-HCl SDS Bromphenolblau pH 6,8
APS-Lösung	10 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
1x SDS-Laufpuffer	25 mM 192 mM 1% (w/v)	Tris-HCl Glycin SDS pH 8
5x SDS-Probenpuffer	250 mM 25 % (v/v) 12,5 % (v/v) 7,5 % (w/v) 0,25 g/l	Tris-HCl Glyzerin β-Mercaptoethanol SDS Bromphenolblau pH 6,8
Fairbanks A	25 % (v/v) 10 % (v/v) 0,05 (w/v)	Isopropanol Essigsäure Coomassie Brilliantblau R250
Fairbanks D	10 % (v/v)	Essigsäure
TB-Puffer	10 mM 15 mM 250 mM 55 mM	PIPES CaCl ₂ KCl MnCl ₂ pH 6,7
Zellaufschlusspuffer	25 mM 100 mM	Tris-HCl pH 7,5 NaCl

2.11 Software**Lokale Anwendungen**

Chromas
 LBDraw
 Microsoft Office:
 Word, Excel, Power Point
 Swiss PDB Viewer

Version 2.33 © Technelysium PtyLtd
 Version 3.0 © Lynnon BioSoft
 Office 2003 © Microsoft Corporation
 Version 4.0.1 © N. Guex

Servergestützte Anwendungen

BLAST

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
<http://www.expasy.ch/tools/blast/>

ClustalW2

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

DLP- SVM	http://www.tuat.ac.jp/~domserv/cgi-bin/DLP-SVM.cgi
ExPASyProtParam	http://www.expasy.org/tools/protparam.html
ExPASyTranslate tool	http://www.expasy.org/tools/dna.html
iPDA	http://biominer.bime.ntu.edu.tw/ipda/
IUPRED	http://iupred.enzim.hu/
NEBcutter2	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
nps@	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_mlrc.html
Phyre	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
SABLE	http://sable.cchmc.org/
SignalP 3.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Tm calculator, NEB	http://www.finnzymes.com/tm_determination.html
3D-Jigsaw	http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Vorbereitung von Materialien und Lösungen

Zur Sterilisation wurden hitzestabile Lösungen, Medien, Glaswaren, Verbrauchsmaterialien und abzutötende *E. coli* Kulturen 20 min bei 121°C autoklaviert. Gegebenenfalls wurde anschließend bei 70°C getrocknet. Hitzelabile Lösungen wurden durch einen Spritzenvorsatzfilter mit Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert. Hitzelabile Feststoffe wie Folien für Folienlyseplatten wurden in der Sterilwerkbank 1 h mit UV-Licht bestrahlt.

3.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

E. coli Stämme wurden in LB Medium oder auf LB Agar-Platten (15 g/l Agar) kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989). Falls nicht anderweitig beschrieben erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37°C. Flüssigkulturen wurden bis zu 5 ml in einem 15 ml Kulturröhrchen bei 220 rpm rolliert, 50 ml Ansätze wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 180 rpm geschüttelt. Bei Plasmidtragenden Stämmen wurden die entsprechenden Antibiotika in folgenden Mengen zugesetzt: 150 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Rifampicin. Zur kurzzeitigen Lagerung wurden die Platten bei 4°C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen hergestellt. Hierzu wurden 0,6 ml einer Übernachtskultur und 0,6 ml einer 25 %igen (v/v) Glycerinlösung gemischt, 30 min bei RT inkubiert und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahrt.

3.1.3 Präparation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurde ein modifiziertes Protokoll nach Inoue *et al.* (1990) verwendet. Es wurden 250 ml SOB-Medium nach Zugabe von 10 mM MgSO₄ und 10 mM MgCl₂ mit 2 ml ÜN Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei Raumtemperatur kultiviert. Nach Zentrifugation (Rotor SLA1500, 4000 rpm, 10 min, 4°C) in vorgekühlten, sterilen Zentrifugenbechern wurden die Zellen vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (Rotor SLA1500, 4000 rpm, 10 min, 4°C) wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem TB Puffer mit 1,4 ml DMSO aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zu je 300 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Mit diesen Zellen wurden Transformationseffizienzen von 10⁷-10⁸ Kolonien pro µg DNA erreicht.

3.1.4 Transformation von *E. coli* Zellen

Für einen Transformationsansatz wurden 150 µl der präparierten chemisch kompetenten *E. coli* verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA oder 10 bis 20 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 60 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend sofort auf Eis für zwei Minuten abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden gegebenenfalls verdünnt oder aufkonzentriert auf Platten mit Selektionsantibiotika plattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Transformation von käuflich erworbenen ultrakompetenten NEB Express I^Q-Zellen (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

3.1.5 Anzucht und Lagerung von *Listeria*

Die *Listeria*-Stämme wurden in Medium oder auf Agar-Platten mit LB, HIB, TB oder Fraser Broth (Fraser Broth mit Supplementen) bei 37°C angezogen. Für Stämme mit Risikostufe 2 war die Verwendung von Schraubdeckelgefäßen oder Kolben mit Stopfen nötig. Kurzzeitige Lagerung erfolgte bei 4°C.

Für den Einsatz in Experimente wurden Listerien in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Dies wurde durch eine 1 zu 5 Verdünnung von ÜN-Kulturen im jeweiligen Medium und ca. 2 h Rollieren mit 220 rpm bei 30°C erreicht. Die Zellzahl wurde durch Messung der OD₆₀₀ abgeschätzt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 in etwa einer Zelldichte von 10⁹ Zellen pro ml.

3.1.6 Gewinnung von hitzeinaktivierten *Listeria* Zellen

20 ml einer ÜN-Kultur wurden in 5 l Kolben mit 1 l TB-Medium überimpft und bei 30°C unter Schütteln (180 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Die Zellen befanden sich somit in der exponentiellen Wachstumsphase. Nach Abzentrifugieren der Zellen (Rotor SLC4000, 5000 rpm, 15 min, 4°C) wurden die Pellets mit 4 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in 1 ml Aliquots für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A. Plasmid Mini Kits (Omega Bio-Tek, Doaville, GA, USA). Dazu wurden aus einer frischen ÜN Kultur 5 ml Zellsuspension verwendet. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde mit 50 µl Elutionspuffer. Isolierte Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

3.2.2 DNA-Freisetzung aus Bakteriophagen über Denaturierung der Kapsid-Proteine

Zur Freisetzung von Phagen-DNA wurde 3 µl Phagenlysate der Profos *Culture Collection* (ProCC) mit 3 µl 6 M Guanidin-Hydrochlorid und 3 µl Natriumphosphatpuffer (1 M HNa_2PO_4 , pH 12) vermischt und 1 h bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde 1 zu 50 mit Wasser verdünnt und anschließend direkt als Matrize für DNA-Amplifikation verwendet.

3.2.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

3.2.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase Ketten Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Als Matrizen dienten Phagengenome, die über GdnHCl-Auflösungen zugänglich wurden (3.2.2), isolierte Plasmide (3.2.1) oder Hitzelysate von *E. coli* Klonen oder Listerien. Hitzelysate wurden hergestellt, indem eine Kolonie in 200 µl Wasser resuspendiert und 5 min bei 95°C inkubiert wurde. Nach Abzentrifugation der unlöslichen Zellbestandteile (13000 rpm, 5 min, RT) wurden hiervon 0,5 µl direkt in die PCR eingesetzt. Die PCR-Bedingungen wurden nach Herstellerangaben der Polymerasen und den Schmelztemperaturen der Primer festgelegt. Die Reaktionen wurden in 50 µl Gesamtvolumen angesetzt und enthielten folgende Komponenten: ca. 100 ng Matrizen DNA, 200 pmol eines jeden Primers, je 0,125 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie Phusion High-Fidelity DNA Polymerase und HF-Puffer nach Angaben des Herstellers NEB (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main).

Bei Amplifikationen von erstmals zu klonierenden Genen unterschieden sich durch Einführung von genflankierenden Restriktionsschnittstellen oder Start-Codons oft die *Annealing*-Temperaturen der vollständigen Primer von denen der tatsächlich komplementären Primerabschnitte. In solchen Fällen wurde nach der initialen Denaturierung (30 Sekunden 98°C) die

Annealing-Temperatur in 2 Stufen variiert. Die *Annealing*-Temperatur der ersten Stufe mit 5 Zyklen wurde entsprechend dem G+C-Gehalt der komplementären Primerabschnitte gewählt (ca. 50°C). Die folgenden 33 Zyklen der zweiten Stufe wurden mit *Annealing*-Temperaturen der vollständigen Primer durchgeführt (ca. 60°C). In allen anderen Fällen wurde nur mit den Bedingungen der zweiten Stufe gearbeitet. Jeder Zyklus bestand aus 8 Sekunden Denaturierung bei 98°C, 20 Sekunden *Annealing* bei der entsprechenden Temperatur gefolgt von der Elongation bei 72°C für 15 Sekunden pro 1000 bp des zu amplifizierenden Fragments. Nach 7 Minuten finaler Elongation bei 72°C wurde das Gerät auf 10°C bis zur Entnahme der Proben abgekühlt.

Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.7) analysiert, gegebenenfalls aus dem Gel extrahiert (3.2.8) und falls nötig sequenziert (3.2.10).

3.2.3.2 Mutagenese über *Sequential Overlap Extension-PCR* (SOE-PCR)

Die *Sequential Overlap Extension-PCR* (SOE-PCR) ist eine *in vitro* Mutagenesetechnik, die in zwei Schritten zu einem gezielten Austausch eines oder mehrerer Nukleotide führt (Ho *et al.*, 1989). Es wurden zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer von etwa 35 bp Länge definiert, die mittig die gewünschten Nukleotidaustausche trugen. In einer ersten PCR wurden zwei getrennte PCR-Ansätze mit jeweils einem der Mutationsprimer und einem Randprimer des zu mutierenden Gens durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog zu Punkt 3.2.3.1, jedoch mit 33 Zyklen und mit der *Annealing*-Temperatur des vollständigen Primers. Als Matrize diente das zu mutierende Gen. Die dadurch generierten Fragmente hatten an den komplementären Primern überlappende Bereiche. Nach Aufreinigung über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.8) wurden diese Fragmente als Matrize mit den Randprimern in eine weitere PCR eingesetzt. Das Produkt dieser PCR wurde erneut über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

3.2.4 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II (Sambrook *et al.*, 1989), die eine palindromische Erkennungssequenz besitzen, gespalten. Es wurden Puffer und Enzyme der Firma NEB (New England Biolabs GmbH, Frankfurt), soweit möglich HF-Enzyme, verwendet. Temperatur- und Pufferbedingungen wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers gewählt, die Ansätze wurden dabei jeweils 2 h lang inkubiert. Es wurde beachtet, dass das zugegebene Volumen an Restriktionsenzymen 10 % des Gesamtvolumens nicht überschritt, um mögliche *Star*-Aktivität bei zu hohen Glyzerinkonzentrationen aus dem Enzym-Lagerpuffer (enthält 50 % Glycerin) zu verhindern. In präparativen Ansätzen wurden 1 bis 10 µg DNA mit mindestens 20 U je Enzym verdaut. Nach Restriktionsverdau von Vektoren erfolgte

eine einstündige Inkubation mit 10 U Alkalischer Phosphatase. Dadurch werden 5' ständige Phosphate abgespalten, was bei nachfolgenden Ligationen (3.2.6) Religation des Vektors verhindert. Verdaute DNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.7) analysiert und gegebenenfalls aus dem Agarose-Gel extrahiert (3.2.8). Nach Verdauen direkt an 5'- und 3'-Enden von linearen DNA-Fragmenten wurden diese entsprechend Punkt 3.2.5 gereinigt.

3.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten

Im Anschluss an den Restriktionsverdau an den 5' und oder 3'-Enden von DNA-Fragmenten wurden diese über E.Z.N.A. Cycle Pure Kits (Omega Bio-Tek, Doaville, GA, USA) gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde mit 50 µl Elutionspuffer. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.6 Ligation von DNA-Enden

Zur Ligation von geschnittenem Vektor und Insert-DNA wurden die DNA-Fragmente in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 3 gemischt. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl mit 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt am Main) und Ligasepuffer nach Angaben des Herstellers. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ligationsansatz weiterverwendet.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA erfolgte in Gelen von 1 oder 1,5 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer. Die Agarose wurde in einem handelsüblichen Mikrowellengerät gekocht und mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. DNA-Proben wurden mit nötigem Volumen von 6 fach Ladepuffer (Fermentas, Heidelberg) versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Längenstandard wurde der GeneRuler™ ladder mix (Fermentas, Heidelberg) verwendet. Durch Anlegen von 100 V wurden die DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend separiert und anschließend über UV-Licht der Wellenlänge 302 nm analysiert. Bei Bedarf wurde DNA gemäß 3.2.8 extrahiert.

3.2.8 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Für eine Aufreinigung wurden unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mit dem E.N.Z.A. Gel Extraktions Kit (Omega Bio-Tek, Doaville, GA, USA) nach Herstellerangaben gereinigt. Eluiert wurde mit 50 µl Elutionspuffer. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung lässt sich aus der Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmen. Gemessen wurde gegen Elutionspuffer in einer Quartzküvette mit 1 cm Schichtdicke, die Probe wurde in Elutionspuffer verdünnt. Eine Absorption von 1 entspricht in etwa einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Lösung. Entsprechend berechnet sich die DNA-Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt: $c_{\text{dsDNA}} (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \cdot 50 \cdot f$.

Dabei ist c_{dsDNA} die Konzentration der doppelsträngigen DNA, A_{260} die gemessene Absorption bei 260 nm und f der Verdünnungsfaktor.

Zur Messung wurde mit dem UV/VIS Spektrometer V650 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) ein Spektrum zwischen 240 und 320 nm aufgenommen. Das Verhältnis von A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Lösung und sollte bei proteinfreien Proben größer 1,8 betragen.

Eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel durch Vergleich der Bandenintensität mit den Banden GeneRuler™ ladder mix (Fermentas, Heidelberg).

3.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen von mutagenisierten und klonierten DNA-Fragmenten erfolgte durch die Firma Entelechon GmbH (Regensburg).

Gereinigte Plasmide (3.2.1) wurden mit Hilfe der pQE- und T7-Primer sequenziert. Über PCR amplifizierte DNA wurde mit Hilfe der verwendeten PCR-Primer sequenziert.

Die Auswertung erfolgte über die BLAST-Funktion von Chromas 2 (BLAST im *national center for biotechnology information*, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) oder über ClustalW2 (2.11).

3.2.11 Herstellung des modifizierten Vektors pET14b-linsyn

Für die Fusion von Domänen ohne C-terminalem domäneneigenen Linker wurde pET14b-linsyn, ein modifizierter pET14b-Vektor, konstruiert, in dem die synthetische Linkersequenz GGCGGTAGCAAACCTGGAGGCACGAAGCCGGGTGGAAGCAAACCA *upstream* der *Bam*HI-Schnittstelle eingefügt wurde (3.2.11). Über *Nco*I- und *Spe*I-Schnittstellen konnte somit an eine Domänensequenz der synthetische Linker im Leserahmen anligiert werden (Abbildung 3.1).

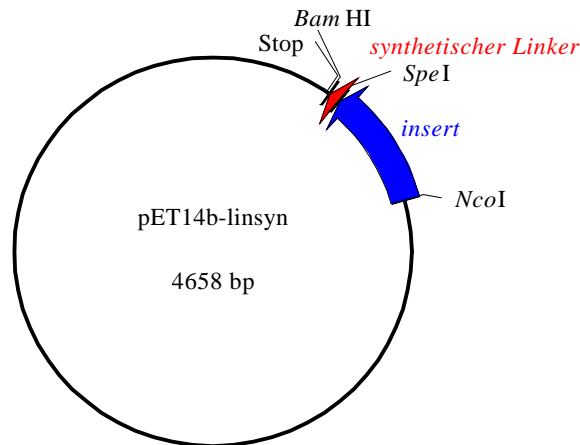


Abbildung 3.1: Schema des modifizierten pET14b-Vektors pET14b-linsyn. Der codierende Bereich für den synthetischen Linker ist rot und das mögliche *insert*-Gen ist blau dargestellt.

Zur Erstellung von pET14b-linsyn wurde *cbd006* mit den Primern fw-CBD006-lib und rw-CBD006-lib amplifiziert (3.2.3.1). Das PCR-Produkt wurde 3' mit der Sequenz für den synthetischen Linker erweitert über eine PCR mit den Primern fw-CBD006-lib und rw2-Lin_syn-Lib. Das erhaltene Produkt wurde mit *NcoI* und *BamHI* verdaut (3.2.4) und in pET14b ligiert (3.2.6).

Nach Transformation von kompetenten HMS174(DE3)-Zellen mit dem entstandenen Plasmid (3.1.4) wurden positive Klone mit Ampicillin-Resistenz selektiert. Klone, die Proteine der erwarteten Proteingröße exprimierten (3.3.1), wurden sequenziert (3.2.10). Über *Sequential Overlap Extension-PCR* (3.2.3.2) mit den Mutageneseprimern fw-SpeI-lin und rw-SpeI-lin und den Randprimern fw-CBD006-lib und T7-Term wurde vor dem synthetischen Linker eine *SpeI*-Schnittstelle eingeführt, wodurch die letzten beiden Aminosäuren der CBD006 substituiert wurden. Im Anschluss an Verdau mit *NcoI* und *BamHI* (3.2.4) und Ligation in pET14b (3.2.6) wurden mit den generierten Plasmiden kompetente HMS174(DE3)-Zellen transformiert (3.1.4). Die Selektion positiver Klone erfolgte durch Ampicillin-Resistenz und Plasmide aus Klonen mit Expressionsbanden der erwarteten Proteingröße (3.3.1) wurden sequenziert (3.2.10).

3.2.12 Klonierung des *Screening*-Vektors pQE60-lib

Die generierten Varianten besitzen je nach Anzahl an Domänen unterschiedliche Restriktionsschnittstellen an den Termini, nämlich *NcoI* und *SalI* bei 2 Domänen bzw. *NcoI* und *EcoRV* bei 3 Domänen.

Für die Klonierung der Fusionsprodukte mit 2 bzw. 3 Domänen sowie für das anschließende *Screening* wurde daher ein *Screening*-Vektor mit geeigneten Restriktions-Schnittstellen und induzierbarer Expression benötigt. Hierfür wurde ausgehend von pQE60

der Vektor pQE60-lib generiert, der eine multiple Klonierungsstelle mit 5' *Nco*I sowie 3' *Sal*I und *Eco*RV besitzt (Abbildung 3.2). Die DNA-Fragmente für die zufällige Kombination liegen ohne Stop-Codon vor, weshalb die Translation über ein vektorintrinsic Stop-Codon terminiert wird.

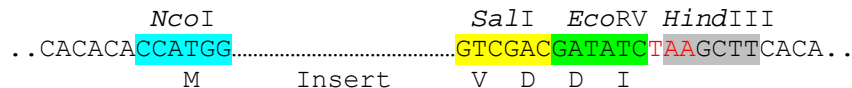


Abbildung 3.2: Multiple Klonierungsstelle im Screening-Vektor pQE60-lib. Zwischen den Erkennungs-Sequenzen für *Nco*I (türkis) und *Hind*III (grau) wurden die Schnittstellen für *Sal*I (gelb) und *Eco*RV (grün) eingefügt und der His-tag wurde entfernt. An der *Hind*III-Schnittstelle ist im Leserahmen ein Stop-Codon (rot) für die Termination der Translation der Mehrdomänenproteine.

Für die Klonierung des *Screening*-Vektors wurde *ply511* mit den Primern fw-EAD511-lib und rw-pQE60lib aus dem Plasmid p1319 amplifiziert (3.2.3.1). Das erhaltene Fragment wurde mit *Nco*I und *Hind*III verdaut, ebenso wie der Vektor pQE60 (3.2.4). Nach Ligation des Inserts in den verdauten Vektor wurden M15 *E. coli*-Zellen transformiert (3.2.6, 3.1.4). Über Expressionstest (3.3.1) und Lyseaktivität auf Lyseplatten mit hitzeinaktivierten Zellen von *Listeria monocytogenes* ProCC S1095 (3.5.1) wurden positive Klone ermittelt.

Das Plasmid wurde durch Kontrollverdau mit *Nco*I in Kombination mit *Sal*I, *Eco*RV bzw. *Hind*III auf Richtigkeit der Restriktionsschnittstellen getestet. Der erhaltene Vektor wurde für die Erstellung der Banken mit 2- und 3-Domänenproteinen verwendet und dafür mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen verdaut.

3.2.13 Bindung von biotinylierter DNA an magnetische Streptavidin-Partikel

Biotinylierte DNA sollte an Streptavidin beschichtete, magnetische Partikel gebunden werden. Dies wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Durch Anhalten an einen Magneten können diese Partikel am Rand des Reaktionsgefäßes fixiert werden. Nach ca. 30 Sekunden sind die Überstände klar und die flüssige Fraktion kann abgenommen werden. Auf diese Weise wurden die im Folgenden beschriebenen Waschschrte und Abnahmen des Überstandes durchgeführt.

Für Ermittlung geeigneter Bedingungen für die Bindung von Biotin-markierter DNA an Streptavidin beschichtete Partikel wurde zunächst biotinylierte DNA mit einer Größe von ca. 1,3 kb über PCR mit den Primern Bio-fw-*Nco*I-lib und rw-PstI-Lib und der *Annealing*-Temperatur von 63,2°C hergestellt (3.2.3.1), als Matrice diente hierfür das Plasmid p2639.

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt nach Agarose-Gelelektrophorese aus dem Agarose-Gel gereinigt (3.2.7, 3.2.8).

Für Bindung an magnetische Partikel wurden diese zuvor 3-mal mit 500 µl Bindepuffer gewaschen. Nach Zugabe der biotinylierten DNA zu den gewaschenen Partikeln wurden die Ansätze über 40 min bei RT im Thermoblock geschüttelt (900 rpm). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Partikel mit 1x Restriktionspuffer NEB4 gewaschen und in maximal 50 µl 1x Restriktionspuffer NEB4 aufgenommen. Anschließender Restriktionsverdau mit *Nco*I-HF (3.2.4) spaltete die DNA von den Partikeln ab. Die Analyse der Fraktionen erfolgte auf Agarose-Gelen (3.2.7).

Für die Testungen wurden Partikel von MicroCoat GmbH (Bernried) und Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie die Bindepuffer BW-Puffer (2x BW: 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) und 1x SSC-Puffer (20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH7) verwendet.

Für spätere Arbeiten wurde Bindung in 1x BW-Puffer mit in etwa 5 mg/ml Partikel der MicroCoat GmbH und mit einem Verhältnis von 0,7 bzw. 0,95 pmol DNA zu 1 mg Partikel gewählt.

3.2.14 Generierung der zufällig ligierten Domänen-Genbank

Erstellung der Domänenfragmente

Für die zufällige Ligation der Domänenfragmente wurden diese zunächst über PCR amplifiziert (3.2.3.1). Als Matrizen dienten hierfür jeweils die in pET14b bzw. pET14b-linsyn klonierten Domänen. Primer für Position 1 waren Bio-fw-*Nco*I-lib und rw-PstI-Lib, für Position 2 fw-PstI-Lib und rw-SalI-Lib, für Position 3 fw-SalI-Lib und rw-EcoRV-Lib. Es wurde jeweils eine *Annealing*-Temperatur verwendet (Position 1: 63,2°C, Position 2: 64,8°C, Position 3 51,1°C). Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert und daraus gereinigt (3.2.7 und 3.2.8). Im Anschluss daran wurden die Fragmente für Positionen 1 und 2 mit *Pst*I-HF, für Position 3 mit *Sal*I-HF verdaut (3.2.4) und gereinigt (3.2.5). Die Konzentrationsbestimmung für jedes einzelne Fragment erfolgte wie in Punkt 3.2.9 beschrieben.

Sukzessive Ligation der Fragmente

0,06 pmol aller derart vorbereiteten Fragmente für Position 1 und 2 wurden vereint und 5 min auf 60°C erhitzt. Dadurch sollten bereits bestehende, aneinander haftende Enden innerhalb der DNA-Fragmente voneinander getrennt werden. Anschließend wurde der Ansatz mit sterilem Wasser, T4-Ligase Puffer und 3,5 µl T4-Ligase (NEB) zu einem Gesamtvolumen von 150 µl aufgefüllt und für 3 h bei 16°C inkubiert. Danach erfolgte die Hitzeinaktivierung der Ligase für 10 min bei 65°C. Das Binden der biotinylierten DNA-Fragmente an

Streptavidin beschichtete Partikel erfolgte wie in Punkt 3.2.13 beschrieben: Nach Zugabe von 150 µl 2x BW-Puffer wurde der Ansatz mit 1,2 mg Partikel vereinigt.

Nach Abziehen des Überstandes mit ungebundenen DNA-Fragmenten wurden die Partikel 3x in Restriktionspuffer NEB4 gewaschen. Zum Verdau der 3'-Enden der Ligationsprodukte wurden die Partikel in 150 µl NEB4 resuspendiert, mit 3 µl *SaI*-HF (20 U/µl) versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Partikel 3-mal mit 500 µl NEB4-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Partikel in 90 µl NEB4-Puffer aufgenommen. Ein Aliquot von 30 µl wurde bei -20°C gelagert. Ein Aliquot von 30 µl wurde abgenommen für die Erstellung der 2-Domänen Genbank. Der Rest der Partikel wurde für die Anligation der Domänen Position 3 weiterverwendet und enthielt maximal 0,02 pmol Ligationsprodukte aus Position 1 und 2. Je Fragment für Position 3 wurden 0,2 pmol vereinigt und 5 min bei 60°C erhitzt. In einem Gesamtvolumen von 500 µl wurde der Fragment-Pool für Position 3 mit den 30 µl Partikel, 50 µl ATP (10 mM), 4,5 µl T4-DNA Ligase und der entsprechenden Menge an NEBT4-Puffer sowie sterilem Wasser für die Ligation über 3 h bei 16°C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Partikel 3 x in NEBT4-Puffer gewaschen und danach in 50 µl aufgenommen. Nach Zugabe von 3 µl *EcoRV*-HF (20 U/µl) wurde 2 h bei 37°C verdaut. Nach dreimaligem Waschen mit NEBT4 wurden die Partikel in 40 µl NEBT4 aufgenommen. Die 30 µl mit Partikel-gebundenen 2-Domänen Fragmenten sowie die 40 µl mit Partikel - gebundenen 3-Domänen Fragmenten wurden nach Zugabe von je 3 µl *NcoI*-HF (20 U/µl) für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Im Restriktionsüberstand mit den abgespaltenen Fragmenten wurde *NcoI*-HF für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert.

Ligation in pQE60-lib und Transformation

Zur Ligation in den Transformationsvektor wurde für 2-Domänen Fragmente mit *NcoI* und *SaI* verdautes Plasmid pQE60-lib benötigt, für 3-Domänen Fragmente mit *NcoI* und *EcoRV* verdautes Plasmid pQE60-lib.

Insert- und Vektor-DNA wurden in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 3 gemischt und 5 min bei 60°C erhitzt. Zusammen mit 2 µl ATP (10 mM), 1 µl Ligase und entsprechender Menge an NEBT4-Puffer erfolgte in 20 µl-Ansätzen für 3 h bei 16°C die Ligation. Die Transformation erfolgte wie in Punkt 3.1.4 beschrieben, plattiert wurde auf Folienlyseplatten (3.5.2).

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Expression von Proteinen im analytischen Maßstab

Expressionstest

Jeweils 1 ml LB-Medium in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 150 µg/ml Ampicillin wurde mit dem zu testenden *E. coli* Klon angeimpft. Diese Flüssigkulturen wurden je nach Testung bei Raumtemperatur, 30°C oder 37°C im Thermomixer (900 rpm) geschüttelt. Sobald eine Kulturtrübung beobachtbar war, wurde mit 1 mM IPTG induziert. Daneben wurde jeweils eine nicht induzierte Kontrolle mitgeführt. Nach Inkubation von 3 h 37°C, 4 h 30°C oder über Nacht bei RT wurden die Zellen abzentrifugiert (Biofuge Fresco, 13000 rpm, 4°C, 5 min), das Pellet je nach Größe in 100 bis 300 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt. Je Ansatz wurden 15 µl auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteinexpression nach Coomassie-Färbung überprüft (3.4.2). Aus dem Klon mit der deutlichsten Expressionsbande wurde das Plasmid isoliert (3.2.1) und über Sequenzierung (3.2.10) auf Richtigkeit der inserierten Sequenz überprüft.

Test auf lösliche Proteinexpression

Mit dieser Methode wurde überprüft, in welcher Fraktion nach Zellaufbruch und fraktionierender Zentrifugation sich das Zielprotein befand. Darüber hinaus wurde mit diesem Test untersucht, ob sich die Menge an löslichem Protein durch Expression bei verschiedenen Temperaturen verändert. Die Temperatur mit der höchsten Konzentration an löslichem Protein wurde für die Expression im Großmaßstab (3.3.2) gewählt.

Die Durchführung erfolgte analog zum Expressionstest bis zur Abzentrifugation der Zellen. Die Zellpellets wurden in 250 µl Aufschlusspuffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl) resuspendiert und unter Kühlung mittels Ultraschall aufgeschlossen (Amplitude 65 %, 20 Sekunden). Nach Zentrifugation (Biofuge Fresco, 13000 rpm, 4°C, 15 min) wurden die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Pellets wurden in 250 µl 1x SDS Probenpuffer aufgenommen, 20 µl wurden für den folgenden Gelauftrag benötigt. Nach Aufkochen der Proben von je 20 µl resuspendiertem Pellet und 20 µl Überstand mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer erfolgte Analyse über SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung (3.4.2).

3.3.2 Expression von Proteinen im präparativen Maßstab

Um größere Mengen an rekombinantem Zielprotein zu erhalten, wurde eine Großanzucht im 2 l Maßstab durchgeführt. Dazu wurden 2 l LB-Medium, mit 150 µg/ml Ampicillin und bei M15 zusätzlich mit 25 µg/ml Kanamycin, mit 25 ml einer stationären Übernachtskultur des

entsprechenden plasmidtragenden *E. coli*-Stamms in einem 5 Liter Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Kultur wurde unter Schütteln (180 rpm) bei derjenigen Temperatur inkubiert, bei der die beste Proteinausbeute zu erwarten war (Test auf lösliche Proteinexpression s. 3.3.1). Bei einer OD₆₀₀ von 0,4–0,8 erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Kulturen wurden 3 h bei 37°C, 4 h bei 30°C bzw. über Nacht bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, SLC4000, 5000 rpm, 4°C, 15 min) geerntet. Die erhaltenen Zellpellets wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.3 Proteinreinigung

3.3.3.1 Zellaufschluss im präparativen Maßstab

Das in der Großanzucht (3.3.2) generierte Zellpellet wurde in 25 bis 35 ml Aufschlusspuffer (mit Zusammensetzung je nach Reinigungsart 3.3.3.2, 3.3.3.4, 3.3.3.5) aufgenommen. Nach Homogenisieren des Pellets mit dem Ultra-Turax wurde dieses auf Eis über Ultraschall aufgeschlossen (Amplitude 65 %, 6 x 30 s Ultraschall mit jeweils 1 min Pause). Anschließend erfolgte die Trennung der löslichen und unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (Sorvall, SS34, 13000 rpm, 4°C, 30 min). Bei nachfolgender Reinigung des Zielproteins aus der löslichen Fraktion (3.3.3.4 bzw. 3.3.3.5) wurde der Überstand, bei Rückfaltung des Zielproteins aus den *Inclusion Bodies* (3.3.3.2), wurde das Pellet weiterverwendet.

3.3.3.2 *Inclusion Body* Reinigung

Wenn Proteine unlöslich exprimiert werden, liegen die vollständig synthetisierten Proteine in sphärischen Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies*) meist nur partiell gefaltet vor. Zur Gewinnung derart exprimierter Proteine in gereinigter und aktiver Form, müssen zunächst diese *Inclusion Bodies* isoliert werden.

Hierzu wurde nach Expression des Zielproteins in *E. coli* (3.3.2) und dem Zellaufschluss mit Ultraschall (3.3.3.1) in IB-Aufschlusspuffer (10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl pH 8) mit dem Pellet weitergearbeitet. Das Pellet wurde in 50 ml IB-Waschpuffer (5 mM Tris-HCl pH 8 mit 2,5 % (v/v) Triton X-100) mit Hilfe des Ultra-Turax resuspendiert. Anschließend wurde die Fraktion durch Zentrifugation (Sorvall, SS34, 15000 rpm, 10 min, 4°C) erneut pelletiert und der Überstand (=W1) verworfen. Danach wurde dieser Waschvorgang zweimal mit 50 ml 5 mM Tris-HCl pH 8 (=W2 und W3) und einmal mit 30 ml Wasser (=W4) wiederholt. Das Pellet wurde anschließend so in Wasser aufgenommen, dass ein Gesamtvolumen von 5 ml vorlag, und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die

Überstände der einzelnen Waschfraktionen wurden über SDS-Gelelektrophorese analysiert (3.4.2). Im Anschluss erfolgte die Solubilisierung und Rückfaltung der Proteine (3.3.3.3).

3.3.3.3 Solubilisierung und Rückfaltung

Während der Solubilisierung von gereinigten *Inclusion Bodies* (3.3.3.2) wird das enthaltene Protein vollständig denaturiert. Danach erfolgt Rückfaltung, d. h. die Renaturierung des Proteins, wobei es bei korrekter Faltung seine native Struktur annimmt. Diese Schritte wurden in Anlehnung an Rudolph und Lilie (1996) durchgeführt.

Solubilisierung

Zur Solubilisierung wurden zu 500 µl *Inclusion Bodies* 50 µl 1 M NaOH Lösung gegeben. Nach sofortiger Homogenisierung durch Vortexen, erfolgte die Zugabe von zehnfachem Volumen an Solubilisierungspuffer mit 8 M Harnstoff mit anschließendem erneuten Mischen. Der im Solubilisierungspuffer enthaltene Harnstoff zählt zu den chaotropen Reagenzien. Solche Reagenzien verhindern die Ausbildung nicht-kovalenter Bindungen der Aminosäure-Seitengruppen und damit bedingen sie eine Entfaltung der Polypeptidkette. Das Reduktionsmittel Dithioerythrit (DTE) verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken. Im Solubilisierungsansatz sollte das Protein also als komplett denaturierte Polypeptidkette vorliegen.

Rückfaltung

Um die native Struktur des Proteins zu erhalten, wurde zunächst das denaturierte Protein tropfenweise im Verhältnis eins zu 16 unter Rühren bei 4°C in Rückfaltungspuffer mit 300 mM Arginin verdünnt. Das Arginin im Rückfaltungspuffer fördert nach Rudolph und Lilie (1996) die Rückfaltung der Proteine. Der Rückfaltungsansatz wurde nun über Nacht bei 4°C vorsichtig gerührt. Durch die Verdünnung sinkt die Harnstoffkonzentration auf ca. 0,5 M, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Aminosäure-Seitengruppen ermöglicht werden. Dies führt zur Rückfaltung des Proteins in seinen nativen Faltungszustand. Eventuell auftretende Proteinaggregate wurden im Anschluss an die Rückfaltung durch Zentrifugation (Sorvall, SS34, 15000 rpm, 30 min, 4°C) entfernt. Rückgefaltetes Protein wurde über SDS-Gelelektrophorese (3.4.2) analysiert und im photometrischen Lysetest auf Aktivität überprüft (3.5.4). Da noch zahlreiche Nebenbanden in den Chargen des rückgefalteten EcoGQ6 auftraten, wurde anschließend chromatographisch gereinigt (3.3.3.5). Hierzu wurde der Rückfaltungsansatz mit 10 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl pH 8 auf eine Leitfähigkeit kleiner 8 mS eingestellt.

3.3.3.4 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen, reversiblen Wechselwirkung eines Proteins mit einem an der Säulenmatrix gebundenen Liganden, wodurch seine Anreicherung aus einem Proteingemisch erreicht wird. Die Elution erfolgt durch die kompetitive Verdrängung des Proteins vom immobilisierten Liganden.

Ni-NTA Agarose Chromatographie

Proteine mit einem Hexahistidin-*tag* wurden über Ni-NTA Agarose der Firma Qiagen AG (Hilden) angereichert. Hierfür wurde vorab eine leere Kunststoff Säule mit Filter mit 5 ml Ni-NTA Agarose befüllt und mit dem vierfachen Säulenvolumen des Puffers A (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) äquilibriert. Der Überstand aus dem Zellaufschluss mit Ultraschall (3.3.3.1) in Puffer A wurde über die Säule gegeben. Verunreinigungen wurden entfernt, indem mit dem zehnfachen Säulenvolumen des Puffers A gewaschen wurde. Das gebundene Protein wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen mit Puffer B (25 mM Tris-HCl, 500 mM Imidazol, pH 8) eluiert und in 1-2 ml Fraktionen gesammelt. Proben der Reinigungsschritte und Eluate wurden über SDS-PAGE (3.4.2) analysiert. Die Protein enthaltenden Eluat-Fractionen wurden vereinigt und gegen den entsprechenden Puffer dialysiert (3.3.4). Die Ni-NTA Agarose wurde im Anschluss nach Herstellerangaben regeneriert und gelagert.

Proteine mit His-*tag*, die unter diesen Bedingungen abgebaut wurden, wurden über Ni-NTA-Sephrose Partikel gereinigt.

Magnetische Ni-NTA-Sephrose Partikel

Die Reinigung von His-markierten Proteinen über magnetische Ni-NTA-Sephrose Partikel (Qiagen AG, Hilden) erfolgte unter Kühlung und in Gegenwart von Protease-Inhibitor-Cocktail (Protease Inhibitor Cocktail für die Reinigung Histidin-markierter Proteine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München). Die Partikel wurden mit Hilfe eines Magneten von der flüssigen Phase separiert.

50 bis 100 µl Pellet wurden in 400 µl Puffer A-P mit 5 µg/ml Lysozym und 5 µl Protease-Inhibitor-Cocktail für 1 h bei 4°C und 1000 rpm im Thermomixer geschüttelt und anschließend über Ultraschall (Amplitude 65 %, 3x 30 Sekunden) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (Biofuge fresco, 13000 rpm, 15 min, 4°C) wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt und zur SDS-Gel-Analyse mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. 100 µl Ni-NTA-Sephrose-Partikel (5 %ige Lösung) wurden zweimal mit Puffer A-P gewaschen. Nach Zugabe des Aufschluss-Überstandes und 5 µl Protease-Inhibitor-Cocktail wurde der Ansatz für 1 h bei 4°C und 700 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Danach wurden die Partikel mittels eines Magneten gesammelt und der Überstand abgezogen (Durchlauf) und

die Partikel zweimal mit Puffer A-P gewaschen (=W1 und W2). Nach einminütiger Inkubation mit Puffer B-P mit 5 µl Protease-Cocktail wurden die Eluate von den Partikeln getrennt und abgenommen. Es wurde zweimal auf diese Weise eluiert. Proben der Reinigungsschritte und Eluate wurden über SDS-PAGE (3.4.2) analysiert. Die Protein enthaltenden Eluat-Fractionen wurden getrennt gegen Dialysepuffer-P dialysiert (3.3.4).

3.3.3.5 Kationenaustauscher-Chromatographie

Die Chromatographieschritte mit Kationenaustauscher-Matrix wurden in dieser Arbeit an einer AEKTA-FPLC oder AEKTA-Purifier Chromatographieranlage (GE Healthcare, München) durchgeführt.

Die Ionenaustauscher-Chromatographie beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung von Proteinen mit einer geladenen Säulenmatrix. Die Matrix eines Anionenaustauschers trägt positiv geladene Seitenketten und eignet sich deshalb für die Reinigung negativ geladener Proteine, während ein Kationenaustauscher aufgrund seiner negativ geladenen Matrix für die Reinigung positiv geladener Proteine gewählt wird. Die Stärke der Bindung hängt dabei von der Höhe der Ladung des Proteins ab. Diese wiederum basiert auf dem spezifischen pI-Wert, welcher den pH-Wert wiedergibt, bei dem ein Protein ungeladen ist. Deshalb müssen die Pufferbedingungen für die Chromatographie derart gewählt werden, dass insbesondere das gewünschte Protein möglichst stark geladen ist. Die restlichen Proteine des *E. coli*-Zellaufschluss sollten hingegen möglichst wenig geladen sein und damit durch den Säulenlauf abgetrennt werden. Die Elution erfolgt durch Verdrängung der gebundenen Proteine durch eine steigende Konzentration an im Laufpuffer gelösten Salzen.

Für die Proteinreinigung über das Säulenmaterial Toyopearl SP650M (Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart) wurden die generierten Zellpellets (3.3.2) im Auftragspuffer-SP mit Ultraschall aufgeschlossen (3.3.3.1) und mit Auftragspuffer-SP so lange verdünnt, bis die Leitfähigkeit des Aufschlussüberstandes geringer als 8 mS war. Gereinigt wurde über 6 ml der Matrix Toyopearl SP650M, gepackt in einer Vantage L Laboratory Column VL 11 x 250 Säule (Millipore, Massachusetts, USA). Auftrag und anschließende Waschung erfolgte mit Auftragspuffer, eluiert wurde im Gradienten zu Elutionspuffer-SP. Details zur chromatographischen Reinigung lassen sich aus Tabelle 3.1 entnehmen. Im Anschluss wurden die Proben der Reinigungsschritte über SDS-Gelelektrophorese (3.4.2) analysiert und Fractionen mit sauberem Zielprotein gegen 40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8 dialysiert (3.3.4).

Tabelle 3.1: Protokoll der Reinigung mittels Kationenaustauscher-Chromatographie. Verwendet wurden 6 ml Säulenmaterial Toyopearl SP650M (Tosoh Biosciences GmbH, Stuttgart).

Schritt	Gewählte Parameter
Flussrate	6 ml/min
Äquilibrieren	3 SV Auftragspuffer
Beladen	Variables Probenvolumen
Waschen	ca. 10 SV Auftragspuffer
Elution	Gradient: 8-500 mM NaCl
Regeneration	3 SV 1 M NaOH 1 M NaCl, 1 h RT Inkubation
	3 SV H ₂ O
	3 SV 0,1 M NaOH

Inkubation mit zweiwertigen Ionen

Nach Reinigung von PlyP825 in Gegenwart von EDTA war das Enzym inaktiv. Das Protein wurde bei einer Konzentration von ca. 0,5 mg/ml jeweils mit 10 mM Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ sowie Kombinationen von Zn²⁺ mit Ca²⁺ für 1 h inkubiert. Nach Dialyse (3.3.4) verblieben noch 40 µM des jeweiligen Ions in der Lösung. Messung auf Wiederherstellung der Aktivität erfolgte in 20 mM NaH₂PO₄ pH 6, 100 mM NaCl (3.5.4). Zum Vergleich wurde die OD-Abnahme von PlyP825, welches ohne EDTA gereinigt wurde, verfolgt.

3.3.4 Dialyse von Proteinlösungen

Mittels Dialyse durch eine semipermeable Membran mit Poren definierter Größe wurden Proteine von kleineren Molekülen und Ionen getrennt (Lottspeich und Zorbas 1998). Die Dialyse diente zur Umpufferung von Proteinlösungen, die nach der Reinigung in definiertem Puffer gelagert werden sollten. Dazu wurden je nach Proteingröße eine 3,0 oder 12,0 kDa Dialysemembran verwendet (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), die zuvor 30 min in Wasser eingeweicht wurde. Vom Dialysepuffer wurde mindestens das 100 fache Volumen der zu dialysierenden Proteinlösung eingesetzt. Alle Dialysen wurden unter Rühren bei 4°C mit mindestens zweimaligem Pufferwechsel durchgeführt.

3.3.5 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe von den Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin (Sartorius, Göttingen) mit molekularer Ausschlussgrenze 10 bzw. 30 kDa über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben über Zentrifugation (Multifuge, 4000 rpm, 4°C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Volumen des einzukonzentrierenden Proteins.

3.3.6 Lagerung von gereinigtem Protein

Gereinigte Proteine wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 UV-Spektroskopie zur Bestimmung der Proteinkonzentration

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

$$\epsilon_{280} = \sum \text{Trp} \cdot 5500 + \sum \text{Tyr} \cdot 1490 + \sum \text{Cysteine} \cdot 125$$

$$^{0,1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{\text{MW}}$$

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

$^{0,1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient [cm^2/mg]

MW: Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

Durch Einsetzen in das Lambert-Beersche-Gesetz kann somit die Proteinkonzentration (c) berechnet werden:

$$c = \frac{A_{280}}{^{0,1\%}A_{280} \cdot d}$$

c: Konzentration [mg/ml]

A_{280} : Absorption bei 280 nm

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

$^{0,1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient [cm^2/mg]

Die Absorptionsmessungen erfolgten bei RT mit dem UV/VIS-Spektrometer V650 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) mit UV-Präzisionsküvetten (1 cm, Hellma, Mühlheim). Die Schrittweite betrug 1 nm, die Scangeschwindigkeit 400 nm/min und der Messbereich war 240-340 nm. Das Absorptionsmaximum des Proteins sollte sich bei 278 nm befinden. DNA-freie Proteinlösungen zeigen ein Verhältnis von $A_{260}:A_{280} > 1:1,8$. Der Quotient A_{250} / A_{280} sollte 1 zu 3 entsprechen und es sollte keine Absorption von 300 nm auftreten, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch auf Aggregatbildung zurückgehende Lichtstreuung ausschließen zu können. Bei deutlicher Absorption oberhalb von 300 nm wurde als erste Näherung eine lineare Zunahme der Lichtstreuung mit abnehmender Wellenlänge angenommen und die ermittelte Proteinkonzentration entsprechend korrigiert.

Die Nachweisgrenze dieser spektroskopischen Proteinmengenbestimmung bei 280 nm liegt zwischen 20-3000 µg Protein/ml und zeigt eine starke Abhängigkeit von der Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Proteins (Lottspeich und Zorbas, 1998).

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinproben wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970). In Anwesenheit des Detergens Natriumdodecylsulfat werden Proteine durch den Siebeffekt des Gels entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, welches durch Vergleich mit einem Proteinlängenstandard abgeschätzt werden kann. Als Längenstandard für SDS-Gel-Analyse wurde Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die verwendeten Gele hatten, je nach Größe des zu analysierenden Proteins, eine Acrylamidkonzentration von 12 oder 15 % (w/v). Das Pippetierschema ist in Tabelle 3.2 gezeigt.

Tabelle 3.2: Pippetierschema von 12 und 15 %igen SDS-Gelen.

Reagenzien	Sammelgel	Trenngel	
		12 %	15 %
30 % AcrylBisacryl	1 ml	6 ml	7,5 ml
4x Trenngel-Puffer	-	3,75 ml	3,75 ml
4x Sammelgel-Puffer	1,5 ml	-	-
Wasser	3,5 ml	5,25 ml	3,75 ml
10 % APS	60 µl	90 µl	90 µl
TEMED	6 µl	9 µl	9 µl

Für die SDS-PAGE wurden die Proteinlösungen in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 180 V Gleichspannung für 45 min und im Anschluss wurde die Coomassie-Färbung der Proteine über eine modifizierte Methode nach Fairbanks *et al.* (1971) mit Fairbanks Lösung A durchgeführt. Mit Fairbanks Lösung D wurden die Gele im Anschluss entfärbt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 0,2-0,4 µg Protein/mm² Gel.

Gradientengele wurden käuflich erworben (NuPage Novex 4-12 %, Invitrogen GmbH, Darmstadt) und nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.4.3 Assays zur Proteinstabilität

3.4.3.1 Limitierte Proteolyse

Trypsin ist eine Serinprotease, die Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, sofern nicht bestimmte Ausnahmen zutreffen, wie beispielsweise ein Prolin, welches in der Primärsequenz auf Lysin bzw. Arginin folgt. Die Geschwindigkeit des Abbaus lässt Rückschlüsse über die Stabilität des Proteins und die Zugänglichkeit der Spaltstellen zu. Die Proteinprobe wurde im molaren Verhältnis von 1/10 mit Trypsin versetzt und der Ansatz bei Raumtemperatur in 40 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und der Abbau durch Zugabe von 5 x SDS Probenpuffer und Aufkochen gestoppt. Alle Proben wurden abschließend mittels SDS-PAGE analysiert (3.4.2).

3.4.3.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die intrinsische Fluoreszenz eines Proteins beruht auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und, im geringen Maß, Phenylalanin, wobei in der Regel die Tryptophanfluoreszenz dominiert. Durch die Sensitivitätsparameter wird dieser Effekt deutlich (Tryptophan 1100, Tyrosin 200, Phenylalanin 8). Zudem kann es zu einem Energietransfer zwischen den aromatischen Seitenketten kommen (Royer, 1995). So kann die Tyrosinfluoreszenz oft kaum detektiert werden, da in nativen Proteinen die Lichtenergie, die von Tyrosin absorbiert wurde, bei ausreichend örtlicher Nähe teilweise auf Tryptophan transferiert werden kann und dann teilweise von Tryptophan emittiert wird. Dieser Energietransfer kann entweder aufgrund der räumlichen Nähe der Tryptophanseitenkette zur Tyrosinseitenkette (intramolekularer Energietransfer) geschehen, oder die Anregungsenergie wird über das Proteinrückgrat auf Tryptophanreste dieser Polypeptidkette übertragen (intermolekularer Energietransfer). Die Tryptophanfluoreszenz kann durch Anregung bei einer Wellenlänge von 295 nm untersucht werden, da Tyrosin kaum bei dieser Wellenlänge absorbiert (Schmid, 1989). Bei 280 nm erhält man Tryptophan- und Tyrosinfluoreszenz. Sowohl die Intensität der Fluoreszenzemission als auch die Lage des Emissionsmaximums hängen stark von der unmittelbaren Umgebung des Chromophors ab. Liegt das Protein denaturiert vor und sind somit die Seitenketten der Tryptophane lösungsmittel exponiert, ist eine Rotverschiebung zu beobachten (Schmid, 1997): Ein vollständig denaturiertes Protein hat ein Emissionsmaximum bei 350 nm, während ein nativ gefaltetes Protein mit abgeschirmten Tryptophanen ein Emissionsmaximum zwischen 320 und 330 nm aufweist.

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzspektroskopie dazu genutzt, um die induzierte Entfaltung von Proteinen zu verfolgen (3.4.3.3). Die Messungen erfolgten im Fluoreszenz-

spektrometer FluoroMax-3 der Firma HORIBA Jobin Yvon (Grasbrunn) in einer vierseitig geschliffenen Quarzküvette (1 cm, Hellma, Mühlheim). Alle verwendeten Puffer waren filtriert (0,2 µm Porenfilter).

3.4.3.3 Chemische Denaturierung mit Guanidin-Hydrochlorid

Zur Untersuchung der Stabilität von Proteinen gegenüber chaotropen Reagenzien wurde natives Protein unterschiedlichen Konzentrationen an Denaturierungsmittel ausgesetzt. In dieser Arbeit wurde Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl) verwendet.

Vorbereitung der Proteine

Zunächst wurde eine 8 molare GdnHCl-Lösung in 40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8 zu den in Tabelle 3.3 aufgeführten GdnHCl-Stammlösungen mit 40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8 verdünnt. Um Anlagerung von Proteinmaterial an die Gefäßwände der Küvetten und Reaktionsgefäße zu reduzieren wurde für Ansatz 16 anstelle von 0 M GdnHCl eine Endkonzentration von 0,05 M GdnHCl verwendet.

Tabelle 3.3: GdnHCl-Konzentrationen in den Stammlösungen und den Messansätzen.

Ansatz	GdnHCl-Stammlösungen mol/l	GdnHCl im Messansatz mol/l
1	8,00	6,00
2	7,33	5,50
3	6,67	5,00
4	6,00	4,50
5	5,33	4,00
6	4,67	3,50
7	4,00	3,00
8	3,60	2,70
9	3,20	2,40
10	2,80	2,10
11	2,40	1,80
12	2,00	1,50
13	1,60	1,20
14	1,33	1,00
15	0,67	0,50
16	0,07	0,05

Von jedem zu testenden, gereinigten Protein wurden in Lagerpuffer (40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8) Ausgangslösungen mit jeweils 1,096 nmol/ml hergestellt (entspricht beispielsweise bei Ply511 0,04 µg/ml) und sterilfiltriert. Von diesen Ausgangslösungen wurden für jeden Denaturierungsansatz 0,275 ml mit 0,825 der entsprechenden, sterilfiltrierten GdnHCl Stammlösung vermischt, so dass die Proteine mit einer Konzentration von 274 pmol/ml vorlagen (im Fall von Ply511 entspricht dies 0,01 µg/ml). Die daraus resultierenden denaturierenden GdnHCl-Konzentrationen im Messansatz sind ebenfalls in

Tabelle 3.3 gezeigt. Um die tatsächliche GdnHCl-Konzentrationen festzustellen, wurden mit Hilfe eines Refraktometers die Brechungsindices der einzelnen Messlösungen bestimmt.

Die Umrechnung der Brechungsindex-Werte zur Konzentration erfolgt über folgende Formel (Pace, 1986):

$$c_{\text{GdnHCl}} [\text{mol/l}] = 55,147 \cdot \Delta n_{\text{GdnHCl}} + 38,68 \cdot \Delta n_{\text{GdnHCl}}^2 - 91,6 \cdot \Delta n_{\text{GdnHCl}}^3$$

n: Brechungsindex

$$\Delta n_{\text{GdnHCl}} = n_{\text{GdnHCl}} - n_{\text{Puffer}}$$

Inkubation und Messung

Zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen nativem und aufgefaltetem Zustand des Proteins wurden die Ansätze bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überprüfung der Denaturierung erfolgte durch Fluoreszenz-Spektroskopie (3.4.3.2) nach verschiedenen Zeitpunkten. Nach fünf Tagen wurde keine weitere Veränderung festgestellt. Als Referenz zu den Proteinansätzen dienten reine Pufferansätze.

Zunächst wurde von allen Ansätzen mit der jeweils höchsten und niedrigsten GdnHCl-Konzentration nach Anregung der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Spektrum mit einem Emissionswellenlängenbereich von 300 – 450 nm aufgezeichnet, dabei wurde alle 0,5 nm mit 0,2 Sekunden Integrationszeit gemessen. Die spektralen Spaltbreiten für Anregung und Emission lagen bei 5 nm bzw. 10 nm. Die Fluoreszenzspektren wurden gegen die jeweilige Pufferfluoreszenz korrigiert. Hieraus wurde die Emissionswellenlänge ermittelt, bei der die Differenz zwischen nativem und vollständig denaturiertem Protein am größten war. Dies waren bei Ply511 326,5 nm, bei PlyP40 317,5 nm, bei PlyP825 370 nm, bei K1 318 nm, bei M1 387,5 nm, bei EcoGQ6 321 nm, bei EcoGU3 317,5 nm und bei EcoGP8 318 nm.

Die Messungen erfolgten anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und der dem Protein entsprechenden Emissionswellenlänge sowie zur Kontrolle bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm (je fünf Sekunden). Nach Korrektur der Messungen um die Pufferwerte wurden die Werte wie folgt normiert:

$$F_{\text{norm}} = \frac{F - F_u}{F_o - F_u}$$

F_{norm} : normiertes Fluoreszenzsignal

F_u : Fluoreszenzsignal denaturiertes Protein

F_o : Fluoreszenzsignal natives Protein

Die normierten Messwerte wurden als Funktion der Konzentration an Denaturierungsmittel aufgetragen.

3.4.3.4 Bestimmung der Restaktivität nach thermischer Inkubation

Zur Bestimmung der Restaktivität nach thermischer Inkubation wurden je Protein 6 Aliquots zu je 100 µl mit 10 µg/ml in 20 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl pH 6 bei 55°C erhitzt. Zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min wurde jeweils ein Aliquot entnommen und bis zur Messung nach Entnahme des letzten Aliquots auf Raumtemperatur gestellt. Unmittelbar danach erfolgte ein photometrischer Flüssiglysetest (3.5.4) mit 900 µl hitzeinaktivierter Zellen von ProCC S1095 (3.1.6) in 20 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl pH 6.

3.5 Bestimmung der Proteinaktivität

3.5.1 Lyseplatten

Lyseplatten zur Klontestung

Für jede Platte wurden 80 µl hitzeinaktivierte *Listeria* Zellen (3.1.6), 7,5 µl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) und 5 µl IPTG-Stammlösung (1 mol/l) in 5 ml LB Top-Agar eingegossen. Auf diese Platten wurden mit Hilfe einer Impföse bereits bestehende Kolonien von plasmidtragenden *E. coli* Klonen getüpfelt, die auf Expression eines *Listeria*-lytischen Moleküls getestet werden sollten. Nach Bebrütung bei RT, 30°C oder 37°C wurden die Platten auf Lysehofbildung ausgewertet.

Lebend-Lyseplatten zur Proteintestung

Für jede Platte wurde 1 ml einer ÜN-Kultur in TB-Medium von Listerien diverser Serovare in 5 ml LB Top-Agar eingegossen. Nach Trocknen des Agars wurden hierauf 5 µl gereinigtes Protein ($c=0,4$ µg/ml) getropft. Nach Inkubation bei 30°C ÜN entstand bei Listerien-Wachstum Eintrübung und ein Lysehof bei Aktivität der eingesetzten Proteine.

3.5.2 Folienlyseplatten zur verzögerten Induktion

Um Transformationsansätze auf Expression von *Listeria*-lytischen Molekülen zu testen wurden Folienlyseplatten erstellt. Hierzu wurden pro Platte 5 ml LB-Agar mit 15 µl IPTG-Stammlösung (1 mol/l) und 7,5 µl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) in eine leere Petrischale gegossen. Nach Erkalten des LB-Agars wurde darauf eine sterile, undurchlässige Folie gelegt. Diese Folien wurden mit größerem Durchmesser als die Petrischalen aus dampfsterilisierbaren Entsorgungsbeuteln (Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe) geschnitten und für 1 h in einer Sterilbank mit UV sterilisiert. Auf die Folienschicht wurden 10 ml LB-Top-Agar mit 15 µl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) und 120 µl hitzeinaktivierte *Listeria* Zellen (3.1.6) gegossen (Schema zu Folienlyseplatten 4.1.4.2).

Folienlyseplatten mit pH6 enthielten zusätzlich in der unteren LB-Agar Schicht 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 6 und in der oberen Schicht LB-Top-Agar pH 6 mit 10 mM Natriumphosphatpuffer.

Auf die trockenen Folienlyseplatten wurden Transformationsansätze plattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit Hilfe von sterilen Kanülen wurde die Folie an ca. 10 Stellen zwischen den Kolonien perforiert. Nach 6 h Inkubation der Platten bei 30°C und anschließend ÜN Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten bei 4°C gelagert. Während und nach den einzelnen Inkubationsschritten (vor Induktion sowie nach 3 h 30°C, 6 h 30°C, ÜN RT und mehrtägiger Lagerung bei 4°C) wurden die Platten auf Lysehofbildung analysiert und jeweils die Kolonien mit Lysehöfen gepickt und das zeitliche Auftreten dokumentiert.

3.5.3 Flüssiglysetest mit Zellaufschluss im ELISA

Die Anzucht der zu testenden Klone erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten mit 2 ml Fassungsvermögen (Nunc GmbH, Wiesbaden). In jeder Vertiefung wurde 1 ml LB-Medium nach Zugabe von 150 µg/ml Ampicillin mit einem Klon angeimpft und bei Raumtemperatur 5 h kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur mit 1 mM IPTG. Durch Zentrifugation (Multifuge, 30 min, 3500 rpm, RT) wurden die Zellen in der Mikrotiterplatte geerntet. Nach Verwerfen der Überstände wurden die Zellpellets mit 100 µl B-Per Aufschlussmischung (*Bacterial Protein Extraction Reagent*, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; Aufschlussmischung: B-Per II Reagenz mit PBST pH 8 im Verhältnis 1 zu 2 vermischt, 1 mM MgCl₂ und 1 µg/ml DNase) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte intensives Vortexen. Durch Zentrifugation (Multifuge, 30 min, 3700 rpm, RT) wurden unlösliche Zellbestandteile pelletiert, die Überstände wurden für weitere Verwendung in Mikrotiterplatten (aus Polystyrol mit 300 µl Vertiefungen, Nunc GmbH, Wiesbaden) überführt. Als Kontrolle wurden je 15 µl der Überstände mit 5 µl SDS-Probenpuffer für SDS-Gel-Analyse (3.4.2) versetzt.

Messung bei pH 6

Pro Vertiefung wurden 185 µl hitzeinaktivierte Zellen von *Listeria monocytogenes* ProCC S1095 in 25 mM Natriumphosphat pH6, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 mit einer OD₆₀₀ von 1 in eine 96 Well-Platte (aus Polystyrol mit 300 µl Vertiefungen, Nunc GmbH, Wiesbaden) vorgelegt. Nach Zugabe von je 15 µl Überstand wurde unmittelbar die OD-Abnahme in einer kinetischen Messreihe (500 Zyklen zu je 10 Sekunden) im ELISA-Messgerät (Sunrise™ platerader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 620 nm und RT erfasst. Als Referenz diente die Zellsuspension ohne Zugabe von Überstand.

Messung in Gegenwart von EDTA

Pro Vertiefung wurden 92,5 µl EDTA haltiger Messpuffer (25 mM Natriumphosphat pH6, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 und je nach Messung 10 mM, 50 mM bzw. 150 mM EDTA) mit 15 µl Überstand vorgelegt. Nach 1 h Inkubation bei 4°C wurden 92,5 µl hitzeinaktivierte Zellen von ProCC S1095 in Messpuffer (25 mM Natriumphosphat pH6, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 und je nach Messung 10 mM, 50 mM bzw. 150 mM EDTA) mit einer OD₆₀₀ von 2 zugegeben. Danach wurde unmittelbar die OD-Abnahme in einer kinetischen Messreihe (500 Zyklen zu je 10 Sekunden) im ELISA-Messgerät (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei 620 nm und RT erfasst. Als Referenz diente die jeweilige Zellsuspension ohne Zugabe von Überstand.

Messung bei pH 5 und pH 4,5

Pro Vertiefung wurden 185 µl hitzeinaktivierte Zellen von ProCC S1095 in 25 mM Natriumacetat, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 mit pH 5 bzw. pH 4,5 mit einer OD₆₀₀ von 1 vorgelegt. Nach Zugabe von je 15 µl Überstand wurde unmittelbar die OD-Abnahme in einer kinetischen Messreihe (500 Zyklen zu je 10 Sekunden) im ELISA-Messgerät (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei 620 nm und RT erfasst. Als Referenz diente die Zellsuspension ohne Zugabe von Überstand.

3.5.4 Photometrischer Flüssiglysetest

Die Bestimmung der lytischen Aktivität von gereinigten, rekombinaten *Listeria*-lytischen Proteinen erfolgte über photometrischen Lysetest (modifiziert nach Loessner *et al.*, 1995). Die Assays wurden in 1,5 ml halbmikro Einweg-Küvetten (Brand GmbH + Co KG, Wertheim) im UV/VIS Spektrometer V650 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) bei 30°C mit dem Programm Parallel Kinetics Measurement (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) durchgeführt. Im entsprechenden Puffer wurden hitzeinaktivierte Zellen (3.1.6) auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Eine Verfolgung der OD-Abnahme erfolgte im 1 ml-Ansatz nach Zugabe von gereinigten *Listeria*-lytischen Proteinen. Falls nicht anders angegeben, wurde 1 µg/ml Protein eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym. Die Pufferbedingungen wurden für die biochemischen Charakterisierungen wie im Folgenden beschrieben variiert.

Konzentrationsreihe Protein

Getestet wurde in Puffer mit 20 mM NaH₂PO₄ pH 6, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 1 µg/ml DNase. Es wurden 6 Ansätze mit 0 µg, 0,039 µg, 0,156 µg, 0,625 µg, 2,5 µg und 10 µg Protein parallel gemessen. Für die Bestimmung der relativen enzymatischen Aktivität wurde der Lysekurvenabschnitt mit der größten Steigung über einen linearen Bereich betrachtet. Die absolute lytische Aktivität der Proteine wurde entsprechend der Definition bestimmt, dass

eine Unit (1 U) für die Menge an Endolysin steht, die in 1,0 ml einer Listeriensuspension der OD_{600} 0,8-1,2 eine Abnahme der Lichtstreuung um 0,01 pro Minute bewirkt.

pH-Reihe

Getestet wurde in Puffer mit 50 mM Natriumcitrat, 50 mM NaH_2PO_4 , 50 mM Borat und 100 mM NaCl, der jeweils auf pH 4,5, 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 und 9,5 eingestellt wurde.

Konzentrationsreihe NaCl

Für die Konzentrationsreihe mit NaCl wurde 20 mM NaH_2PO_4 pH 6 mit 0, 10, 50, 150, 250 und 500 mM NaCl verwendet.

Inkubation mit EDTA

Die Messung auf EDTA-Toleranz erfolgte in 20 mM NaH_2PO_4 pH 6, 100 mM NaCl mit 0, 1, 10, 25, 100 bzw. 250 mM EDTA. Vom zu testenden Protein wurden 2 µg in 100 µl der jeweiligen Puffer für 1 h bei 4°C inkubiert und danach mit 900 µl Zellsuspensionen auf OD-Abnahmen analysiert.

3.5.5 Minimale bakterizide Konzentration (MBC) bei pH 6

Die minimale bakterizide Konzentration (*minimum bactericidal concentration*, MBC) gibt die Konzentration einer Substanz an, bei der mindestens 3 Zehnerpotenzen von der Ausgangszellzahl reduziert werden, dies entspricht der Entfernung von 99,9 % der eingesetzten Zellen. Zur Bestimmung der MBC wurde zunächst 1 ml einer ÜN-Kultur der *Listeria* Teststämme mit 4 ml TB-Medium versetzt und für ca. 2 h bei 30°C rolliert (bei 180 rpm), bis eine OD_{600} von 1 erreicht war. Die Zellen wurden in MBC-Puffer pH 6 auf 10^5 Zellen/ml verdünnt (OD_{600} von 1 entspricht in etwa 10^9 cfu/ml). Zur Kontrolle wurden je 100 µl der Verdünnungen mit 10^2 und 10^3 cfu/ml auf LB-Agar plattiert, ÜN bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag durch Zählen der Einzelkolonien die Zellzahl überprüft.

Zu testende, sterilfiltrierte Proteine wurden in MBC-Puffer auf folgende Konzentrationen eingestellt: 200, 40, 8, 1,6, 0,32, 0,064, und 0,013 µg/ml. Jede Konzentration wurde in einer Doppelbestimmung getestet. Hierzu wurden 2,0 ml Reaktionsgefäße mit je 450 µl Zellsuspension (10^5 cfu/ml) befüllt und immer zwei davon mit 50 µl einer Protein-Vorverdünnung versetzt, so dass die Proteine um den Faktor 10 verdünnt wurden. Als Kontrolle wurde anstelle der Proteinlösung 50 µl MBC-Puffer pH 6 verwendet. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Proben stehend für 1 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden 100 µl der Ansätze sowie 1 zu 10 und 1 zu 100 Verdünnungen in MBC-Puffer pH 6 auf LB-Agar plattiert. Eine Auszählung der Kolonien erfolgte nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C.

3.5.6 Bakterizide Wirkung in Milch

Die Testung der bakteriziden Wirkung in Milch erfolgte analog zur Testung der MBC in Puffer bei pH 6 (3.5.5) mit herkömmlicher ultrahocherhitzter, homogenisierter Milch mit 1,5 % Fettanteil. Abweichend davon wurde in Milch ausgehend von den Proteinkonzentrationen 200 µg/ml, 8 µg/ml, 0,32 µg/ml und 0 µg/ml getestet und die Teststämme wurden in Milch und nicht in MBC-Puffer verdünnt. Zur Proteinkontrolle erfolgte parallel eine Testung in MBC-Puffer bei pH 6 ausgehend von 8 und 0 µg/ml Enzym. Zudem wurde die Mischung aus Protein mit Zellen für 3 h stehend bei 30°C inkubiert.

3.5.7 Minimale inhibitorische Konzentration (MIC)

Die minimale inhibitorische Konzentration (*minimum inhibitory concentration*, MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration an Wirkstoff, bei der sämtliches Bakterien-Wachstum und damit OD-Zunahme verhindert wird.

Zur Bestimmung wurde zunächst 1 ml einer ÜN-Kultur der *Listeria* Teststämme mit 4 ml TB-Medium versetzt und für ca. 2 h bei 30°C rolliert (bei 180 rpm), bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht war. Die Zellen wurden in TB pH 6 auf 10² Zellen/ml verdünnt (OD₆₀₀ von 1 entspricht in etwa 10⁹ Zellen/ml). Zur Kontrolle wurden je 100 µl der Verdünnungen mit 10² und 10³ Zellen/ml auf LB-Agar plattiert, ÜN bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag durch Zählen der Einzelkolonien die Zellzahl überprüft.

Für die Ermittlung der MIC wurden in sterilen 96-Well Platten mit Deckel (Nuncclon Δ, Nunc GmbH, Wiesbaden) Doppelbestimmungen angesetzt, dafür wurden pro Teststamm 46 Wells mit 100 µl der entsprechenden Listerien-Suspension mit 10² Zellen/ml befüllt, wodurch ca. 10 Zellen pro Well vorliegen. Zwei weitere Wells wurden mit 100 µl TB-Medium pH 6 befüllt und als Negativkontrolle nicht in die folgende Durchführung miteinbezogen.

Die sterilfiltrierten Proteine mit potentieller inhibitorischer Wirkung wurden in TB-Medium verdünnt, so dass eine Konzentration von 0,25 oder 0,125 µg/ml vorlag. Je 100 µl der Proteinlösung wurden auf 2 Wells mit Listerienzellen pipetiert, nach Mischen durch Auf- und Abpipetieren wurden diesen Wells 100 µl entnommen und in die beiden danebenliegenden Wells pipetiert, so dass pro Pipetierschritt eine 1 zu 2-Verdünnung erfolgte. Dies wurde für insgesamt 21 Verdünnungsstufen durchgeführt, so dass als Wachstumskontrolle eine Doppelbestimmung ohne Protein vorlag. Die resultierende Verdünnung der Listerien-Konzentration ist rechnerisch bereits nach zwei Verdünnungs-Schritten vernachlässigbar.

Nach stehender Inkubation bei 30°C für 24 h wurde die OD bei einer Wellenlänge von 620 nm bei RT im ELISA-Reader (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) gemessen.

3.5.8 Inhibition von Listerienwachstum mit induziertem *E. coli*

Zellaufschluss-Überstand

Jeweils 1 ml einer ÜN-Kultur der *Listeria* Teststämme ProCC S1095 und ProCC S776 wurde mit 4 ml TB-Medium versetzt und für ca. 2 h bei 30°C rolliert (bei 180 rpm), bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht wurde. Die Zellen wurden in TB pH 6 auf 10⁵ bzw. 10² Zellen/ml verdünnt (OD₆₀₀ von 1 entspricht in etwa 10⁹ cfu/ml). Zur Kontrolle wurden je 100 µl der Verdünnungen mit 10² und 10³ Zellen/ml auf LB-Agar plattiert, ÜN bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag durch Zählen der Einzelkolonien die Zellzahl überprüft.

Zu testende, plasmidtragende *E. coli*-Stämme wurden jeweils in zweimal 1 ml-LB Medium mit 150 µg/ml Ampicillin in 2 ml Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur angezogen. Nach 5 h erfolgte mit 1 mM IPTG die Induktion der Proteinexpression über Nacht bei Raumtemperatur. Daneben wurden zudem zwei nicht induzierte *E. coli*-Kulturen mitgeführt. Nach Vereinigung der Doppelansätze wurden die Zellen geerntet (Biofuge Fresco, 13000 rpm, RT, 10 min), die Pellets in 400 µl PBST pH 8 resuspendiert und über Ultraschall (Amplitude 65 %, 20 Sekunden) unter Kühlung aufgeschlossen. Nach Abtrennung der festen Zellbestandteile (Zentrifugation in Biofuge Fresco, 13000 rpm, 4°C, 5 min) wurden die Überstände sterilfiltriert.

In sterilen 96-Well Platten mit Deckel (Nunc GmbH, Wiesbaden) wurden für jeden *Listeria* Teststamm folgende Doppelbestimmungen angesetzt: Je Zellaufschluss-Überstand 2 Wells mit 180 µl Zellsuspension mit 10⁵ bzw. 10² Zellen/ml und 20 µl Zellaufschluss sowie 2 Wells mit 180 µl TB pH 6 mit 20 µl Zellaufschluss. Daneben wurde eine Versuchsreihe mit Zellaufschluss-Überstand von nicht induziertem *E. coli* durchgeführt sowie eine Reihe mit PBST statt Zellaufschluss-Überstand.

Nach stehender Inkubation bei 30°C wurde nach 24, 48 und 72 h die OD im ELISA-Reader (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

3.5.9 Zellbindetestung mittels ELISA

3.5.9.1 Zell-ELISA

Im Zell-ELISA wurden Zellen auf Mikrotiterplatten (MaxiSorp U96, Nunc GmbH, Wiesbaden) immobilisiert. Diese Zellen wurden mit den jeweiligen CBDs mit His-Markierung inkubiert und anschließend nicht gebundenes Protein abgewaschen. An die His-Markierung der CBDs wurde His-Antikörper-POD-Konjugat (MicroCoat GmbH, Bernried) gebunden. Nach Entfernung von nicht gebundenem Konjugat wurde ein Substrat der POD zugegeben, dessen Umsatz nach festgesetzter Zeit bestimmt wurde.

Der Zell-ELISA wurde in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Zellen einer Bakterien-Kultur aus der exponentiellen Phase wurden in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit jeweils 100 µl der Bakterien-Suspension mit 10^9 cfu/ml in PBS durch Inkubation für 1 h bei RT unter schütteln beschichtet. Nach der Beschichtung wurde die Zellsuspension entfernt, je Vertiefung 200 µl PBS auf die Zellen gegeben und die Waschlösung abpipettiert. Dieser Waschschriff wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nicht von Bakterien bedeckte Stellen auf der Mikrotiterplatte wurden nun mit 150 µl Blockierungslösung (PBST, 0,5 % (w/v) BSA), pH 7,2 für 1 h bei RT blockiert. Zur Bestimmung der eingesetzten Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension seriell in PBS verdünnt und jeweils 100 µl der Verdünnungsstufe 10^3 und 10^2 ausplattiert. His-Antikörper POD-Konjugat wurde mit 1 µg/ml und im molaren Verhältnis von 1 zu 2 mit gereinigter (3.3.3.4), His-markierter CBD für 1 h bei RT in PBST mit 0,5 % (w/v) BSA vorinkubiert. Nach Blockierung und drei Waschschriffen mit 200 µl PBST wurde je Vertiefung 100 µl der Mischung von Antikörper und CBD auf die Zellen gegeben und für 1 h im Thermomixer (RT, 500 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurden erneut zwei Waschschriffen mit 200 µl PBST und einer mit 200 µl PBS durchgeführt. Anschließend wurde in die Vertiefungen 100 µl ABTS Färbelösung auf die Zellen gegeben. Nach deutlicher Farbentwicklung wurde die Absorption im ELISA-Messgerät (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei 405/620 nm gemessen.

3.5.9.2 Sandwich-ELISA

Im Sandwich-ELISA wurden die His-markierten CBDs auf nickelbeschichtete 96-Well Mikrotiterplatten (MicroCoat GmbH, Bernried) immobilisiert. Über die CBDs sollten Listerien-Zellen gebunden werden, an welche wiederum JS-CBD511 bindet (u. a. bekannt aus Arbeiten der Profos AG, heute Hyglos GmbH, Daten nicht gezeigt). Die JS-Markierung ist eine Biotinylierungsdomäne der Oxalacetatdecarboxylase aus *Klebsiella* und wird während der Proteinexpression in *E. coli* biotinyliert. Sie kann mit *Strep-Tactin* AP Konjugat (*Strep-Tactin* Alkalische Phosphatase Konjugat, IBA GmbH, Göttingen) und chromogenen Substratumsatz der Phosphatase am gebundenen Konjugat nachgewiesen werden.

Diese Methode wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Immobilisierung wurden jeweils 100 µl der C-terminal His-markierten CBDs mit einer Konzentration von 10 µg/ml in Proteinverdünnungspuffer in die Vertiefungen von nickelbeschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die EDTA-Konzentration (EDTA im Lagerpuffer der CBDs) 0,5 mM nicht überstieg. Nach 30 min Inkubation bei RT und 500 rpm im Thermomixer wurde die Proteinlösung abpipettiert und dreimal mit 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen. Nun wurde das gebundene Protein mit 100 µl einer 10^8 cfu/ml *Listeria* Zellsuspension

in ELISA-Waschpuffer für 1,5 h im Thermomixer (RT, 500 rpm) inkubiert. Danach wurde dreimal gewaschen.

Strep-Tactin AP Konjugat wurde 1:5000 verdünnt eingesetzt und im molaren Verhältnis von 1 zu 4 mit JS-CBD511 (entspricht 0,2 µg/ml, bereitgestellt von Hyglos GmbH) in Proteinverdünnungspuffer für 1 h bei RT vorinkubiert. Davon wurden jeweils 100 µl in die Vertiefungen gegeben und die Platten für 30 min im Thermomixer (RT, 500 rpm) inkubiert. Nach vier Waschungen mit ELISA-Waschpuffer wurden 100 µl pNPP-Substratlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und bei RT inkubiert. Nach deutlicher Farbentwicklung (ca. 30 min) wurde die Absorption im ELISA-Messgerät (Sunrise™ platereader, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei 405/620 nm gemessen.

4 Ergebnisse

Es sollte eine Klonierungsmethode entworfen werden, die es erlaubt, beliebige Domänen zufällig zu kombinieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten so zellwandhydrolytische Enzyme aus maximal drei Domänen hergestellt werden, wobei jede Domäne an jeder Position, also mittig, N- oder C-terminal und auch mehr als einmal im Protein vorkommen kann. Diese Methode sollte zudem die Zahl der zu kombinierenden Domänen nicht begrenzen. Anschließend sollten die resultierenden Proteine auf gewünschte Eigenschaften zur Anwendung im Lebensmittel *gescreent* werden (Abbildung 4.1). Ausgewählte Kandidaten sollten nach Proteinreinigung auf Aktivität und Stabilität untersucht werden.

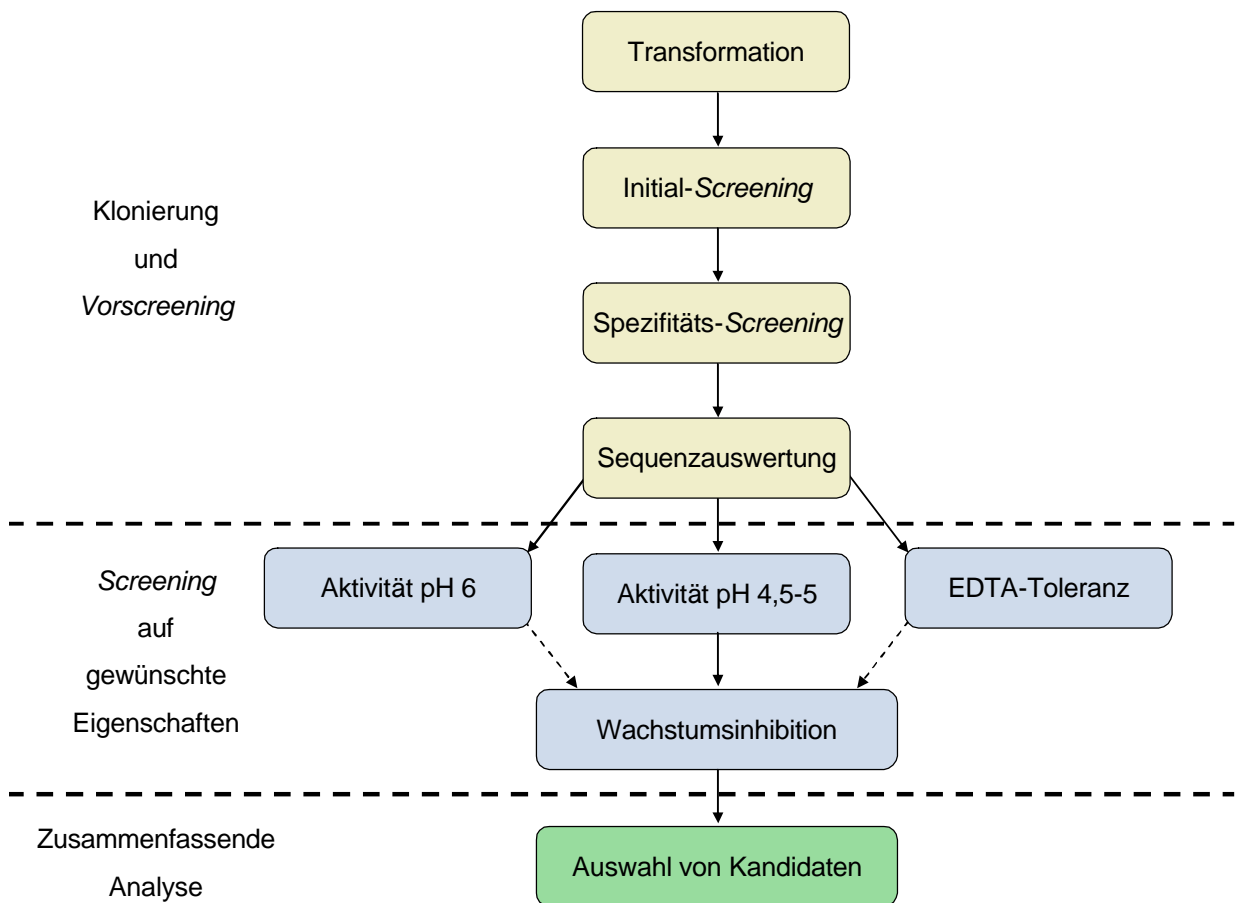


Abbildung 4.1: Übersicht der geplanten Vorgehensweise von Klonierung und *Vorscreening* (beige), *Screening* auf gewünschte Eigenschaften (blau) und zusammenfassender Analyse (grün).

4.1 Konzeption und Validierung der Klonierungsstrategie

Die zufällige Kombination von Domänen soll durch sukzessive Ligation von domänenkodierenden DNA-Fragmenten an der Festphase erfolgen. Dabei ist die Domäne am 5'-Terminus an Position 1, die 3' anligierte Domäne an Position 2 usw. Da sich die Restriktionsschnittstellen zwischen den Positionen unterscheiden, werden die Domänen gerichtet anligiert, d. h. ein 3'-Ende sollte immer mit einem 5'-Ende verbunden werden, um *nonsense*-Ligationen am wachsenden Nukleotidstrang zu verhindern. In dieser Arbeit wurde die Konstruktion von 2- und 3-Domänenproteinen verfolgt.

Die Domänenabschnitte werden derart gewählt, dass C-terminal eine Linkersequenz vorhanden ist, die nicht zur eigentlichen Aktivität der Domäne beiträgt. Dies ist im Falle von natürlich vorkommend N-terminalen Domänen der wildtypische Linker, im Falle von natürlich vorkommend C-terminalen Domänen die synthetische Linkersequenz GGSKPGGTPK GGSKP. Die Glycin-, Serin und Threoninreste der Linkersequenz sollen Flexibilität ermöglichen. Die positiv geladenen Lysinreste sind wie die polaren Aminosäuren Serin und Threonin charakteristisch für die prognostizierten Linker von *Listeria*-Endolysinen (Schmelcher *et al.*, 2010) und erlauben Exponiertheit zum Lösungsmittel. Prolinreste folgen unmittelbar den Lysinresten und brechen zum einen unerwünschte Sekundärstrukturen auf, zum anderen verhindern sie die proteolytische Spaltung hinter Lysin, beispielsweise durch Trypsin. Zudem wurden prolinreiche, repetitive Sequenzen für die putativen Linkerregionen von Ply511 und PlyP40 beschrieben (Schmelcher *et al.*, 2010).

Die codierenden Gene der Domänen werden zunächst einheitlich ohne Stop-Codon in den Vektor pET14b kloniert. Über PCR-Primer, die am Vektor und an den bei allen Domänen identisch generierten Insertgrenzen *annealen*, können hieraus die Fragmente mit positionsspezifischen Restriktionsschnittstellen amplifiziert werden (Abbildung 4.2).

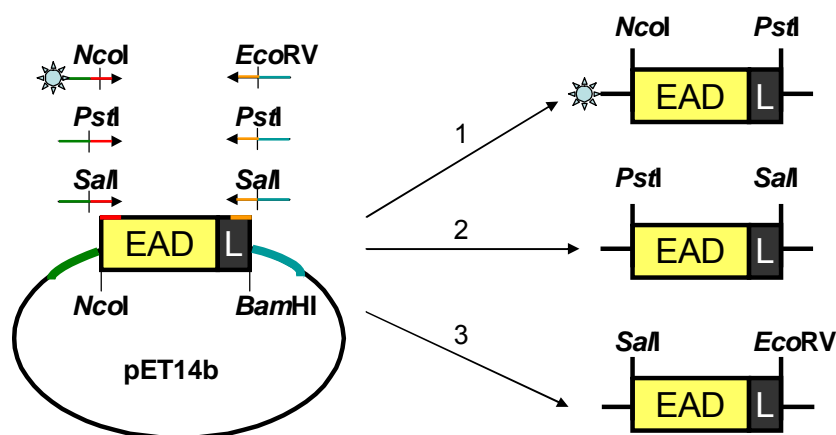


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Amplifikation der Domänenabschnitte mit positionsspezifischen Primern. Die Primer *annealen* an den einheitlichen Vektor- und Domänen-grenzen. Je Position wird ein Primerpaar mit unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen benötigt. Der 5'-Primer für Domänenposition 1 bringt einen Biotinrest ein.

Fragmente für Position 1 werden dabei 5' mit einem biotinhaltigen Primer amplifiziert, wobei das Biotin durch Restriktionsverdau abgetrennt werden kann. DNA-Fragmente der Position 1 werden am 3'-Ende, Fragmente für andere Positionen am 5'-Ende mit dem jeweiligen Restriktionsenzym verdaut. Anschließend werden alle Fragmente für dieselbe Position vereinigt. Die Fraktionen für Position 1 und 2 werden in die erste Ligation eingesetzt. Durch Zugabe von Streptavidin beschichteten, magnetischen Partikeln und Einsatz eines Magneten werden alle Fragmente mit einer biotinylierten Domäne fixiert, wodurch Waschen zwischen den Schritten möglich wird. Für weitere Ligationen wird jeweils das 3'-Ende der höchsten Position verdaut und der Fragmentpool für die nächste Position anligiert (Abbildung 4.3 A). Zwischen Ligationen und Restriktionen wird jeweils gewaschen um unerwünschte DNA sowie unproduktive Ligationsprodukte zu entfernen (Abbildung 4.3 B). Die erhaltenen Konstrukte werden für das anschließende *Screening* in einen induzierbaren Selektionsvektor kloniert und in *E. coli* transformiert.

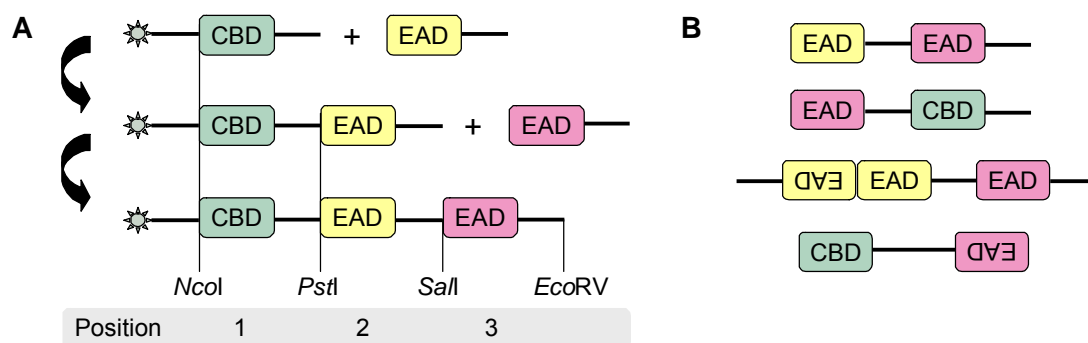


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der sukzessiven Ligation von DNA-Fragmenten. A: Die Ligrations-Schritte beginnen mit den Fraktionen von Position 1 und 2. Danach können 3' weitere Fragmente anligiert werden. Der Biotin-tag an Position 1 ermöglicht Waschschritte zwischen den Ligationen. B: Die aufeinander folgenden Ligrations-Schritte können zu unproduktiven Konstrukten führen, die entfernt werden. Linker sind als schwarze Balken dargestellt.

4.1.1 Auswahl der Domänen

4.1.1.1 Domänenanzahl

Entscheidend für die Auswahl der Anzahl der zu kombinierenden Domänen war der damit verbundene *Screening*-Aufwand. Da der erste *Screening*-Schritt eine optische Auswertung auf Lysehofbildung der plattierten *E. coli* Transformanten umfasst, limitiert er die zu erlaubende Anzahl an Varianten. Tabelle 4.1 zeigt die Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten für die Erstellung von 2- und 3-Domänenproteinen, wobei jede Domäne für jede Position zugelassen ist.

Tabelle 4.1: Kombinationsmöglichkeiten in 2- und 3-Domänenproteinen in Abhängigkeit der eingesetzten Domänenanzahl. Innerhalb dieser Arbeit sollten maximal 20 Domänen eingesetzt werden.

Anzahl der Domänen	2-Domänen-Proteine	3-Domänen-Proteine	Gesamt
2	4	8	12
3	9	27	36
4	16	64	80
5	25	125	150
6	36	216	252
...
18	324	5832	6156
19	361	6859	7220
20	400	8000	8400
21	441	9261	9702
22	484	10648	11132
23	529	12167	12696
24	576	13824	14400
25	625	15625	16250

Zu berücksichtigen ist, dass in dieser Kalkulation auch Domänenkombinationen ohne EAD und CBD enthalten sind. Hierbei handelt es sich um nicht funktionsfähige Konstrukte. So besitzt beispielsweise ein Ligationsprodukt aus 3 CBDs keine lytische Aktivität. Trotzdem führen auch derartige Konstrukte im *Initial-Screening* zu Kolonien und tragen zum Arbeitsaufwand bei. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine maximale Zahl von 20 Domänen festgelegt.

4.1.1.2 Auswahl der Zellbindedomänen

In die Genbank sollten Zellbindedomänen aus *Listeria*-Endolysinen eingesetzt werden. Das Bindeverhalten der CBDs definiert maßgeblich das Lysespektrum der Endolysine. Die Bindung von CBDs aus *Listeria*-Endolysinen an verschiedene *Listerien*-Serovare wurde im Detail untersucht (Loessner *et al.*, 2002; Schmelcher *et al.*, 2010). Bisher wurden keine Daten zu CBDPhiLM4 und CBDB054 veröffentlicht, es ist jedoch zu vermuten, dass diese Zellbindedomänen ein sehr ähnliches Bindespektrum haben wie CBD500, da CBDPhiLM4 91 % und CBDB054 85 % homologe Aminosäuren mit CBD500 aufweisen. Für CBDPhiLM4 konnte zudem gezeigt werden, dass sie an *Listerien* mit sv 4b, 5 und 6a bindet, an *Listerien* mit sv 1/2b, 3a und 7 hingegen nicht (Daten Profos AG, heute Hyglos GmbH, unveröffentlicht).

Abbildung 4.4 gibt einen Überblick über die Domänenmotive und Verwandtschaften bekannter *Listerien*-Endolysine sowie die erkannten Serovare durch die jeweiligen Zellbindedomänen.

Die Zellbindedomänen gliedern sich zum Teil in Subdomänen. Bei PlyP40 und PlyB025 finden sich dabei bekannte Domänenmotive, nämlich SH3_3 und LysM. Diese Motive sind in der Pfam-Datenbank (*protein families*, Finn *et al.*, 2008) erfasst mit pfam08239 für SH3_3 und pfam01476 für LysM. SH3_3 gehört zu einer Gruppe bakterieller SH3 Domänen (SH3b, bakterielle src-Homologie 3), welche möglicherweise an Kohlenhydrate oder Polyprolin-Bereiche binden und sind bekannt als Motive in CBDs von Zellwand-Hydrolasen (Humann und Lenz, 2009). Domänen mit LysM (Lysin Motive) vermitteln die direkte Bindung an Peptidoglykan. Sie bestehen aus ca. 40 Aminosäuren und liegen in Zellwand-assoziierten Proteinen in 1 bis mehreren Wiederholungen vor, dabei befinden sie sich C-terminal von Lysozymen und Glucosaminidasen bzw. N-terminal von Peptidasen (Buist *et al.*, 2008).

Endolysin	EAD	CBD	sv 1/2 a b c	3 a b c	4 a b c d e	5	6 a b
PlyP40	GH 25	SH3_3 LysM	7/7	4/4	6/6	3/3	3/3
Ply511	Amidase 2	CBD CBD	7/7	4/4	6/6	3/3	3/3
PlyB025	EAD	SH3_3 SH3_3	-	-	1/6	2/3	1/3
Ply118	EAD	CBD CBD	7/7	4/4	-	-	-
Ply006	VanY	---	7/7	2/4	1/6	-	-
PlyP35	VanY	CBD	6/7	4/4	4/6	2/3	2/3
PhiLM4	VanY	CBD					
Ply500	VanY	CBD	-	-	6/6	3/3	3/3
PlyPSA	Amidase 3	CBD	-	-	6/6	3/3	3/3
PlyB054	Amidase 3	CBD					

Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Verwandtschaft beschriebener Endolysine aus *Listeria*-Phagen mit Bindung der korrespondierenden CBDs an Listerien-Serovare 1 bis 6. Modifiziert nach Schmelcher *et al.*, 2010. Striche signalisieren Sequenzhomologie. Falls vorhanden wurden in BLAST aufgezeigte Domänenmotive angegeben (GH25: Glykosylhydrolase 25, VanY: benannt nach Vancomycin induzierbarer D,D-Carboxypeptidase von *Enterococcus faecium* BM4147). Die Linker sind durch graue Balken dargestellt. Bindung an nur manche Listerien eines Serovars (Subserovare a bis e) ist rot markiert, wurde keine Bindung beobachtet steht „-“, leere Felder: nicht bestimmt.

Für die Erstellung der Domänenkombinationen wurden CBD511 und CBDP40 gewählt, die in der Testung ausnahmslos alle Listerien-Serovare erkannten sowie CBD500, CBDB025, CBDP35 und CBD006, die unterschiedliche Gruppen von Listerien-Serovaren binden. CBD500 erkannte im Test alle getesteten Stämme mit sv 4, 5 und 6, CBDB025 zeigte Bindung an einzelnen Vertretern, nämlich sv 4a, 6b und teilweise sv 5. CBDP35 band an den Großteil aller Listerien, so wurden alle Stämme mit sv 3, fast alle mit sv 1/2, 4, 5 und 6

gebunden, nicht jedoch Stämme mit sv 4b und *L. innocua* sv 6a. CBD006 wies Bindung an sämtliche Listerien von sv 1/2 und auch Vertreter von Serovaren 3a, 3c und 4a auf (Schmelcher *et al.*, 2010).

Wie gezeigt wurde, bleiben in manchen CBD-Kombinationen Bindeeigenschaften der einzelnen Zellbindedomänen erhalten, was zu erweiterten Bindespektren führt (Schmelcher, 2007; Bretfeld, 2009). Fusionsproteine mit einer EAD und CBDP35 oder CBD006 und CBD500 sind daher möglicherweise dazu in der Lage, nahezu alle Serovare zu lysieren. Da die Bindeaffinität durch CBD-Duplikation erhöht werden kann (Schmelcher, 2007) ist zudem nicht auszuschließen, dass gebildete Zellwand-Hydrolasen mit mehreren Zellbindedomänen verbesserte Effektivitäten unter den hier getesteten Bedingungen besitzen.

Erst während dieser Arbeit wurde das bisher unbekannte Wildtyp-Endolysin PlyP825 identifiziert, weshalb die Domänen dieses Proteins nicht in die Genbank eingesetzt werden konnten. Die Domänen dieses Endolysins haben Homologien zu EAD500 und CBD511 (Abbildung 4.5). Die Bestimmung des Lysespektrums von PlyP825 über Lysehofplatten mit 22 lebenden Listerien (3.5.1) mit Serovaren 1-6 (ProCC S1095, 995, 1153, 1002, 2867, 1003, 1135, 1154, 2991, 2974, 2975, 776, 2919, 1144, 2920, 857, 1150, 1164, 1014, 1147, 773 und 1754) zeigte, dass sämtliche Listerien-Serovare lysiert wurden. PlyP825 sollte daher zusätzlich zu PlyP40 und Ply511 während der Proteincharakterisierung als Vergleichsprotein für die später *gescreenten* Kandidaten herangezogen werden.

Endolysin	EAD	CBD	Sequenzvergleich
Ply500	VanY	CBD	<u>EAD</u> 75 % identische bzw. 86 % homologe Reste
PlyP825	VanY	CBD CBD	
Ply511	Amidase 2	CBD CBD	<u>CBD</u> 62 % identische bzw. 73 % homologe Reste

Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Homologien zwischen EADP825 und EAD500 sowie CBDP825 und CBD511. VanY: benannt nach Vancomycin induzierbarer D,D-Carboxypeptidase von *Enterococcus faecium* BM4147.

4.1.1.3 Auswahl der enzymatisch aktiven Domänen

Für die Zufallskombinationen wurden nicht nur enzymatisch aktive Domänen aus Phagen-Endolysinen berücksichtigt, sondern auch aus lytischen Phagenschwanzproteinen, bakteriellen Autolysinen und Bakteriozinen. Es wurde lediglich darauf geachtet, keine (putativen) Carboxypeptidasen zu verwenden. Diese hydrolysieren die Bindungen an den Termini der Stammpeptide und führen daher nicht unmittelbar zur Zerstörung der Zellhülle.

Aus den bekannten Endolysinen gegen *Listeria* sollten möglichst unterschiedliche EADs verwendet werden, weshalb von homologen Domänen jeweils nur ein Vertreter gewählt wurde (Homologieschema Abbildung 4.4). Somit wurden EADP40, EAD511, EADP35, EAD500, EADPSA und EADB054 ausgesucht.

Als Quellen für EADs, die nicht aus Endolysinen stammen, wurden die Listerien-Autolysine MurA, IspC, das Staphylococcen-Autolysin Sle1, das lytische Phagenschwanzprotein Gp29 des *Listeria*-Phagen P100 sowie das Bakteriozin Cellosyl (bzw. Mutanolysin) gewählt. Die Domänenstrukturen dieser Enzyme sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

Die enzymatisch aktiven Domänen der *Listeria*-Autolysine MurA und IspC liegen N-terminal mit Sequenzmotiven von Lysozym 2 vor. Als Zellbindemotive wurden in MurA LysM-Domänen erkannt, in IspC konnten nach händischer Sequenzanalyse GW-Module aufgedeckt werden. Hierbei handelt es sich um tandemartig wiederholte Motive von ca. 80 Aminosäuren, die mit dem Dipeptid Glycin-Tryptophan (GW) beginnen. GW-Module werden mit nicht kovalenter Bindung an Lipoteichonsäuren assoziiert und kommen nicht nur in Peptidoglykan-Hydrolasen vor (z. B. auch Internalin B) (Bierne und Cossart, 2007; Vollmer *et al.*, 2008-B). Von beiden Proteinen wurde die Hydrolyse von Peptidoglykan des Typ A1 γ in der Literatur beschrieben (Carroll *et al.*, 2003; Wang und Lin, 2007).

In dem Staphylococcen-Autolysin Sle1 befindet sich die EAD am C-Terminus mit einem CHAP Domänenmotiv, Bindung an die Zelle von Sle1 erfolgt über die N-terminale CBD bestehend aus 3 LysM-Domänen. Von Sle1 konnte auf Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus* eine lytische Aktivität gezeigt werden und die Spezifität der Amidbindung zwischen dem Glykanrückgrat und dem Stammpeptid zugewiesen werden, die auch im Listerien-Peptidoglykan vorhanden ist (Kajimura *et al.*, 2005).

Auch bei dem Phagenschwanzprotein Gp29 aus dem *Listeria*-Phagen P100 liegt die enzymatisch aktive Domäne am C-Terminus, hier wurde ein NlpC/p60-Motiv erkannt. Die hydrolytische Wirkung von Gp29 sowie die seiner enzymatisch aktiven Domäne EADgp29 auf Listerien-Peptidoglykan wurde in Arbeiten der Profos AG (heute Hyglos GmbH) gezeigt (Daten nicht veröffentlicht).

Die Aminosäuresequenz des Bakteriozins Cellosyl aus *Streptomyces coelicolor* ist zu über 99 % identisch mit der des Bakteriozins Mutanolysin aus *Streptomyces globisporus*. Mutanolysin wird in *Streptomyces*, einem grampositiven Bakterium, mit einem 77 Aminosäure langen Leaderpeptid synthetisiert (Lichenstein *et al.*, 1990). Dieses Leaderpeptid besteht aus Signalsequenz und Propeptid, die im Laufe der Prozessierung abgetrennt werden. Cellosyl hat eine Lysozym-Domäne (Motiv Glykosylhydrolase 25) und keine CBD. Im Gegensatz zu anderen Lysozymen ist Cellosyl auch gegen O-acetyliertes Peptidoglykan aktiv und seine Wirkung gegen *Listeria* wurde beschrieben (Fliss *et al.*, 1991; Rau *et al.*, 2001; Nakimbugwe *et al.*, 2006).

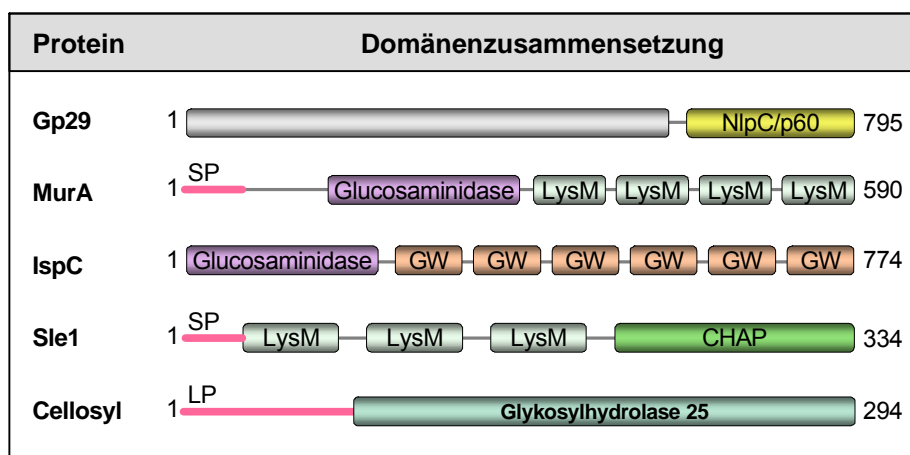


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von Gp29 aus P100, MurA, IspC, Sle1 und Cellosyl. Angegeben sind in BLAST aufgezeigte Domänenmotive (CHAP: Cystein Histidin abhängige Amidohydrolasen/Peptidasen). GW-Module in IspC wurden über Sequenzanalyse ermittelt. Linker sind durch graue Balken dargestellt. Proteingröße ist in Aminosäuren angegeben, grau: keine Domäne erkannt, SP: Signalpeptid, LP: Leaderpeptid.

Nur von EAD511, EAD500 (Loessner *et al.*, 1995), Sle1 (Kajimura *et al.*, 2005) und Cellosyl (Rau *et al.*, 2001) wurden die Spezifitäten bisher experimentell bestätigt. Die Spezifitäten der anderen enzymatisch aktiven Domänen wurden über Motivsuche abgeleitet und werden daher mit putativ bezeichnet. Diese Vorgehensweise ist laut Firczuk und Bochtler (2007) durchaus zulässig. So gibt es zwar unter den Amidasen und Peptidasen Enzyme, die dieselbe Faltung besitzen und unterschiedliche Bindungen schneiden, und Enzyme, die unterschiedliche Faltungen aufweisen und dieselbe Spezifität besitzen. Jedoch können auf der Basis von vorhandenen biochemischen und strukturellen Informationen die Spezifitäten von hypothetischen Zellwand-Hydrolasen über Sequenzinformation meist vorhergesagt werden.

So schlussfolgern Layec und Mitarbeiter (2008) nach Auswertung von experimentellen Daten aus der Literatur und Sequenzvergleichen, dass die Domänen CHAP (Cystein Histidin abhängige Amidohydrolasen/Peptidasen) und NlpC/p60, welche beide zur CHAP-Superfamilie gehören, unterschiedliche Bindungen im PNG hydrolysieren. Demnach sind innerhalb der Firmicutes CHAP-Proteine N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen oder Endopeptidasen und NlpC/p60-Enzyme sind D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure Peptidasen (in Peptidoglykan Typ A1γ) (Schema der Spezifitäten in Abbildung 1.4, S. 10).

Tabelle 4.2 zeigt die ausgewählten enzymatisch aktiven Domänen in Zusammenhang mit den Ausgangsproteinen, den Domänenmotiven sowie den hydrolysierten oder vermutlich hydrolysierten Bindungen im Peptidoglykan.

Da sich unter den bisher bekannten *Listeria*-Endolysinen nur (putative) Amidasen, Peptidasen und ein putatives Lysozym finden, können durch Kombination mit EADgp29, MurA und IspC möglicherweise weitere Bindungen im Peptidoglykan adressiert werden.

Zudem kann mit den EADs, die nicht aus Endolysinen stammen, die Kombination von EADs aus lytischen Phagenschwanzproteinen, Bakteriozinen und Autolysinen mit Endolysin-CBDs getestet werden.

Tabelle 4.2: Ausgewählte EADs für die Domänenkombination. Aufgelistet sind Domänenursprung (Listerien-Phage bzw. Bakterium), Domänenmotiv mit zugehöriger pfam-Datenbank-Nummer und putative oder bestätigte Spezifität mit hydrolysierte Bindung. Das Domänenmotiv wurde über BLAST ermittelt. Angegeben sind die pdb-Nummern von PlyPSA (Korndörfer *et al.*, 2006), EAD500 (Korndörfer *et al.*, 2008) und Cellosyl (Rau *et al.*, 2001). GH25: Glykosylhydrolase 25, CHAP: Cystein Histidin abhängige Amidohydrolasen/Peptidasen, VanY: benannt nach Vancomycin induzierbarer D,D-Carboxypeptidase von *Enterococcus faecium* BM4147. *: Zink im aktiven Zentrum, (*):vermutlich Zink im aktiven Zentrum, #: Disulfidbrücke.

Domäne	Quelle	Domänen-motiv	Spezifität, hydrolysierte Bindung
EAD511	Endolysin Ply511 aus A511	Amidase 2 pfam01510	Amidase(*), D-Lac-L-Ala
EADB054	Endolysin PlyB054 aus B054	Amidase 3 pfam01520	putative Amidase(*), D-Lac-L-Ala
EADPSA	Endolysin PlyPSA (pdb 1xov) aus PSA	Amidase 3 pfam01520	putative Amidase*, D-Lac-L-Ala
Sle1	Autolysin von <i>Staphylococcus aureus</i> USA 300	CHAP pfam05257	Amidase, D-Lac-L-Ala
EAD500	Endolysin Ply500 (pdb 2vo9) aus A500	VanY pfam02557	Peptidase*, L-Ala-D-Glu
EADP35	Endolysin PlyP35 aus P35	VanY pfam02557	putative Peptidase(*), L-Ala-D-Glu
EADgp29	Lytisches Phagenschwanzprotein Gp29 aus P100	NipC/p60 pfam00877	putative Peptidase, D-Glu-m-Dap
EADP40	Endolysin PlyP40 aus P40	GH 25 pfam01183	putatives Lysozym, MurNac-GlcNac
Cellosyl	Bakteriozin von <i>Streptomyces coelicolor</i> Müller (pdb 1jfx)	GH 25 pfam01183	Lysozym [#] , MurNac-GlcNac
MurA	Autolysin von <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe sv 1/2a	Lysozym 2 pfam01832	putative Glucosaminidase, GlcNac-MurNac
IspC	Autolysin von <i>Listeria monocytogenes</i> LI0521 sv 4b	Lysozym 2 pfam01832	putative Glucosaminidase, GlcNac-MurNac

4.1.1.4 Auswahl geeigneter Proteinabschnitte der Domänen

Die Domänenabschnitte sollten derart ausgewählt werden, dass nur C-terminal eine Linkersequenz vorhanden ist. An Domänen ohne natürlichen C-terminalen Linker wurde die synthetische Linkersequenz angehängt. Vorhandene Signal- und *Leaderpeptide* wurden nicht mitkloniert.

Bis auf EADPSA, EAD500 und Cellosyl (Rau *et al.*, 2001; Korndörfer *et al.*, 2006 und 2008) gibt es von den verwendeten Domänen keine bekannten Strukturen, weshalb die geeigneten Sequenzabschnitte der anderen Domänen über *in silico*-Analysen der Aminosäuresequenzen und experimentelle Daten angenähert wurden.

Die *in silico*-Analysen umfassten abgeleitete Strukturinformation aus Modellen, Sekundärstruktur-Vorhersagen, Linkervorhersagen, Domänenvorhersagen über BLAST und Sequenz-Alignments (2.11).

Zu Hilfe genommen wurden die CBD-Bindestudien von Schmelcher und Mitarbeitern (2010) mit den Domänen CBD511, CBDP40, CBD500, CBDB025, CBDP35 und CBD006. Weitere experimentelle Hinweise für die Eingrenzung der geeigneten Domänenabschnitte lieferten Veröffentlichungen über die Analyse verkürzter Varianten von Sle1 (Kajimura *et al.*, 2005) und IspC (Wang und Lin, 2007) sowie die Entfernung der Signalsequenz von MurA (Carroll *et al.*, 2003). Für die Wahl eines geeigneten Sequenzabschnitts für EADgp29 lagen eigene Daten vor (Profos AG, heute Hyglos GmbH, Daten unveröffentlicht). Da die tatsächliche Lage der EAD in MurA aus diesen Daten nicht eindeutig zugewiesen werden konnte, wurden zwei N-terminal verschieden lange Varianten kloniert, wobei die längere Variante (MurA) einen sehr niedrigen theoretischen isoelektrischen Punkt hat (pI von 5,2). Im Gegensatz hierzu liegt der theoretische pI aller anderen Domänen, inklusive der N-terminal verkürzten Variante MurA-Var2, zwischen 9 und 10,5.

Für CBD511, CBD500, CBDP35 und CBD006 wurden andere Domänengrenzen gewählt als bei Schmelcher *et al.* (2010). Begründet liegt dies zum einen in weiteren *in silico*-Analysen, die andere Domänengrenzen vermuten lassen. Zum anderen an der Klonierungsstrategie dieser Arbeit, die keine N-terminale Linkersequenzen vorsieht. Auch für CBDP40 wich die Wahl der Domänengrenzen von Schmelcher *et al.* (2010) ab. So wurden in dieser Arbeit mehrere Varianten dieser Zellbindedomäne kloniert (Abbildung 4.7).

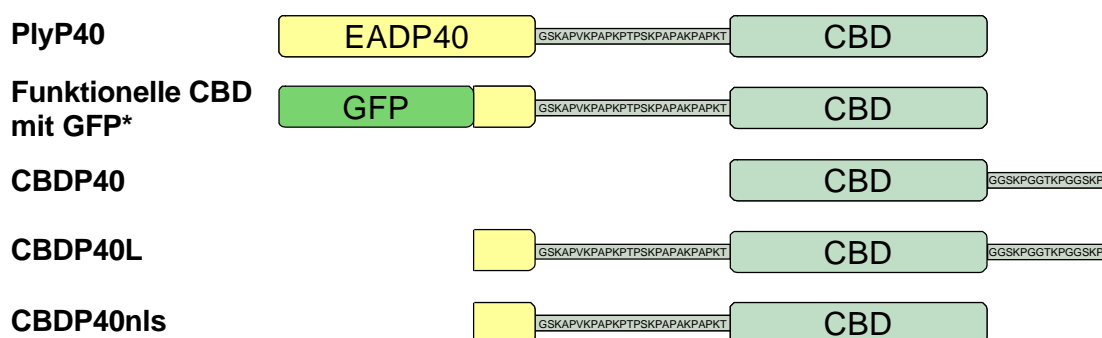


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der klonierten Varianten der Zellbindedomäne von PlyP40. Linkersequenzen sind in grauen Balken wiedergegeben. * aus Schmelcher *et al.*, (2010), GFP: *Green Fluorescent Protein*.

Laut Schmelcher *et al.* (2010) wurden gute Zellbindungen nur mit CBDP40-Varianten erreicht, die N-terminal über die vorhergesagte Linkersequenz hinaus in die EAD hinein reichten. Um auszutesten, ob dies möglicherweise durch die Verwendung von N-terminalen Fusionen mit GFP herbeigeführt wurde, wurde hier eine N-terminal kürzere Variante

CBDP40 getestet. In späteren Versuchen stellte sich allerdings heraus, dass CDBP40 nicht funktionell war (4.1.4.4). Aus diesem Grund wurden CDBP40L und CDBP40nls generiert. Diese Varianten beginnen N-terminal entsprechend den Resultaten von Schmelcher *et al.* (2010). Um einen Effekt des C-terminalen synthetischen Linkers als Ursache der Nichtfunktionalität von CDBP40 auszuschließen, wurde CDBP40L mit und CDBP40nls ohne synthetischen Linker kloniert.

In Tabelle 4.3 ist die Wahl der Domänengrenzen angegeben. Die Funktionsfähigkeit aller klonierten CBDs und EADs sollte im Anschluss der Klonierung überprüft werden (4.1.2.3 und 4.1.2.4).

Tabelle 4.3: Gewählte Sequenzabschnitte der Domänen.

Domäne	Domänengrenzen
CBD511	S197-K341
CBDP40	T226-K344
CBDP40L	S192-K344
CBDP40nls	S192-K344
CBD500	A148-K289
CBDB025	G127-K276
CBDP35	G140-K291
CBD006	T157-I235
EAD511	M1-T195
EAD500	M1-T154
EADP40	M1-K225
EADP35	M1-E150
EADB054	M1-A194
EADPSA	M1-N182
EADgp29	V641-V795
MurA	A52-S327
MurA-Var2	S142-S327
IspC	M1-G226
Sle1	V201-H334
Cellosyl	T79-A294

4.1.2 Klonierung und Funktionstestung der Domänen

4.1.2.1 Klonierung der Domänen

Zur Klonierung der Domänen wurden zunächst die erwünschten DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert (3.2.3.1). Tabelle 7.1 im Anhang listet die verwendeten Primer und Matrizen sowie die resultierenden Fragmentgrößen der klonierten Domänen auf. Für die Endolysin-Domänen CBD511, CDBP40, CDBP40L, CDBP40nls, CBD500, EAD511, EAD500, EADP40 und EADPSA waren bereits klonierte Konstrukte vorhanden. Als Matrize für das Bakteriozin Cellosyl lag ein kloniertes synthetisches Gen mit für die Expression in *E. coli* optimierter

Sequenz vor. Die codierenden Gene für die Endolysin-Domänen CBDB35 und EADP35 wurden aus einem GdnHCl-Aufschluss (3.2.2) des Phagen P35 (ProCC P814) und für EADgp29 aus dem Phagen P100 (ProCC P721) amplifiziert. Die Gene *cbdB025*, *cbd006* und *eadB054* wurden jeweils über kryptische Prophagen aus genomischer Wirts-DNA amplifiziert. Kryptischen Prophagen fehlen einige Gene, die für den lytischen Lebenszyklus eines Bakteriophagen notwendig sind und sind somit nicht mehr in der Lage, das Wirtschromosom zu verlassen und intakte Phagenpartikel zu bilden. Hierfür wurden Hitzelysate von Stämmen als Matrize verwendet, aus denen bereits andere Phagenproteine von B025, A006 und B054 erfolgreich vermehrt werden konnten (Daten Profos AG, nicht veröffentlicht). Das Gen für die Autolysin-Domäne Sle1 wurde aus Hitzelysat von *Staphylococcus aureus* USA 300 (ProCC S2297) und die Gene für die Autolysin-Domäne MurA und deren N-terminal verkürzte Variante MurA-Var2 wurden aus Hitzelysat von *Listeria monocytogenes* EGDe (ProCC S1095) amplifiziert.

Die PCR-Produkte der Domänen mit wildtypischem Linker wurden mit *NcoI* und *BamHI* verdaut (3.2.4) und in pET14b ligiert (3.2.6). Die PCR-Produkte aller Domänen ohne eigenen Linker wurden mit *NcoI* und *SpeI* verdaut und in den modifizierten Vektor pET14b-linsyn (3.2.11) kloniert. Eine Ausnahme war CBD006, denn bei dieser Domäne wurde der synthetische Linker im Rahmen der Erstellung von pET14b-linsyn über PCR angefügt (3.2.11). Da für das Listerien-Autolysin IspC keine geeignete Matrize gefunden wurde, wurde ein synthetisches Gen mit optimierter Sequenz für die Expression in *E. coli* verwendet (Geneart AG, Regensburg). Das *ispC*-Gen wurde mit flankierenden *NcoI* und *BamHI*-Schnittstellen synthetisiert, so dass nach Restriktionsverdau mit *NcoI* und *BamHI* die Ligation in pET14b erfolgen konnte.

Nach Transformation von kompetenten HMS174(DE3)-Zellen (3.1.4) mit den entstandenen Plasmiden wurden positive Klone mit Ampicillin-Resistenz selektiert. Klone, die Proteine der erwarteten Proteingröße exprimierten (3.3.1), wurden sequenziert (3.2.10). Die Sequenzierung zeigte Aminosäureaustausche in den Domänen CBDB025 (L135P, I215V, K250R, A269T) und CBD006 (R170K, V172I, Y196F), die aus Prophagen amplifiziert wurden. Bis auf L135P in CBDB025 handelt es sich um Austausche gegen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften und wurden belassen.

Zusätzlich wurden alle Domänen samt Linker über *NcoI/BamHI* in den pQE60 Vektor kloniert und dadurch mit C-terminalem His-tag markiert. Somit lagen sämtliche Domänen im T7 und im T5-System vor und konnten auf Löslichkeit untersucht werden.

4.1.2.2 Löslichkeit der Domänen

Alle Domänen wurden nach Klonierung und Expressionstest auf Löslichkeit im T5 (*E. coli* M15) und T7-System (*E. coli* HMS174(DE3)) getestet (3.3.1). Abbildung 4.8 zeigt Beispiele des Löslichkeitstests anhand von Cellosyl-CHis und EADP40-CHis im T5-System. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

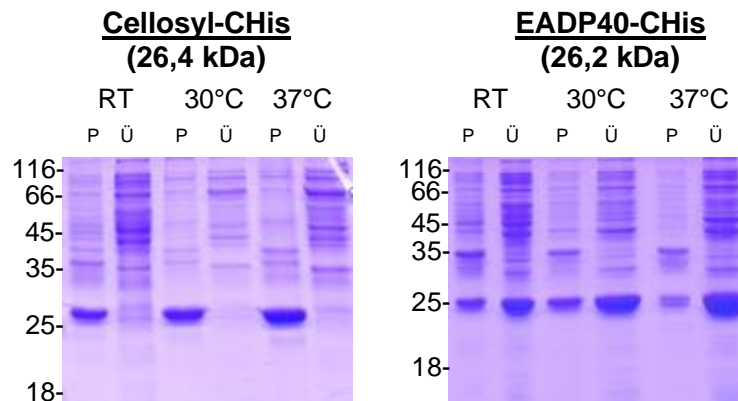


Abbildung 4.8: Beispiele zum Löslichkeitstest der Domänen bei Raumtemperatur (RT), 30 und 37°C in *E. coli* M15 (T5-System). Cellosyl-CHis wurde vorwiegend unlöslich exprimiert und EADP40-CHis war bei allen Temperaturen größtenteils löslich. Der Protein-Standard ist in kDa angegeben. P: Pellet, Ü: Überstand. Die Proben wurden auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Tabelle 4.4: Einschätzung der Löslichkeit der Domänen.

+++ : geschätzt 80-100 % löslich exprimiert
 ++ : geschätzt 40-80 % löslich exprimiert
 + : weniger als 40 % löslich exprimiert
 - : vorwiegend unlöslich
 n. a. : nicht auswertbar aufgrund zu geringer Expression.

Stamm Domäne	HMS174(DE3) T7-System			M15 T5-System		
	RT	30°C	37°C	RT	30°C	37°C
CBD511	+++	++	++	++	++	++
CBDP40	++	++	++	++	++	+++
CBDP40L	++	++	++	++	++	++
CBDP40nls	++	++	++	++	+++	+++
CBD500	+++	++	++	+++	+++	+++
CBDB025	+++	+++	+++	+++	+++	+
CBDP35	++	++	+	+++	+++	++
CBD006	++	++	++	+++	+++	+++
EAD511	+++	+++	+++	++	+++	+++
EAD500	++	++	++	++	+++	+++
EADP40	+++	+++	+++	++	++	+++
EADP35	-	-	+	-	-	-
EADB054	++	++	+	+++	-	-
EADPSA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
EADgp29	++	+++	+++	+++	+++	+++
MurA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MurA-Var2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cellosyl	-	-	+	-	-	-
Sle1	-	-	+	-	-	-
IspC	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

Im Vergleich zeigten die Domänen unterschiedliche Anteile von löslicher und unlöslicher Expression. Das Löslichkeitsverhalten war in den beiden getesteten Expressionssystemen ähnlich, so dass beide Systeme für das geplante *Screening* gleichwertig geeignet erschienen. Als sehr schlecht löslich stellten sich die Domänen EADP35, Cellosyl und Sle1 heraus, EADB054 zeigte vergleichsweise starke Temperaturabhängigkeit und war unlöslich im T5 System bei 30°C und 37°C.

Die Resultate der Löslichkeiten der Domänen sollten keinen Einfluss auf die tatsächliche Verwendung in vorgesehenen Genbanken dieser Arbeit haben. Die Kenntnisse über die Eigenschaften der einzelnen Domänen sollten jedoch später dabei helfen, *Screening*-Ergebnisse zu interpretieren und dies gegebenenfalls für die Erstellung weiterer Genbanken mit dem Ziel der Domänen-Neukombination zu nutzen.

4.1.2.3 Funktionstestung der enzymatisch aktiven Domänen

Zur Funktionstestung der enzymatisch aktiven Domänen wurden sowohl die M15-Klone als auch die HMS174(DE3)-Klone, welche Expressionsplasmide der Domänen tragen, auf induzierenden Lysehofplatten mit hitzeinaktivierten Zellen von S1095 getüpfelt (3.5.1). Somit konnte die Aktivität im T5- und im T7-System getestet werden. Alle Klone waren nach mehrtägiger Inkubation von einem Lysehof umgeben (Daten nicht gezeigt).

4.1.2.4 Funktionstestung der Zellbindedomänen

Reinigung der Zellbindedomänen

Für die Testung auf Bindeaktivität der Zellbindedomänen wurden die C-terminal Histidin-markierten CBDs gereinigt. Während der Reinigung über Nickel-NTA Agarose-Chromatographie (3.3.3.4) wurden alle diese Proteine fast vollständig abgebaut, weshalb sie erneut schonend mit Proteaseinhibitor bei 4°C über Ni-NTA Sepharose-Partikel gereinigt wurden (3.3.3.4). Dieses Verfahren kann im Gegensatz zur Säulenchromatographie einfacher gekühlt durchgeführt werden. In Abbildung 4.9 ist als Beispiel der Vergleich der Reinigungen von CBDP40-CHis über Ni-NTA Agarose-Säule und Ni-NTA Sepharose-Partikel dargestellt. Im Anschluss an die Dialyse wurden die Proteine unmittelbar verwendet.

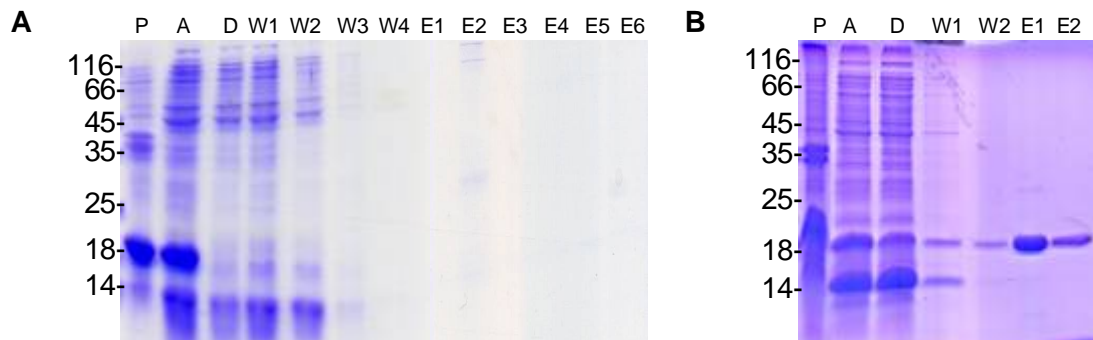


Abbildung 4.9: Abbau von CBDP40-CHis während der Reinigung über Ni-NTA Agarose-Säule bei Raumtemperatur (A) im Vergleich zu Reinigung über Ni-NTA Sepharose-Partikel bei 4° mit Proteaseinhibitor (B). Die Höhe der Bande von CBDP40-CHis (16,1 kDa) korrelierte nicht mit dem Proteinstandard. P: Pellet, A: Auftrag, D: Durchlauf, W: Waschschrirte, E: Eluate. Der Standard ist in kDa angegeben. Proben wurden auf einem 15 %igen SDS-Gel analysiert.

Test der Zellbindedomänen auf Bindeaktivität

Die Bindspezifitäten der verwendeten CBDs waren bekannt aus Schmelcher *et al.*, 2010. Da die Domänen aber zum Teil mit anderen Domänengrenzen kloniert wurden (CBD511, CBD500, CBDP35 und CBD006) und alle CBDs zudem C-terminal mit der synthetischen Linkersequenz fusioniert wurden, sollte die Funktionsfähigkeit überprüft werden. Zunächst wurde Listerienbindung im Zell-ELISA untersucht (3.5.9.1). Ein Schema zum Zell-ELISA ist in Abbildung 4.10-A gezeigt. 96-Well-Platten Typ MaxiSorb wurden mit lebenden Listerien verschiedener Serovare beschichtet und Zellbindung der C-terminal His-markierten CBDs wurde in Verbindung mit His-Antikörper-POD-Konjugat nachgewiesen. Für jede CBD waren im Test Listerien-Serovare vorhanden, die von der jeweiligen CBD gebunden werden müssten.

Für CBD511, CBD500 und CBDP35 konnte in diesem Testformat eindeutig spezifische Zellbindung nachgewiesen werden, die Ergebnisse mit *Listeria monocytogenes* ProCC S1095 sv 1/2a, S1135 sv 3a und S776 sv 4b sowie *Listeria innocua* S1147 sv 6a sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Wie zu erwarten zeigte CBD511 Bindung an alle getesteten Listerien und CBD500 erkannte S776 sv 4b und S1147 sv 6a. CBDP35 erkannte S1095 sv 1/2a und S1135 sv 3a, jedoch erwartungsgemäß nicht S776 sv 4b und S1147 sv 6a.

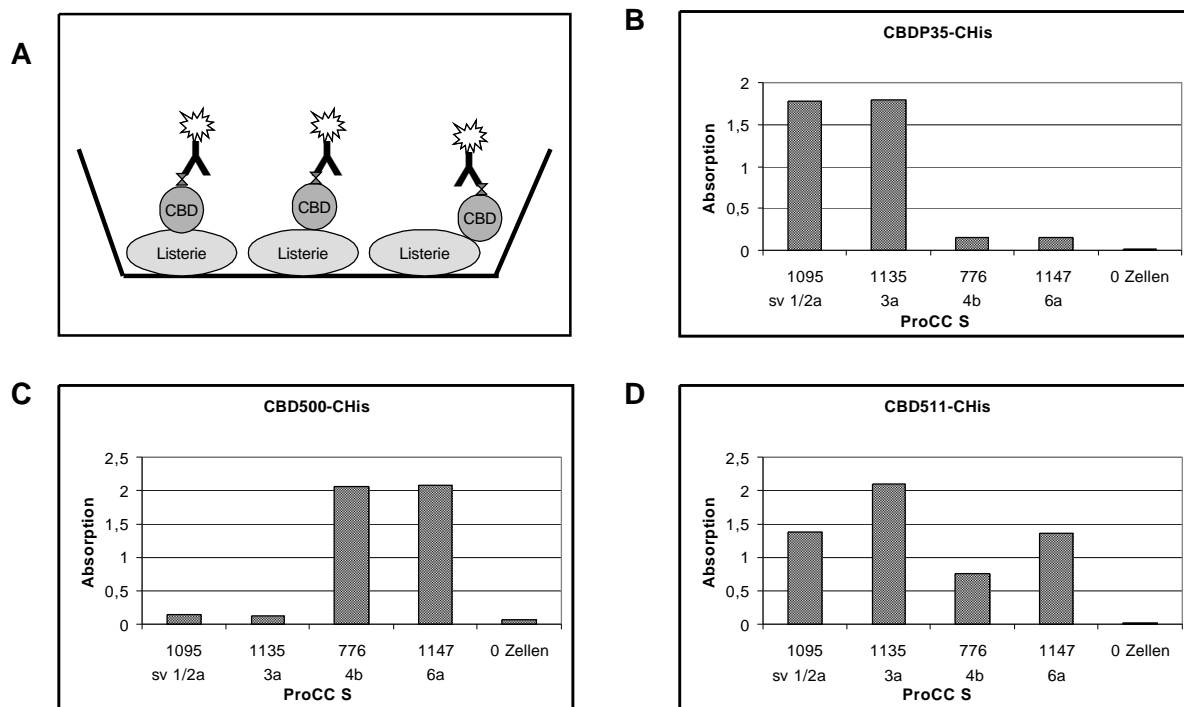


Abbildung 4.10: Schema des Zell-ELISA (A) und Bindeergebnisse der C-terminal His-markierten Domänen CBDP35 (B), CBD500 (C) und CBD511 (D) mit *L. monocytogenes* ProCC S1095 sv 1/2a, S1135 sv 3a, S776 sv 4b und *L. innocua* ProCC S1147 sv 6a. Die Durchführung erfolgte in Doppelbestimmung und die Daten wurden nach 30 min Inkubation mit Nachweisreagenz erfasst. Im Schema sind Antikörper schwarz, CBDs dunkelgrau, der His-tag ist als Sanduhr dargestellt, Listerien sind hellgrau.

Bindung der CBDP40-Derivate an alle Serovare, der CBD006 an die eingesetzten Stämme mit sv 1/2, 3 und 4a sowie die Bindung der CBDB025 an sv 4a, 5 und 6a konnte nicht nachgewiesen werden, da in diesem Versuchsformat die Zellbindesignale nicht von den Hintergrundwerten unterschieden werden konnten. Mit diesen CBDs wurde daher der Sandwich-ELISA als weiteres Testformat durchgeführt (Schema in Abbildung 4.11, 3.5.9.2). Hierzu wurden die His-markierten CBDs auf Nickel-beschichtete Platten gebunden und diese mit lebenden Listerien verschiedener Serovare beschichtet. Über N-terminal *in vivo* biotinylierte CBD511 (JS-CBD511) der Hyglos GmbH und Strep-Tactin AP-Konjugat konnte Bindung sichtbar gemacht werden. In diesem Versuchsformat konnte die Bindeaktivität von CBDB025 bestätigt werden. In Abbildung 4.11 ist der Nachweis der Bindung an sv 4a sowie sv 5 dargestellt. Für CBD006, CBDP40, CBDP40nls und CBDP40L konnte auch in diesem Test keine Bindung gezeigt werden.

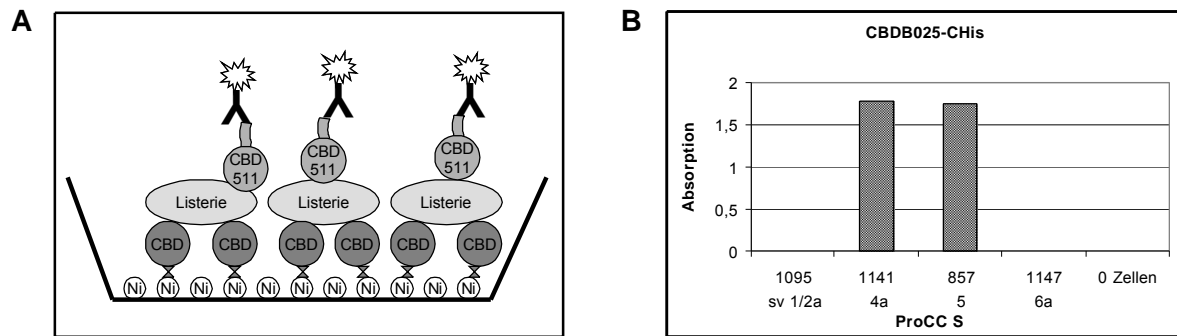


Abbildung 4.11: Schema des Sandwich-ELISA (A) und Bindeergebnisse von C-His markierter CBDB025 (B). Verwendete Listerien: *L. monocytogenes* ProCC S1095 sv 1/2a, S1141 sv 4a, *L. ivanovii* ProCC S857 sv 5 und *L. innocua* ProCC S1147 sv 6a. Die Durchführung erfolgte in Doppelbestimmung und die Daten wurden nach 60 min Inkubation mit Nachweisreagenz erfasst. Im Schema sind Antikörper schwarz, Test-CBDs dunkelgrau, der His-tag ist als Sanduhr dargestellt, Listerien sind hellgrau, JS-CBD511 ist grau, JS-tag ist als Fähnchen abgebildet, Ni: Nickelbeschichtete Platte.

4.1.3 Vorbereitung der Genbank

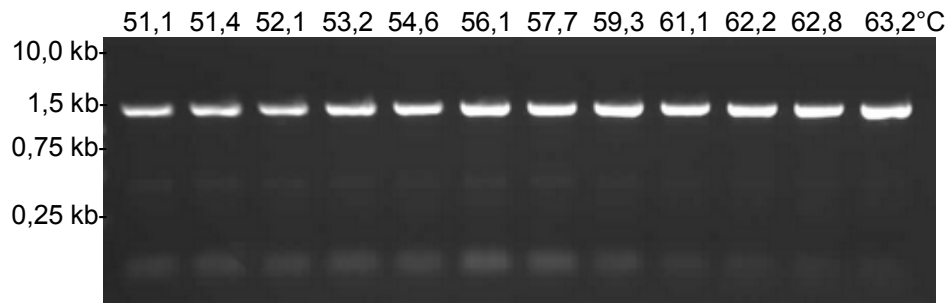
4.1.3.1 Erstellung positionsspezifischer DNA-Fragmente

Alle Domänen wurden ohne Stop-Codon und mit denselben Sequenzen an den Domänengrenzen (5' CCATGGCG: *Nco*I-Schnittstelle und Alanin-Codon, 3' GGATCC: *Bam*HI-Schnittstelle) in pET14b bzw. pET14b-linsyn kloniert (4.1.2.1). An diesen Abschnitten von Vektor und Insert, die bei allen Domänen gleich sind, *annealen* die positionsspezifischen Primer (Abbildung 4.2) zur Amplifikation der Domänenfragmente für die anschließenden Ligations-Schritte.

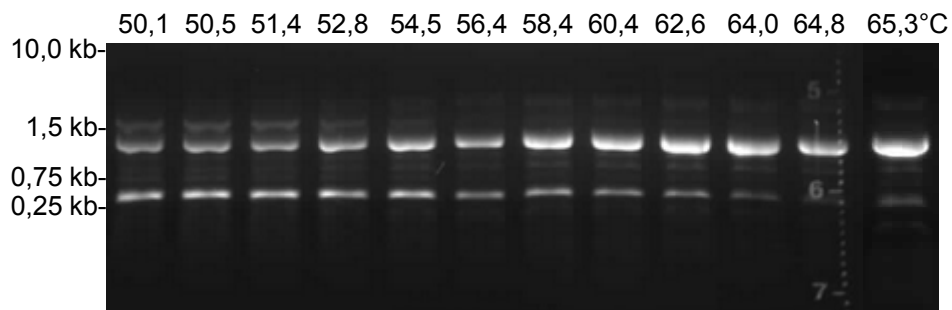
Zunächst wurde die optimale *Annealing*-Temperatur für die PCR (3.2.3.1) der jeweiligen Domänenposition bestimmt (Abbildung 4.12). Als Matrize diente hierfür ein pET14b-Plasmid mit einem 1302 bp großen Insert, welches über *Nco*I/*Bam*HI kloniert war (Plasmid p2639). Die besten Resultate bezüglich unerwünschter Nebenbanden wurden mit 63,2°C für Position 1, mit 64,8°C für Position 2 und mit 51,1°C für Position 3 erzielt. Tabelle 4.5 zeigt eine Zusammenfassung über die verwendeten Primerpaare und die dadurch eingeführten Schnittstellen sowie die ermittelte ideale *Annealing*-Temperatur für die jeweiligen Positionen. Anschließend wurden diese Parameter beibehalten, um mittels PCR für alle Domänen die Amplifikationsprodukte für Positionen 1 mit Biotin-Markierung sowie für Position 2 und 3 zu erzeugen. Als Matrizen dienten dafür jeweils die pET14b-klonierten Domänen (aus 4.1.2.1). Die Fragmente wurden aus dem Agarose-Gel gereinigt (3.2.8), wodurch Nebenbanden und Primer abgetrennt werden konnten. Hierbei war vor allem die Abtrennung der biotinylierten Primer in Ansätzen für Position 1 wichtig, damit diese später nicht mit den biotinylierten PCR-Produkten um die Bindung an Streptavidin beschichtete Partikel konkurrieren. Nach Restriktionsverdau am 3'-Ende der Fragmente für Position 1 und Restriktionsverdau am

5'-Ende der Fragmente für Positionen 2 und 3 (3.2.4) erfolgte die Konzentrationsbestimmung über UV-Spektroskopie und anschließender Kontrolle über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.9).

Position 1



Position 2



Position 3

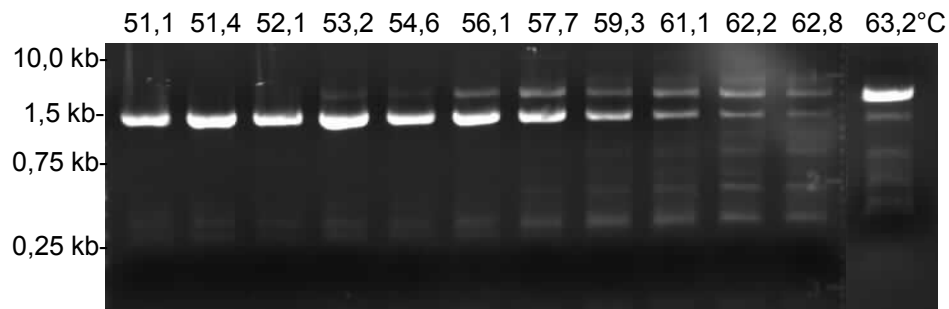


Abbildung 4.12: Ermittlung der idealen *Annealing*-Temperatur für die Amplifikation der Fragmente für Positionen 1, 2 und 3 mit den entsprechenden Primerpaaren. Als Matrize diente das Plasmid pET14b p2639 mit einem 1302 bp großem Insert. Die Analyse erfolgte auf einem 1,0 % Agarose-Gel.

Tabelle 4.5: Primerpaare, eingeführte Restriktionsschnittstellen und optimale *Annealing*-Temperatur für die Fragment-Amplifikation verschiedener Domänenpositionen.

Position	1	2	3
fw-Primer	Bio-fw-NcoI-Lib	fw-PstI-Lib	fw-SalI-Lib
rw-Primer	rw-PstI-Lib	rw-SalI-Lib	rw-EcoRV-Lib
Restriktionsschnittstellen	<i>NcoI</i> , <i>PstI</i>	<i>PstI</i> , <i>SalI</i>	<i>SalI</i> , <i>EcoRV</i>
<i>Annealing</i> -Temperatur	63,2°C	64,8°C	51,1°C

4.1.3.2 Bindung biotinylierter DNA-Fragmente an Streptavidin-Partikel

Zunächst wurden geeignete Bedingungen für die Bindung von Biotin markierter DNA an magnetische, Streptavidin beschichtete Partikel ermittelt (3.2.13). Hierzu wurden Partikel von der MicroCoat GmbH (Bernried) und Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie SSC- (150 mM NaCl) und BW-Puffer (1 M NaCl) getestet. Die Testungen erfolgten mit einem biotinylierten DNA-Fragment mit 1,3 kb, da dies in etwa der Größe des ersten Ligationsprodukt (aus Fragmenten für Position 1 und 2) entspricht, welches später bei der Generierung der Genbank über Streptavidin-Partikel gebunden werden soll.

Als geeignete Bedingungen für spätere Ansätze zeigte sich eine Partikel-Konzentration von 5 mg/ml und die Verwendung von BW-Puffer, dabei waren die Ergebnisse mit Partikeln von Invitrogen und der MicroCoat GmbH vergleichbar (Daten nicht gezeigt) und im Folgenden wurde mit Partikel von der MicroCoat GmbH gearbeitet.

Für die Ermittlung des benötigten Verhältnisses von Streptavidin-Partikel zu biotinylierter DNA wurden 10, 50 und 250 µg Streptavidin-Partikel mit jeweils 100 ng (0,11 pmol) biotinylierter DNA inkubiert und die Fraktionen nach *Nco*I-Verdau über Agarose-Gelelektrophorese analysiert (3.2.7). Der Ansatz mit 250 µg Partikel lieferte die höchste Binde-Effizienz, so konnte bei 1 mg Streptavidin-Partikel mit einer Bindung von 0,66 µg bzw. 0,73 pmol DNA gerechnet werden (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden wurde untersucht wie sich nicht biotinylierte und biotinylierte DNA in Gegenwart von Streptavidin-Partikeln verhalten. Hierzu wurden 75 µg magnetische, Streptavidin beschichtete Partikel mit jeweils 0,0376 pmol biotinylierten DNA-Fragmenten von 600 bp und 1,4 kb Größe sowie mit nicht biotinylierter DNA mit 800 bp inkubiert (3.2.13). Nach einem Waschschrift wurden gebundene Fragmente über Restriktionsverdau von den Partikeln entfernt.

Abbildung 4.13 zeigt das Agarose-Gel mit dem Überstand nach Inkubation der Partikel mit den Fragmenten (Ü1) sowie Überstand (Ü2) und Partikel nach Restriktionsverdau mit *Nco*I. Der Überstand nach Bindung Ü1 enthielt sämtliche nicht biotinylierte DNA aber auch biotinylierte DNA, da die Bindekapazität der Partikel vermutlich überschritten war (1 pmol biotinylierte DNA auf 1 mg Partikel). Der Überstand nach Restriktionsverdau enthielt nur Banden der zuvor biotinylierten, an die Partikel gebundenen DNA. Die Fraktion der Partikel enthielt keine DNA, was bedeutet, dass sämtliche DNA von den Partikeln durch Restriktionsverdau abgetrennt wurde. Außerdem konnte keine unspezifische Interaktion zwischen nicht biotinylierter DNA und den Partikeln beobachtet werden.

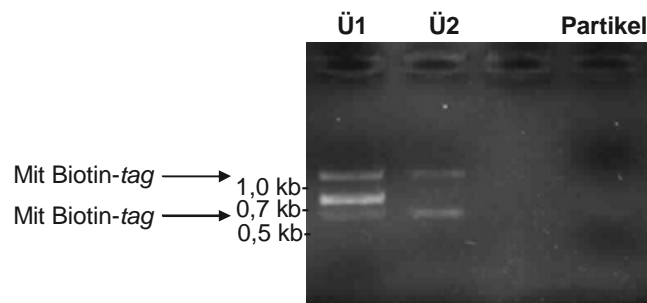


Abbildung 4.13: Analyse der Bindung von biotinylierter und nicht biotinylierter DNA an Streptavidin-Partikel über Agarose-Gelelektrophorese. Ü1: Überstand der Inkubation von Partikeln mit DNA, Ü2: Überstand nach Waschen und Restriktionsverdau mit *NcoI*, Partikel: Streptavidin-Partikel nach Waschen und Restriktionsverdau. Biotinylierte DNA: 0,6 und 1,4 kb. Nicht biotinylierte DNA: 800 bp. Die Analyse erfolgte auf einem 1,0 % Agarose-Gel.

4.1.4 Prinzipielltestung anhand 8 ausgewählter Domänen

Anhand von 4 N-terminalen EADs und 4 C-terminalen CBDS sollte die Klonierungsstrategie getestet werden. Hierbei konnten 16 verschiedene Konstrukte entstehen, diese sollten über Kolonie-PCR mit anschließendem Restriktionsverdau identifiziert und nachgewiesen werden. Dafür wurden 8 Domänen derart ausgewählt, dass die codierenden DNA-Fragmente durch unterschiedliche Fragmentgrößen über Agarose-Gelelektrophorese voneinander unterschieden werden konnten.

4.1.4.1 Zufällige Ligation von 4 N-terminalen und C-terminalen Domänen

Es wurden die vier EADs EAD511, EADPSA, EADP35 und EADP40 für die Position 1 und die vier CBDs CBD511, CBD500, CBD006 und CBDP40 für die Position 2 zugelassen. Diese CBDs haben unterschiedliche Bindungsspektren. Wie gezeigt werden konnte (4.1.2.4) waren CBD511 und CBD500 funktionsfähig. CBD511 bindet alle Listerien-Serovare und CBD500 bindet sv 4, 5 und 6. Die Bindeaktivitäten von CBDP40 (wie auch von CBDP40nls und CBDP40L) und von CBD006 hingegen konnten nicht gezeigt werden (4.1.2.4), CBDP40 sollte jedoch an alle Serovare binden und CBD006 an sv 1/2, 3 und 4a. Ergebnisse aus der Prinzipielltestung sollten aufweisen, ob die klonierten Domänen CBD006 und CBDP40 in dem System doch funktionierten.

Die Generierung biotinylierter (Position 1) und nicht biotinylierter (Position 2) Amplifikate erfolgte wie in 4.1.3.1 beschrieben. Die jeweils mit *PstI* verdauten DNA-Fragmente wurden in äquimolaren Mengen von jeweils 0,2 pmol vereinigt und ligiert. Nach DNA-Bindung an die Streptavidin-Partikel im Verhältnis 0,7 pmol DNA zu 1 mg Partikel folgten nacheinander Restriktionsverdau mit *SaI* und *NcoI*, zwischen den jeweiligen Schritten wurde gewaschen (analog zu 3.2.14).

Die Analyse der Fraktionen über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.7) zeigte, dass nach der Ligation Fragmente mit den zu erwartenden Größen zwischen ca. 600 bp und 1,4 kb vorlagen und diese durch Restriktionsverdau mit *NcoI* von den Partikeln abgetrennt werden konnten (nicht gezeigt).

4.1.4.2 Transformation und Screening

Nach Inaktivierung des Restriktionsenzym wurden die Ligationsprodukte über *NcoI*- und *SalI*-Schnittstellen in den Vektor pQE60-lib (3.2.12) ligiert (3.2.6). Anschließend wurden damit ultrakompetente NEB Express I^Q *E. coli* transformiert (3.1.4). Zur Selektion von Klonen, die aktive Varianten exprimierten, sollte auf induzierende Lysehofplatten mit hitzeinaktivierten Listerien-Zellen plattiert werden. Positive Klone, die ein lösliches und lytisch aktives Protein gegen die eingegossenen Listerien exprimieren, sollten dann von einem Lysehof umgeben sein.

Es stellte sich allerdings heraus, dass gleichzeitiger Aufbau eines Selektionsdrucks über Ampicillin und Induktion der Proteinexpression das Koloniewachstum verhinderte. Daher war es nötig, zeitlich verzögert zu induzieren. Gelöst wurde dies durch Folienlyseplatten (3.5.2). Diese bestehen aus 3 Schichten (Abbildung 4.14). Die untere Schicht enthält LB-Agar mit Selektionsantibiotikum sowie IPTG zur Induktion der Expression. Sie wird von der oberen Schicht aus LB-Top-Agar mit hitzeinaktivierten Listerien eines Serovars und Ampicillin über eine undurchlässige, durchsichtige Folie getrennt. Nachdem die Transformanden Kolonien gebildet haben, wird die Folie mit einer sterilen Nadel perforiert, wodurch IPTG zu den *E. coli*-Kolonien diffundieren kann. Weitere Inkubation führt zur Lysehofbildung in der oberen Agarschicht.

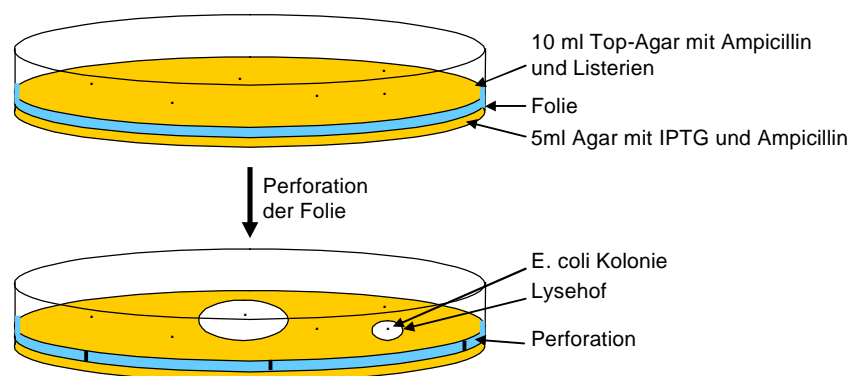


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der Folienlyseplatten. Die Folie ermöglicht verzögerte Induktion.

Abbildung 4.15 zeigt eine Folienlyseplatte mit *Listeria innocua* sv 6a (ProCC S1147) mit Transformanden der 16 möglichen Varianten.

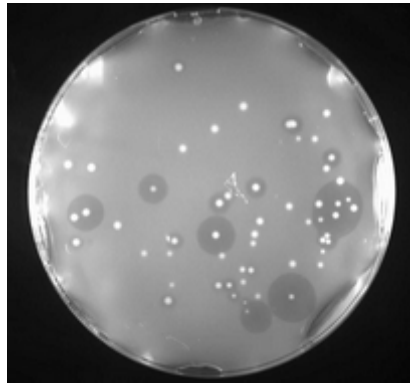


Abbildung 4.15: Ein Teil der induzierten *E. coli*-Zellen bilden nach Plasmidtransformation und Koloniewachstum Lysehöfe. Die obere Schicht der Lysehofplatten enthielt hitzeinaktivierte Listerien ProCC S1147 sv 6a.

4.1.4.3 Validierung

Es sollte untersucht werden, ob alle möglichen Kombinationen gebildet wurden. Hierzu wurden zunächst 88 Klone mit und ohne Lysehof gepickt und die Vektorinserts über Kolonie-PCR mit den Primern pQE-prom und pQE-term amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (3.2.5) und mit *Pst*I verdaut (3.2.4). Da *Pst*I die Schnittstelle ist, über die die Domänen miteinander ligiert wurden, wurden somit wieder die einzelnen Domänenfragmente generiert. Über die Größe der entstehenden Banden auf Agarose-Gelen konnten die Domänen der Inserts bestimmt werden. Die Konstrukte wurden anschließend über domänen-spezifische PCR bestätigt. Auf diese Weise wurden 15 der 16 Varianten gefunden. Konstrukt EADP40-CBD500 (B) wurde über Kolonie-PCR von weiteren 93 Klonen mit den Primern fw-EADP40-lib und rw-CBD500-lib zweimal identifiziert. Insgesamt wurden also alle theoretisch möglichen Varianten gefunden. In Abbildung 4.16 werden die möglichen Domänenkombinationen mit den korrespondierenden Domänengrößen aufgelistet und die Fragmentmuster der 16 identifizierten Varianten gezeigt.

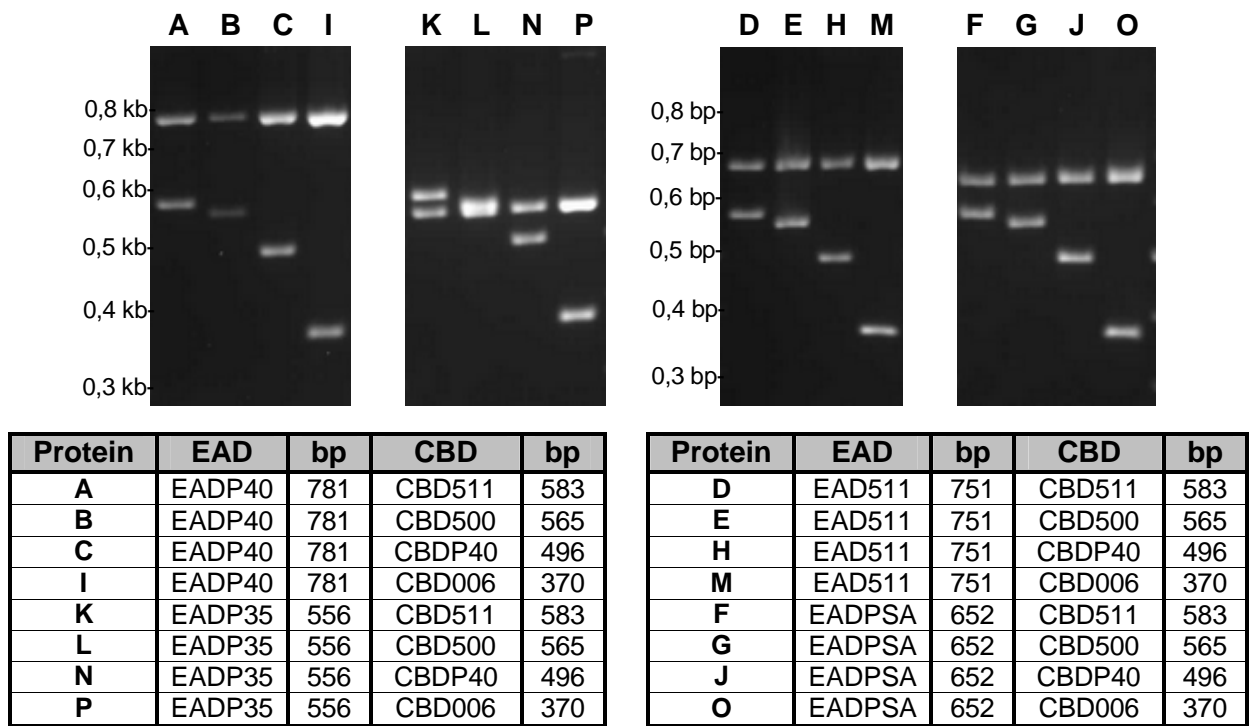


Abbildung 4.16: Identifikation der Domänenkombinationen über *Pst*I-Verdau der Kolonie-PCR. Gezeigt sind die Bandenmuster und Domänengrößen der 16 verschiedenen, gefundenen Varianten. Die Analyse erfolgte auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel.

4.1.4.4 Expression und Funktionstestung

Um zu überprüfen, ob während der Klonierung die beiden Domänen korrekt assembliert wurden, wurde die Proteinexpression der 16 verschiedenen Klone untersucht (3.3.1). Wie Abbildung 4.17 zeigt, wiesen alle Klone bei 37°C deutliche Proteinexpression mit dem zu erwartenden Molekulargewicht auf.

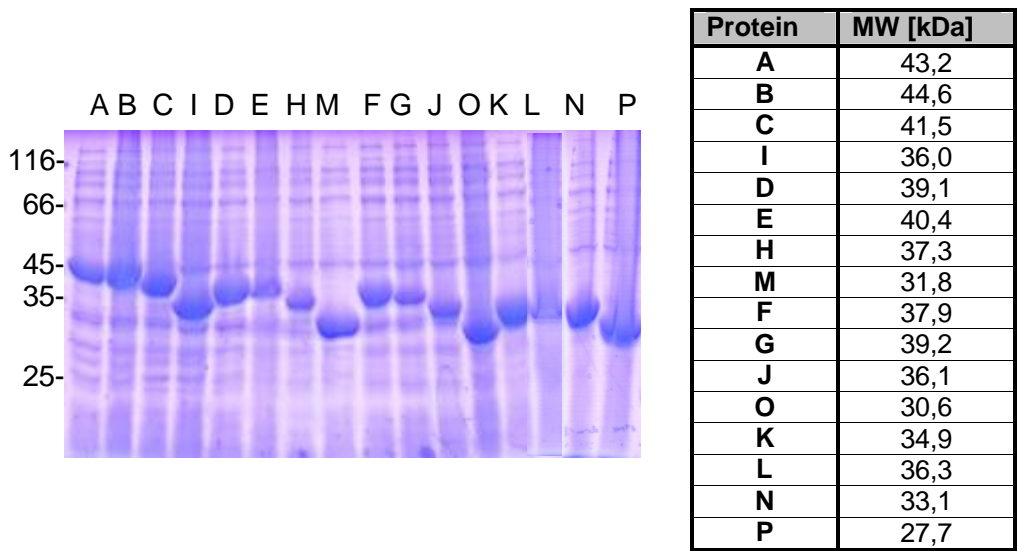


Abbildung 4.17: Expressionstest der 16 Varianten bei 37°C. Die Bezeichnungen A-P sind wie in Abbildung 4.16. Der Protein-Standard ist in kDa angegeben. Die Analyse erfolgte auf einem 12 %igen SDS-Gel.

Danach wurde auf lösliche Expression der 16 Proteine bei 30°C getestet (3.3.1). Tabelle 4.6 präsentiert eine Zusammenstellung der Analyse der löslichen Expression der Domänenkombinationen bei 30°C (T5-System, *E. coli* NEB Express I^Q) im Vergleich zu den Einzeldomänen (T5-System, *E. coli* M15, aus 4.1.2.2).

Tabelle 4.6: Lösliche Expression der Domänenkombinationen im Vergleich zur löslichen Expression der einzelnen Domänen bei 30°C im T5-System. Die Domänenkombinationen wurden in NEB Express I^Q und die einzelnen Domänen in M15 exprimiert.

+++ geschätzt 80-100 % löslich exprimiert (+) kaum löslich exprimiert
 ++ geschätzt 40-80 % löslich exprimiert - vorwiegend unlöslich
 + weniger als 40 % löslich exprimiert

Variante	EAD	CBD	Löslichkeit Variante	Löslichkeit	
				EAD	CBD
A	EADP40	CBD511	++	++	++
B	EADP40	CBD500	++	++	+++
C	EADP40	CBDP40	++	++	++
I	EADP40	CBD006	++	++	+++
K	EADP35	CBD511	(+)	-	++
L	EADP35	CBD500	(+)	-	+++
N	EADP35	CBDP40	(+)	-	++
P	EADP35	CBD006	-	-	+++
D	EAD511	CBD511	+	+++	++
E	EAD511	CBD500	++	+++	+++
H	EAD511	CBDP40	+	+++	++
M	EAD511	CBD006	++	+++	+++
F	EADPSA	CBD511	++	+++	++
G	EADPSA	CBD500	++	+++	+++
J	EADPSA	CBDP40	++	+++	++
O	EADPSA	CBD006	++	+++	+++

Insgesamt blieb das Löslichkeitsverhalten der einzelnen Domänen in den Kombinationen erhalten. Proteine mit EADP40, EAD511 und EADPSA wurden zumindest teilweise löslich exprimiert. Kandidaten mit EADP35 (K, L, N und P) wurden größtenteils schlecht löslich exprimiert, jedoch führte das Anhängen einer gut löslichen CBD zu einer verbesserten Löslichkeit des Konstrukts gegenüber der alleinigen EAD. Unlöslichkeit einer einzelnen Domäne ist somit kein Ausschlusskriterium und müsste zukünftig nicht zwingend vor der Erstellung einer Genbank getestet werden.

Es folgte die Testung auf Funktionalität. Hierzu wurden neben der Positivkontrolle Ply511 in *E. coli* M15 die entsprechenden Klone von A-P auf induzierende Lysehofplatten mit hitzeinaktivierten Zellen der Listerien ProCC S1095 sv 1/2a, S776 sv 4b und S1147 sv 6a getüpfelt (3.5.1). Nach Inkubation über Nacht bei 30°C konnten bereits Lysehöfe beobachtet werden (Abbildung 4.18), die Lysehofbildung nach weiteren 10 h bei Raumtemperatur ist in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Der benötigte Zeitraum und die nötige Inkubationstemperatur zur Lysehofbildung war vermutlich abhängig von der löslichen Expression der Proteine. So

traten die Lysehöfe der schlecht löslich exprimierten Proteine K, L und P erst nach der Inkubation bei Raumtemperatur auf.

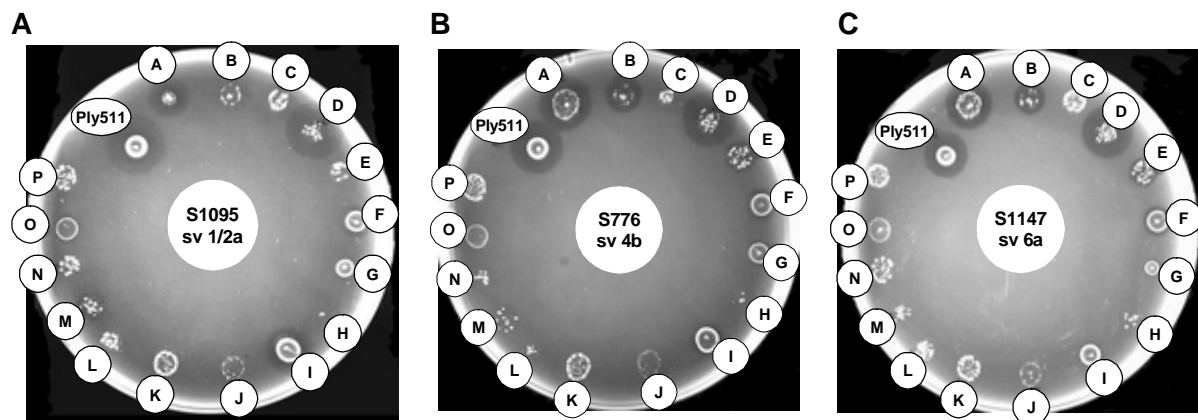


Abbildung 4.18: Lysehofbildung der 16 Varianten nach Inkubation über Nacht. Getüpfelt wurden Klone auf induzierende Platten mit hitzeinaktivierten Zellen von ProCC S1095 sv 1/2a (A), S776 sv 4b (B) und S1147 sv 6a (C). Die gut löslichen Proteine mit aktiven CBDs zeigten bereits nach Inkubation über Nacht bei 30°C Lysehöfe. Schlecht löslich exprimierte Varianten K, L und P zeigten erst nach weiterer Inkubation bei Raumtemperatur Lysehöfe.

Die Fähigkeit zur Lysehofbildung auf einem bestimmten Serovar erfolgte in diesem Zeitraum korrespondierend zu den Bindespektren der CBDs der Varianten (bezüglich dieser Testung: CBD511: alle Serovare, CBD500: sv 4b, 6a, CBD006: sv 1/2a). Demnach war die derart klonierte CBD006 hier aktiv, obwohl dies in den Bindetestungen nicht gezeigt werden konnte (4.1.2.4). Die Tatsache, dass bei Variante I (EADP40-CBD006) Lyse an sv 4b zu sehen war, ist möglicherweise auf sehr starke Expression von I und damit alleiniger Aktivität der EADP40 zurückzuführen.

Bei den Konstrukten mit CBDP40 (C, H, J und N) konnte erst nach weiterer Inkubation Aufhellung im Agar beobachtet werden, die vermutlich allein auf die EAD-Aktivität zurückzuführen war. CBDP40 war demnach vermutlich nicht aktiv. Dies überrascht vor allem bei Konstrukt C, welches sich vom Wildtyp-Protein PlyP40 lediglich durch 6 eingeführte Aminosäuren zwischen Linkersequenz und der CBD für die Klonierung (GSLQMA) sowie durch den C-terminalen synthetischen Linker unterschied. Die Nichtfunktionalität von CBDP40 könnte entweder auf die N-terminale Verkürzung im Vergleich zu Schmelcher *et al.* (2010) bzw. auf die Insertion der 6 Aminosäuren oder auf den synthetischen Linker zurückzuführen sein. CBDP40 wurde daher im Weiteren nicht mehr verwendet, sondern die Varianten CBDP40L und CBDP40nls.

Die Lysehofbildung der Positivkontrolle mit Ply511 konnte von der Lysehofbildung von Variante D nicht unterschieden werden, welche die ligierten Domänen des Wildtyp-Proteins Ply511 enthielt. Es zeichnete sich ab, dass die vorgenommenen Modifikationen auf einzelne

Domänen einen negativen Einfluss haben können, jedoch nicht pauschal. Somit sprach nichts gegen die Anwendung der Methode auf eine größere Zahl von Domänen.

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der ermittelten Lysespektren der 16 Varianten A-P im Vergleich zu den Bindspezifitäten der CBDs. Bindspezifitäten der CBDs sind angegeben nach Schmelcher *et al.* (2010). Die Proteine A-P sind nach CBDs sortiert. Anzahl an „+“ gibt die Größe der Lysehöfe an, bei „(+)“ waren nur schwache Lysehöfe zu sehen. Grau: Lysehöfe traten erst nach Inkubation bei Raumtemperatur auf. Ply511: Expression von Ply511 in M15 als Positivkontrolle.

Bindspezifitäten der CBDs			
CBD	sv 1/2a	sv 4b	sv 6a
CBDP40	+	+	+
CBD511	+	+	+
CBD500		+	+
CBD006	+		

Variante	EAD	CBD	sv 1/2a	sv 4b	sv 6a
Ply511	EAD511	CBD511	+++	+++	+++
C	EADP40	CBDP40			
N	EADP35	CBDP40			
H	EAD511	CBDP40			
J	EADPSA	CBDP40			
A	EADP40	CBD511	++	+++	+++
K	EADP35	CBD511	+	+	(+)
D	EAD511	CBD511	+++	+++	+++
F	EADPSA	CBD511	+	+	+
B	EADP40	CBD500		++	++
L	EADP35	CBD500		+	(+)
E	EAD511	CBD500		+	+
G	EADPSA	CBD500		(+)	(+)
I	EADP40	CBD006	++	(+)	
P	EADP35	CBD006	(+)		
M	EAD511	CBD006	+		
O	EADPSA	CBD006	(+)		

4.2 Generierung und *Screening* einer Genbank aus 19 zufällig kombinierten Domänen

Nach erfolgreicher Testung der Klonierungs- und *Screening*-Systeme sollten die Methoden auf die Bildung von 2- und 3-Domänenproteine angewandt werden. Es wurden alle Domänen aus Tabelle 4.3 verwendet bis auf CBDP40, die nicht funktionsfähig war. CBDP40L und CBDP40nls wurden eingesetzt, auch wenn ihre Bindeaktivität nicht gezeigt werden konnte (4.1.2.4). Mit diesen 19 Domänen ergeben sich für 2-Domänenproteine 361 mögliche Kombinationen, 168 davon mit jeweils einer EAD und einer CBD. Für 3-Domänenproteine ergeben sich 6859 mögliche Kombinationen, 4788 davon haben sowohl eine EAD als auch eine CBD.

4.2.1 2-Domänen Kombinationen

4.2.1.1 Ligation

Die erstellten ligierbaren Fragmente aus 4.1.3.1 der gewählten 19 Domänen für Position 1 und 2 wurden an der Ligationsgrenze mit *Pst*I verdaut. 0,06 pmol eines jeden Fragments beider Positionen wurden miteinander vereinigt und ligiert. Nach Binden an 1,2 mg Streptavidin-Partikel von der MicroCoat GmbH wurden gebundene Ligationsprodukte mit *Sal*I am 3'-Ende der Position 2 verdaut. Zwei Drittel dieses Ligations-Ansatzes wurden bei -20°C gelagert für die spätere Klonierung der 3-Domänen Proteine und ein Drittel wurde für die 2-Domänen Proteine weiterverwendet. *Nco*I-Verdau trennte die DNA von den Partikeln und nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym erfolgte die Ligation in den pQE60-lib-Vektor über *Nco*I und *Sal*I-Schnittstellen (3.2.14).

In ungeschnittenem *pQE60-lib*-Vektor liegt das Insert *ply511* vor (3.2.12), so dass für den Fall der Transformation von ungeschnittenem Vektor diese Konstrukte im *Screening* auftauchen.

4.2.1.2 Transformation und Initial-Screening

Im ersten Ansatz wurden ultrakompetente NEB Express I^Q *E. coli* Zellen mit den generierten Plasmiden transformiert (3.1.4). Es wurden zwei Transformationen mit derselben DNA durchgeführt. Plattierung erfolgte auf Folienlyseplatten mit hitzeinaktivierten Zellen von *L. innocua* ProCC S1147 sv 6a (3.5.2). Dieser Ansatz wird im Folgenden als 1147-Ansatz bezeichnet. Es waren 1057 Klone gewachsen, dies entspricht dem 2,9fachem der möglichen 361 Varianten.

In einem weiteren Ansatz sollte untersucht werden, ob die Wahl des Stammes bzw. Serovars im Initial-Screening das spätere Ergebnis aus dem Spezifitäts-Screening beeinflusst. Dazu wurden in einem weiteren Ansatz kompetente *E. coli* M15 Zellen mit den Plasmiden transformiert (3.1.4). Es wurde eine Transformation mit der selben DNA wie im 1147-Ansatz durchgeführt und auf Folienlyseplatten pH 6 mit hitzeinaktivierten Zellen von *L. monocytogenes* ProCC S1095 sv 1/2a plattiert. Dieser Ansatz wird im Folgenden als 1095-Ansatz bezeichnet. Es waren 1320 Klone gewachsen, dies entspricht dem 3,6fachem der möglichen 361 Varianten.

Im initialen *Screening* auf Aktivität wurden die Platten nach Induktion der Proteinexpression zunächst 6 h lang bei 30°C bebrütet und nach weiterer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur bei 4°C gelagert und immer wieder auf Lysehofbildung überprüft. Dabei wurden von beiden Ansätzen alle Klone gepickt, die nach Induktion von einem Lysehof umgeben waren, dies waren im 1147-Ansatz 49 Klone und im 1095-Ansatz 43 Klone.

4.2.1.3 Spezifitäts-Screening

Danach wurde auf Spezifität getestet. Hierzu wurden alle aktiven Varianten auf Lyse der Listerien ProCC S1095 sv 1/2a, S776 sv 4b, S1135 sv 3a, und S1147 sv 6a durch Tüpfeln der Klone auf Lysehofplatten getestet (3.5.1). Die Bebrütung erfolgte zunächst über Nacht bei 30°C und nach weiterer Inkubation bei Raumtemperatur für ca. 10 h wurden die Platten bei 4°C gelagert und weiterhin beobachtet.

Klone des 1147-Ansatzes wurden parallel auf Lysehofplatten mit pH 7 und pH 6 getüpfelt, um zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse der beiden pH-Werte unterscheiden. Spätere *Screening*-Schritte sollten möglichst bei pH 6 durchgeführt werden, um den Bedingungen in vielen Lebensmitteln nahe zu kommen. Da die resultierenden Lysehofbildungen in beiden Fällen vergleichbar waren, wurden die Klone des 1095-Ansatzes nur auf Platten mit pH 6 getestet.

24 Kandidaten des 1147-Ansatzes und 23 Kandidaten des 1095-Ansatzes zeigten ein breites Lysespektrum, d. h. bis auf wenige Ausnahmen wurden auf allen getesteten Listerienstämmen Lysehöfe gebildet.

4.2.1.4 Auswertung

Zur Analyse der lytisch aktiven Domänenkombinationen wurden die Plasmide aus den gepickten Klonen aus dem *Initial-Screening* des 1147-Ansatzes isoliert (3.2.1) und die Inserts mit Hilfe der Primer pQE-prom und pQE-term sequenziert (3.2.10). Tabelle 4.8 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung der 49 gepickten Varianten mit Lyseschemata, Anzahl der mehrfach gefundenen Sequenzen sowie dem zeitlichen Auftreten der Lysehöfe im *Initial-Screening* der Folienlyseplatte.

Insgesamt wurden 21 verschiedene Domänenkombinationen gefunden, davon 12 breit lysierende Konstrukte, darunter auch die Variante L1b (CBDB025-EADP40), bei der es sich wahrscheinlich um ein falsch-positives Ergebnis handelt, da CBD025 keinen der getesteten Serovare binden kann. Möglicherweise wurde hier ein Lysehof der falschen Kolonie zugeordnet. Der Klon A1 beruht auf ungeschnittenem Vektor (pQE60-lib-*ply511*) und wurde nicht weiter einbezogen.

Die Analyse der Sequenzen ergab, dass einige Klone in höherer Zahl gefunden wurden als sie statistisch auftreten sollten. So gab es beispielsweise 7 Klone mit N-terminaler CBD500 und C-terminaler EADP35, wobei nur dreimal so viele Klone betrachtet wurden, wie mögliche Kombinationen der Domänen existieren. Zudem trat CBD500 auffallend häufig an N-terminaler Position auf, was auch auf zu hohe Mengen an CBD500 für Position 1 während der Erstellung der Genbank zurückgeführt werden könnte.

Es ließ sich beobachten, dass Varianten mit identischer Sequenz ein vergleichbares Lysehofschema und zeitliches Auftreten der Lysehöfe im Initial-Screening zeigten (Daten nicht gezeigt). Das zeitliche Auftreten der Lysehöfe schien dabei mit den Löslichkeiten der einzelnen Domänen zu korrelieren. So wurde beispielsweise bei Varianten mit EADP35, welche als Einzeldomäne wenig löslich exprimiert wurde (Tabelle 4.4), erst nach längerer Inkubation ein Lysehof sichtbar.

Tabelle 4.8: Ergebnis des Initial- und Spezifitäts-Screenings der 49 gepickten Varianten des 1147-Ansatzes. Für jede Domänenkombination ist die Anzahl identischer Kandidaten, die zeitliche Bewertung der Lysehofbildung im Initial-Screening (1: Hof nach Induktion bei 3 h 30°C oder bereits vor Induktion; 2: Hof nach Induktion bei 6 h 30°C; 3: Hof nach weiterer Inkubation ÜN bei RT; 4: Hof nach anschließender Lagerung bei 4°C. Bei mehreren Treffern mit selbiger Sequenz wurden die Werte gemittelt) sowie die Lysehofbildung bei pH 7 angegeben. Die Anzahl an „+“ gibt die Größe der Lysehöfe an, bei „(+)“ waren nur schwache Lysehöfe zu sehen.

Kandidat	Initial-Screening		Lysehofbildung bei pH7				Sequenzierung	
	Anzahl	Zeitlich	S1095 sv 1/2a	S1135 sv 3a	S776 sv 4b	S1147 sv 6a	Position 1	Position 2
Kandidaten mit breitem Lyse-Spektrum								
Y1	1	2	++++	+++	++++	++++	EAD511	CBD511
A1	1	1	+++	+++	++	+++	Ply511 (Vektor)	
N1	1	1	++	+++	++	++	CBD511	EAD511
J1	2	1	+	+	+	+	CBD511	EADPSA
M2	1	2	(+)	+	(+)	(+)	EAD511	CBD40L
K1	1	1	++	+++	+	++	EADP40	CBD511
Q3	1	4	+	+	(+)	(+)	CBD511	EADP40
M1	3	1	+++	+++	++	+++	EAD500	CBD511
T1	3	1	++++	+++	+++	+++	CBD511	EAD500
J8	5	4	(+)	+	(+)	(+)	EADP35	CBD511
J10	2	3	++	++	++	++	CBD511	EADP35
J3	2	2	(+)	(+)	(+)	++	MurAVar2	CBD511
L1b	1	1	+	+	(+)	(+)	CBDB025	EADP40
Kandidaten mit partiellem Lyse-Spektrum								
S2	1	3			+++	+++	EAD511	CBD500
J2a	3	2			+	+	CBD500	EAD511
D1	5	3			(+)	(+)	CBD500	EADPSA
A2	1	1					CBD500	EADB054
N2	1	3			++	++	EAD500	CBD500
J2b	1	1			++	+	CBD500	EAD500
J7	7	4			+	+	CBD500	EADP35
D3	4	3	+	(+)			EAD511	CBD006
J5	2	3					CBDB006	EADPSA

Spezifität EAD (putativ)
Amidase
L-Ala-D-Glu-Peptidase
D-Glu-meso-DAP-Peptidase
Lysozym
Glucosaminidase

Bindespezifitäten der CBDs			
CBD	sv 1/2a	sv 4b	sv 6a
CBD511	+	+	+
CBDB040	+	+	+
CBD500		+	+
CBDB006	+		
CBDB025			

Da viele der gefundenen Kombinationen einer bestimmten EAD und einer bestimmten CBD sowohl mit N- als auch mit C-terminaler CBD vorlagen, hatte die Reihenfolge dieser Domänen auf die gefundene Lyseaktivität der 2-Domänen Varianten weniger Auswirkung. Jedoch beeinflusste die Reihenfolge vermutlich die Löslichkeit der Gesamtkonstrukte und

folglich auch die Größe der Lysehöfe, denn Varianten mit N-terminaler, unlöslicher EADP35 und C-terminaler CBD511 bildeten kleinere Lysehöfe als Varianten mit N-terminaler CBD511 und C-terminaler EADP35.

Diese Abschätzungen der Löslichkeiten der Konstrukte sollten für die Auswahl von Kandidaten für das weitere *Screening* keinen Einfluss haben, sondern als Orientierung für die Auswertung späterer *Screening*-Ergebnisse dienen. Deshalb wurden zeitliches Auftreten und Größe der Lysehöfe in der 3-Domänen Genbank nicht mehr gewertet.

Des Weiteren entsprach die Fähigkeit zur Lysehofbildung auf verschiedenen Serovaren den Bindespektren der korrespondierenden CBDs. Im Hinblick auf breit lysierende 2-Domänen Proteine war zu erwarten, dass eine der drei eingesetzten Breitspektrum-CBDs, nämlich CBD511 oder eine der CBDP40-Varianten, in diesen Konstrukten enthalten wären. Wie die Sequenzierung zeigte, besaßen diese Konstrukte in den meisten Fällen CBD511 und nur eine Variante enthielt CBDP40L. Die Analyse der Daten zeigte zudem, dass die Positivkontrolle, nämlich N-terminale EAD511 mit C-terminaler CBD511, die dem breit lysierendem Wildtyp-Endolysin Ply511 entspricht, im Konstrukt Y1 gefunden wurde. Das Produkt aus EADP40 mit einer CBDP40-Variante würde hinsichtlich der Domänenkombination dem Wildtyp-Protein PlyP40 entsprechen, wurde jedoch im *Screening* nicht gefunden.

Bezüglich der serovarspezifisch lysierenden Proteine sollte das Picken von Varianten mit CBD500 im Vergleich zu CBDP35, CBD006 und CBDB025 begünstigt sein, da das Initial-*Screening* auf Listerien ProCC S1147 mit Serovar 6a erfolgte und CBD500 die einzige der CBDs mit partiellem Bindespektrum ist, die an ProCC S1147 sv 6a bindet. Es wurden allerdings auch 6 Konstrukte mit CBD006 gepickt. CBD006 bindet an sv 1/2a und 3a, was mit den Ergebnissen des nachfolgenden *Screenings* auf Spezifität übereinstimmt. Vermutlich waren diese Varianten sehr gut exprimiert und tauchten daher im Initial-*Screening* auf.

Die beiden Konstrukte CBD006-EADPSA (J5) und die Variante CBD500-EADB054 (A2) verursachten unter diesen Bedingungen nach dem Initial-*Screening* keine Lysehofbildung mehr. Dies war nicht auf fehlende Proteinexpression zurückzuführen, da alle 49 Klone deutlich Expression mit der zu erwartenden Proteingröße besaßen (Daten nicht gezeigt). Hier kommt genauso wie bei L1b eine falsche Zuordnung von Lysehöfen als Erklärung in Frage.

Die Auswertung des Spezifitäts-*Screenings* des 1095-Ansatzes sollte zeigen, ob das *Screening* auf einem anderen Listerien-Serovar zu einem unterschiedlichen Ergebnis der Zusammensetzung der Proteinvarianten führt, insbesondere im Hinblick auf die enthaltenen CBDs.

Um nicht alle Klone sequenzieren zu müssen, wurden sie mittels Kolonie-PCR mit domänenspezifischen Primerpaaren systematisch auf die enthaltenen Domänen überprüft. Die 23 Kandidaten mit breitem Lysespektrum besaßen alle Konstrukte aus CBD511, die mit den selben EADs wie auch im 1147-Ansatz fusioniert war, jedoch konnte im 1095-Ansatz zusätzlich die Variante EADPSA-CBD511 nachgewiesen werden. Somit war in diesem *Screening* kein einziger Klon mit einer CBDP40-Variante enthalten.

Die Analyse der Varianten mit partiellem Lysespektrum aus dem 1095-Ansatz zeigte, dass in diesen nur die Zellbindedomänen CBD006 und CBDP35 enthalten waren, welche den im *Initial-Screening* verwendeten Stamm S1095 sv 1/2a binden können.

Insgesamt wurden somit beim *Initial-Screening* auf sv 6a mit ProCC S1147 die hier bindenden CBDs CBD511, CBDP40L und CBD500 neben den nicht bindenden CBDB025 und CBD006 gepickt. Beim *Initial-Screening* auf sv 1/2a mit ProCC S1095 fanden sich nur bindende CBDs: CBD511, CBDP35 und CBD006. Somit beeinflusste der im *Initial-Screening* verwendete Listerienstamm lediglich die Häufung serovarspezifischer CBDs innerhalb der gepickten Konstrukte. Bezüglich breiter Varianten innerhalb der anfänglich gepickten Klone lieferten beide Ansätze vergleichbare Ergebnisse und beide Stämme waren für das *Initial-Screening* geeignet.

Abgesehen vom Konstrukt CBDB025-EADP40 des 1147-Ansatzes führte der jeweils angeschlossene Spezifitäts-*Screening* ausschließlich zu Kandidaten mit breit bindender CBD.

In Tabelle 7.2 im Anhang findet sich eine Zusammenstellung der positiven Kandidaten des Spezifitäts-*Screenings* zusammen mit den *Screening-Ergebnissen*.

4.2.1.5 Validierung

Um die Vielfalt der Klonierungsprodukte zu zeigen, müssten unabhängig von der Lysehof-Bildung Klone sequenziert und ausgewertet werden. Aus zeitlichen Gründen wurden stattdessen nach der Analyse der positiven Kandidaten weitere, ohne Lysehöfe betrachtet. Hierzu wurden 15 Klone des 1147-Ansatzes und 15 Klone des 1095-Ansatzes ohne Lysehofbildung gepickt und ihre Inserts sequenziert (3.2.10). Tabelle 4.9 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Validierungsklone.

Insgesamt zeigte sich eine höhere Vielfalt der Domänenkombinationen in den Validierungsklonen als bei den positiv *gescreenten* Kandidaten. So fanden sich auch Ligationsprodukte aus 2 EADs oder 2 CBDs. Zudem enthielten die Validierungsklone keine Häufungen und nur ein Protein (CBD500-MurA) wurde zweimal gepickt. Es gab keine Domäne, die weder bei den *gescreenten* 2-Domänen Proteinen noch bei den Validierungsklonen gefunden wurde.

Tabelle 4.9: Vorkommende Domänenkombinationen in den Validierungs-Klonen. Nicht enthalten sind die beiden Validierungs-Klone mit Fremd-DNA.

		Summe	0	2	5	0	2	2	2	3	1	0	1	2	2	2	1	0	1	1	0	3
Summe	C-Terminus	N-Terminus	Sle1	Cellosyl	MurA	MurA-Var2	IspC	EADP35	EADB054	EADPSA	EAD511	EAD500	EADP40	EADGp29	CBD006	CBD025	CBD511	CBD500	CBDP35	CBDP40nls	CBDP40L	
4	Sle1			1		1	1														1	
1	Cellosyl									1												
0	MurA																					
1	MurA-Var2														1							
0	IspC														1							
4	EADP35		1						1	1						1						
0	EADB054																					
0	EADPSA																					
2	EAD511								1					1								
2	EAD500			1							1											
1	EADP40									1												
3	EADGp29						1							1							1	
1	CBD006					1																
2	CBD025			1											1							
0	CBD511																					
4	CBD500			2									1						1			
0	CBDP35																					
1	CBDP40nls																				1	
2	CBDP40L		1															1				

Zwei Klone des 1147-Ansatzes enthielten Ligationsprodukte aus einer N-terminalen Domäne und C-terminaler DNA, die nicht zur Genbank gehörte. Sequenzhomologien ließen darauf schließen, dass diese Verunreinigungen von Restriktionsfragmenten des pREP4-Plasmids stammen. Diese sind möglicherweise beim Verdau von Plasmidpräparationen des pQE60-lib-Vektors aus *E. coli* M15 entstanden und konnten nicht abgereinigt werden.

Validierungsklone aus dem 1095-Ansatz enthielten Varianten, die theoretisch auf S1147 sv 6a Lysehöfe bilden hätten können, wie beispielsweise CBD500-EADP40, und umgekehrt waren Validierungsklone des 1147-Ansatz enthalten, die möglicherweise auf S1095 sv 1/2a Aktivität gezeigt hätten.

4.2.2 3-Domänen Kombinationen

4.2.2.1 Ligation

Für die Konstruktion der 3-Domänen Proteine diente als Ausgangsmaterial die Hälfte der restlichen zwei Drittel des Ligationsansatzes der 2-Domänen-Proteine (4.2.1.1). Hier waren Domänen-Fragmente für Position 1 und 2 bereits über *Pst*I aneinanderligiert und über Biotin an die Streptavidin-Partikel gebunden. Der 3'-Terminus der Position 2-Fragmente war verdaut. Rein rechnerisch lagen 0,02 pmol je Domäne je Position (1 und 2) im Ansatz vor. DNA für die Position 3 (am 5'-Terminus *Sa*II-verdaut) wurde im 10fachen Überschuss zuge-

geben und anligiert. An Partikel gebundene Ligationsprodukte wurden mit *EcoRV* am 3'-Ende der Position 3 verdaut. *NcoI*-Verdau trennte die DNA von den magnetischen Partikeln und nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym erfolgte die Ligation in den pQE60-lib-Vektor über *NcoI* und *EcoRV*-Schnittstellen (3.2.14).

4.2.2.2 Transformation und Initial-Screening

Kompetente *E. coli* M15-Zellen (3.1.3) wurden mit den Plasmiden transformiert (3.1.4) und auf Folienlyseplatten pH 6 (3.5.2) mit hitzeinaktivierten Zellen von ProCC S1095 sv 1/2a plattiert. Es wurden 15497 Klone analysiert, dies entspricht einem 2,25fachen der möglichen 6859 Varianten. Um diese Anzahl an Klonen zu erreichen, musste 20-mal transformiert werden, dabei wurde für die Ligationen immer dieselbe Insert-DNA verwendet.

Im initialen *Screening* auf Aktivität gegen *Listeria monocytogenes* S1095 sv 1/2a wurden die induzierten Platten analog zur Vorgehensweise wie bei den 2-Domänen Proteinen zunächst bei 30°C und danach bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Insgesamt zeigten 1041 Klone Lysehofbildung, dies entspricht 6,7 % der analysierten Klone mit 3-Domänen Proteinen.

4.2.2.3 Spezifitäts-Screening

Danach wurde auf Spezifität getestet. Hierzu wurden alle Klone mit aktiven Varianten auf Lyseplatten mit pH 6 mit Listerien ProCC S1095 sv 1/2a, S776 sv 4b, S1135 sv 3a, und S1147 sv 6a getüpfelt (3.5.1). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C und nach weiteren 10 h bei Raumtemperatur wurden die Platten bei 4°C gelagert und weiterhin auf Lysehofbildung analysiert. 538 Kandidaten zeigten zumindest auf 3 der 4 Serovare Lysehöfe. Bereits bei den 2-Domänen Proteinen war bei der Sequenzierung ein Konstrukt gefunden worden, bei dem es sich um ungeschnittenen Vektor mit dem Insert *ply511* handelte. Klone mit ungeschnittenem Vektor liefern auf allen Serovaren Lysehöfe und um diese von den aktiven 3-Domänen Proteinen unterscheiden zu können, wurden alle breit lysierenden 3-Domänen Proteine im Expressionstest bei 30°C analysiert (3.3.1). Eine Abgrenzung zu *Ply511* ist möglich, da *Ply511* mit einer Größe von 36,5 kDa exprimiert wird, funktionelle 3-Domänenproteine mit breiter Serovarspezifität haben mindestens 50 kDa. Varianten mit einem Molekulargewicht von 36,5 kDa wurden aussortiert. Insgesamt enthielten 286 der 538 breit lysierenden Kandidaten ungeschnittenen Vektor, dies entspricht 1,85 % der plattierten Klone und es verblieben 252 3-Domänen Proteine für weitere Analysen.

Die Zahl der Klone mit ungeschnittenem Vektor war überraschend hoch und die Identifizierung dieser Klone trug deutlich zur Bearbeitung des Spezifitäts-Screenings bei, jedoch war dies eine wichtige Information über die tatsächliche Größe der Genbank.

Zukünftig sollte daher zur Abschätzung der Klone mit ungeschnittenem Vektor ein Marker wie beispielsweise β -Galactosidase verwendet werden, wodurch X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid) in den Agar-Platten umgesetzt wird und diese Klone durch Blaufärbung kennzeichnet.

Allerdings konnten durch den Expressionstest auch Doppelklone mit mehreren Expressionsbanden identifiziert werden, die anschließend vereinzelt und zur Identifizierung von den enthaltenen breit lysierenden Varianten erneut auf Lysespektrum untersucht wurden.

4.2.2.4 Auswertung

Zur Gewinnung von Kenntnis über funktionelle 3-Domänen Proteine wurden alle 252 Klone sequenziert (3.2.10). 22 der Sequenzen waren trotz wiederholter Sequenzierung nicht lesbar. Innerhalb der verbleibenden 230 Varianten fanden sich 157 verschiedene Varianten. Darunter waren 5 ohne CBD und 23 mit nur einer serovarspezifische CBD enthalten (CBD006, CBD500 oder CBDP35). Warum diese Varianten durch das Spezifitäts-Screening nicht ausgeschlossen wurden, kann an dieser Stelle nicht eindeutig erklärt werden. Möglicherweise waren sie bei den verwendeten *Screening*-Temperaturen sehr stark löslich oder sehr gut exprimiert, so dass die Lysehöfe allein auf den EADs beruhten. Es konnte jedoch zumindest bei dem 1147-Ansatz der 2-Domänen Proteine gezeigt werden, dass 25 Treffer des Initial-Screenings mit serovarspezifischer CBD durch das Spezifitäts-Screening aussortiert wurden.

Demnach fanden sich 129 unterschiedliche Sequenzen mit einer theoretisch breiten Zellbindefähigkeit (CBD511, CBDP40-Variante, Kombination CBD500-CBDP35 oder CBD006-CBD500). Tabelle 4.10 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des Sequenzierungsergebnisses und Tabelle 7.2 im Anhang beinhaltet eine Auflistung der redundanzfreien Klone.

Tabelle 4.10: Zusammensetzung des Sequenzierungsergebnisses der 230 sequenzierbaren Klone.

Auswertung	Mit Redundanz	Ohne Redundanz
Anzahl auswertbarer Sequenzierungen	230	157
→ ohne CBD	5	5
→ serovarspezifische CBD	28	23
→ breite CBD(-Kombination)	197	129

Da bei den 5 Varianten ohne CBD und den 23 verschiedenen Kandidaten mit einer CBD, die nur bestimmte Serovare bindet, nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um falsch Positive handelt, wurden sie vorsorglich für die nachfolgende statistische Auswertung nicht mit einbezogen, um diese nicht zu verfälschen.

Analyse der Redundanz innerhalb der restlichen 197 Sequenzen ergab, dass 2 Kandidaten fünfmal, 2 Kandidaten viermal, 12 Kandidaten dreimal und 30 Kandidaten zweimal auftraten, die restlichen 83 waren Einzelsequenzen.

Alle eingesetzten Domänen wurden in diesen 129 Konstrukten gefunden, doch gab es nicht jede Domäne an jeder Position. Es fehlten Kandidaten mit EADB054 und IspC am N-Terminus, CBD025, Cellosyl und IspC in der Mittelposition sowie CBDP35 am C-Terminus. Allerdings war in den 23 bzw. 5 Klonen mit serovarspezifischer bzw. ohne Zellbindedomäne CBDP35 am C-Terminus 4-mal und Cellosyl in der Mitte 2-mal zu finden.

Abbildung 4.19 stellt die Häufigkeit und Position (N-terminal, mittig oder C-terminal) der 19 eingesetzten Domänen in den 129 Varianten dar.

Rein statistisch sollte jede Domäne in 129 Proteinen 20,4-mal vorkommen. CBD511 und CBDP40nls sowie EADP40, EAD500 und EAD511 sind damit deutlich überrepräsentiert. CBDP40L, MurA-Var2 und EADPSA sind entsprechend der zu erwartenden Häufigkeit vertreten. Alle anderen Domänen sind in den *gescreenten* Kombinationen unterrepräsentiert.

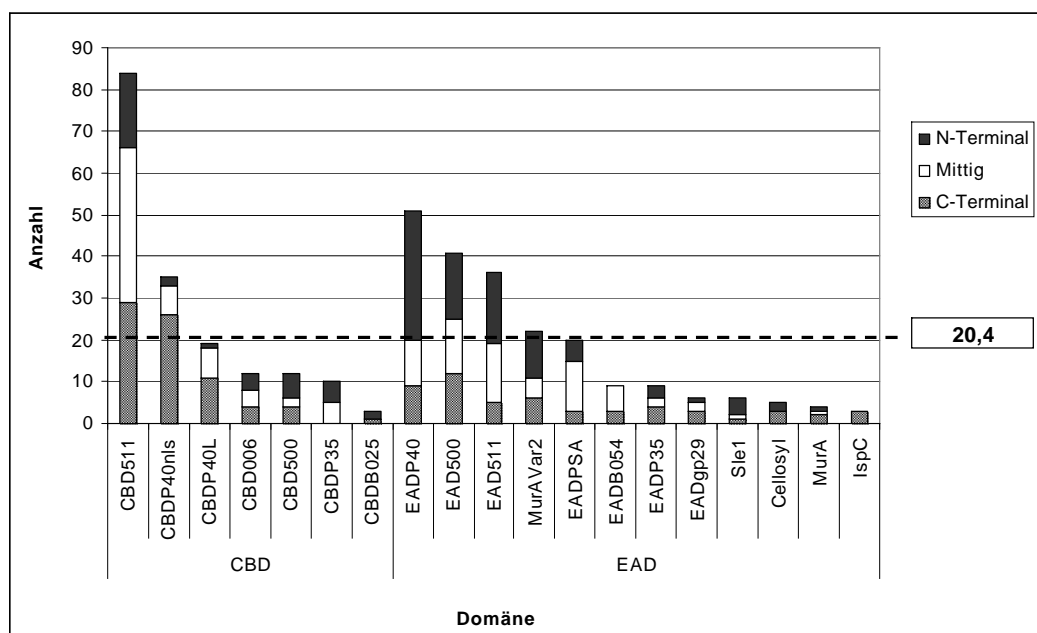


Abbildung 4.19: Häufigkeit und Position der Domänen in den Klonen ohne Redundanz. Die gestrichelte Linie zeigt die statistische Häufigkeit einer Domäne in 129 3-Domänen Proteinen von 20,4-mal an.

Wie Abbildung 4.20 zeigt, schien es unter Betrachtung der gesamten EADs und CBDs zunächst eine Präferenz dahingehend zu geben, dass EADs vermehrt am N-Terminus und CBDs vermehrt am C-Terminus standen. Dies würde bis auf EADgp29, Sle1 und Cellosyl der natürlichen Anordnung entsprechen. Wurden jedoch die Domänen des Wildtyp-Endolysins PlyP40 exkludiert, waren die Häufigkeiten von EADs und CBDs an den drei Positionen in etwa vergleichbar. Somit war hauptsächlich für EADP40 ein deutlich erhöhtes Vorkommen

am N-Terminus und für die CBDP40-Varianten ein bevorzugtes Vorkommen am C-Terminus zu verzeichnen.

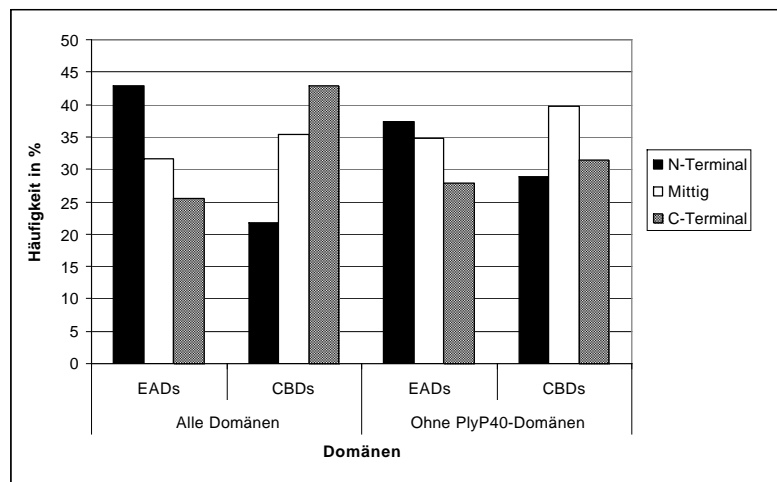


Abbildung 4.20: Allgemeine Häufigkeit der EADs und CBDs an den Positionen N-Terminus, Mitte und C-Terminus mit und ohne PlyP40-Domänen.

Dieser Umstand führte zur genaueren Betrachtung der Kandidaten, die sowohl EAD als auch CBD des Wildtyp-Proteins von PlyP40 beinhalteten und auch von den Kandidaten mit gleichzeitig EAD und CBD von Ply511.

Die Proteine mit EADP40 und CBDP40nls bzw. CBDP40L wurden hierfür gemeinsam analysiert, obwohl CBDP40nls deutlich häufiger in den *gescreenten* Proteinen gefunden wurde als CBDP40L. Da jedoch beide CBDP40-Varianten als alleinige CBDs vorkamen, schienen beide funktionell zu sein. Somit ergaben sich 25 verschiedene PlyP40-Varianten, darunter befanden sich zwei Kandidaten mit zweimal EADP40 und ein Protein mit zwei CBDP40-Varianten. Unter den 23 Varianten von Ply511 gab es keine mit einer weiteren EADP511 oder CBD511. In beiden Fällen schien keine bestimmte Domäne bevorzugt als dritte Domäne aufzutreten, und es fanden sich keine Kombinationen mit EADP35, MurA und Cellosyl, die aber insgesamt selten auftraten.

Die Anordnung der Ply511-Domänen war dabei relativ gleichmäßig auf alle drei Positionen verteilt mit einer geringen Tendenz der EAD511 zu N-Terminus und Mitte sowie der CBD511 zu Mitte und C-Terminus (Abbildung 4.21-B). Zusätzliche CBDs traten nur N- und C-terminal aber nicht mittig auf, wohingegen weitere EADs an allen Positionen zu finden waren (Daten nicht dargestellt).

Bei den PlyP40-Varianten verhielt es sich anders. So waren hier zwar zusätzliche EADs auch an allen drei Positionen zu finden, CBDs als dritte Domäne befanden sich jedoch entweder mittig oder C-terminal (Daten nicht dargestellt). Zudem wurde die ungleich verteilte Anordnung der PlyP40-Domänen auch hier sehr deutlich, so war EADP40 zu 70 % am N-Terminus und die Varianten der CBDP40 zu 65 % am C-Terminus zu finden (Abbildung

4.21-A), wodurch sich die bereits beobachtete Tendenz bei der Betrachtung aller Domänen bestätigte.

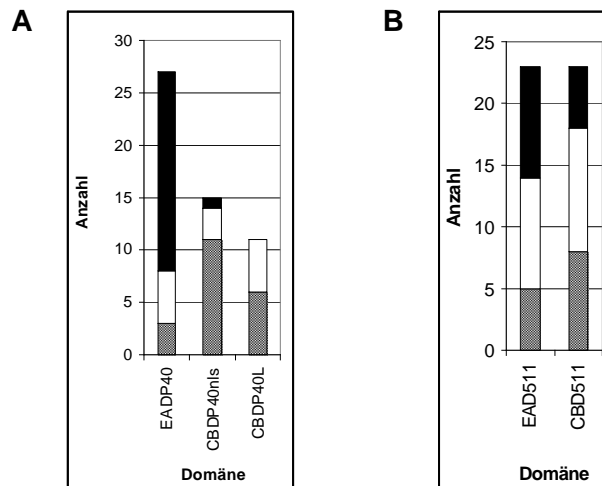


Abbildung 4.21: Position von EADP40 und CBDP40L bzw. CBDP40nls in den PlyP40-Varianten mit 3 Domänen (A) sowie von EAD511 und CBD511 in Ply511-Varianten mit 3 Domänen (B). Zu (A): Zwei Konstrukte enthielten zweimal EADP40 und ein Protein enthielt eine zwei CBDP40-Varianten. Schwarz: N-terminal, weiß: mittig, schraffiert: C-terminal.

Des Weiteren wurden nicht nur die Domänen-Häufigkeiten und -Positionen sondern auch deren Kombinationen untereinander untersucht. Hierfür ist in Tabelle 4.11 dargestellt, wie oft zwei Domänen innerhalb der 3-Domänen Proteine gemeinsam vorkamen. In einem 3-Domänenprotein X-Y-Z gibt es beispielsweise drei verschiedene Datenpunkte: X+Y, X+Z und Y+Z.

Die Domänen CBD511 (rot) und EADP40 (hellblau) wurden mit jeder anderen Domäne zumindest einmal gefunden. EAD511 (gelb), EAD500 (grün) und CBDP40-Varianten (dunkelblau) waren mit fast allen Domänen kombiniert. Besonders häufig waren die Kombinationen von EAD500 mit CBD511 (31-mal), EADP40 mit CBDP40-Varianten (12-mal mit CBDP40L, 16-mal mit CBDP40nls), EADP40 mit CBD511 (26-mal), EAD511 mit CBD511 (23-mal), MurA-Var2 mit CBD511 (13-mal) und EAD511 mit CBDP40nls (12-mal). Darunter waren somit auch die zu erwartenden Domänen-Kombinationen der breiten Wiltyp-Proteine Ply511 (EAD511 mit CBD511) und PlyP40 (EADP40 mit CBDP40-Varianten) zu finden. Das bedeutet, dass die jeweils dritte Domäne die Funktion der Wildtyp-Kombinationen nicht deutlich verschlechterte. Die Häufigste Kombination von EADs war EADP40, ein putatives Lysozym, mit EAD500, eine Peptidase.

Es wurden genau zwei Kandidaten mit einer Kombination von zwei sich im Bindespektrum ergänzenden, serovarspezifischen CBDs gefunden, die keine CBD511 und keine CBDP40-Variante enthielten. Dies waren EcoFR10 mit CBD500-CBDP35-Cellosyl und EcoV3 mit EADPSA-CBD006-CBD500.

Tabelle 4.11: Anzahl der Kombinationen zweier Domänen innerhalb der 3-Domänenproteine. Häufige Kombinationen wurden fett markiert. Als Berechnungsgrundlage dienten die 129 redundanzfreien, *gescreenten* Varianten mit breiter CBD(-Kombination).

Domäne	CBD006	CBD500	CBD511	CBDB025	CBDP35	CBDP40L	CBDP40nls	EAD500	EAD511	EADB054	EADgp29	EADP35	EADP40	EADPSA	IspC	MurA	MurAVar2	Cellosyl	Sle1
CBD006		1	6			2	3	4	1				4	2			1		
CBD500			7		1	2	1	2	4	1			1	3				1	
CBD511			1	3	6	2	6	31	23	7	3	8	26	10	3	3	13	4	5
CBDB025									2				1						
CBDP35							3	3	2			1	3					1	
CBDP40L							1	4	3	2			12	6			4		
CBDP40nls							1	8	12	1	3	2	16	5		1	5		1
EAD500								2	3	1	1	1	8	2		2	5	1	2
EAD511									1	2	3		4	3	2		5		1
EADB054													2				1		1
EADgp29													1	1					
EADP35													3				2	1	
EADP40													4	2	1	1	6	2	1
EADPSA														1		1	2		1
IspC																			
MurA																			
MurAVar2																			
Cellosyl																			
Sle1																			

4.2.3 Screening auf gewünschte Eigenschaften

Im weiterführenden *Screening* wurden die redundanzfreien Klone der 2- und der 3-Domänen Proteine gemeinsam analysiert. Verwendet wurden von den 2-Domänen Proteinen zum einen EADPSA-CBD511 aus den 16 Varianten der Prinzipielltestung (Konstrukt F, 4.1.4.3) und die 12 verschiedenen, *gescreenten* Kandidaten mit breit bindenden CBDs des 1147-Ansatzes unter Ausschluss von A1, welches ungeschnittenen Vektor enthielt (4.2.1.4). Von den 3-Domänen Proteinen wurden die 129 Varianten mit breiter CBD (bzw. CBD-Kombination), die 23 mit serovarspezifischer CBD sowie die 5 Enzyme ohne CBD untersucht. Hier sollte geklärt werden, ob es sich tatsächlich um falsch positive Kandidaten handelt und wenn ja, ob diese im weiterführenden *Screening* ausgeschlossen werden können. Als Referenzen wurden Klone getestet, die die breiten Wildtyp-Proteine Ply511 und PlyP40 exprimierten. Die Screeningschritte sollten mögliche Parameter testen, die beim Einsatz in der Lebensmittelherstellung relevant sein können. Sie stellen keine starre Abfolge dar, sondern können je nach Anwendungsziel variiert und stringenter bewertet werden. Deshalb wurden die ersten Schritte nicht nacheinander, sondern parallel mit allen Kandidaten aus dem Spezifitäts-*Screening* durchgeführt.

Zunächst wurde die Aktivität bei aciden pH-Werten untersucht, da die meisten Lebensmittel saure pH-Werte haben sowie auf Aktivität in Gegenwart von EDTA, welches zweiwertige Ionen komplexiert und dadurch Enzyme wie Proteasen inaktiviert, die ionische Cofaktoren

besitzen. Aus diesem Grund wird EDTA in bestimmten Lebensmitteln zur Konservierung und zur Verhinderung von Geschmacks-, Farb- und Texturveränderungen eingesetzt. Die zugelassenen Höchstgrenzen variieren bei verschiedenen Lebensmitteln. Innerhalb der USA erlaubt die *Food and Drug Administration* beispielsweise bis zu 800 ppm (FDA Food Additive Regulation 21 CFR 172.120 und 21 CFR 172.135), was einer Konzentration von 2,7 mmol entspricht, in der Europäischen Union liegt die maximale Dosis mit 0,86 mmol niedriger (ZZuIV. Anlage 4 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Begrenzt zugelassene Zusatzstoffe).

Die Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 6 diente hier als Vergleichswert. Mit den Varianten mit den besten Ergebnissen sollte das *Screening* fortgesetzt werden, wobei der Schwerpunkt auf Aktivität in saurem pH gelegt werden sollte, da dies in den meisten Lebensmitteln und somit für die spätere Anwendung am meisten von Bedeutung ist. Nach Testung auf Listerien-Inhibition in Wachstumsmedium sollten Kandidaten für anschließende Proteinreinigung- und Charakterisierung ausgewählt werden. Abbildung 4.22 gibt einen Überblick über die folgenden *Screening*-Schritte.

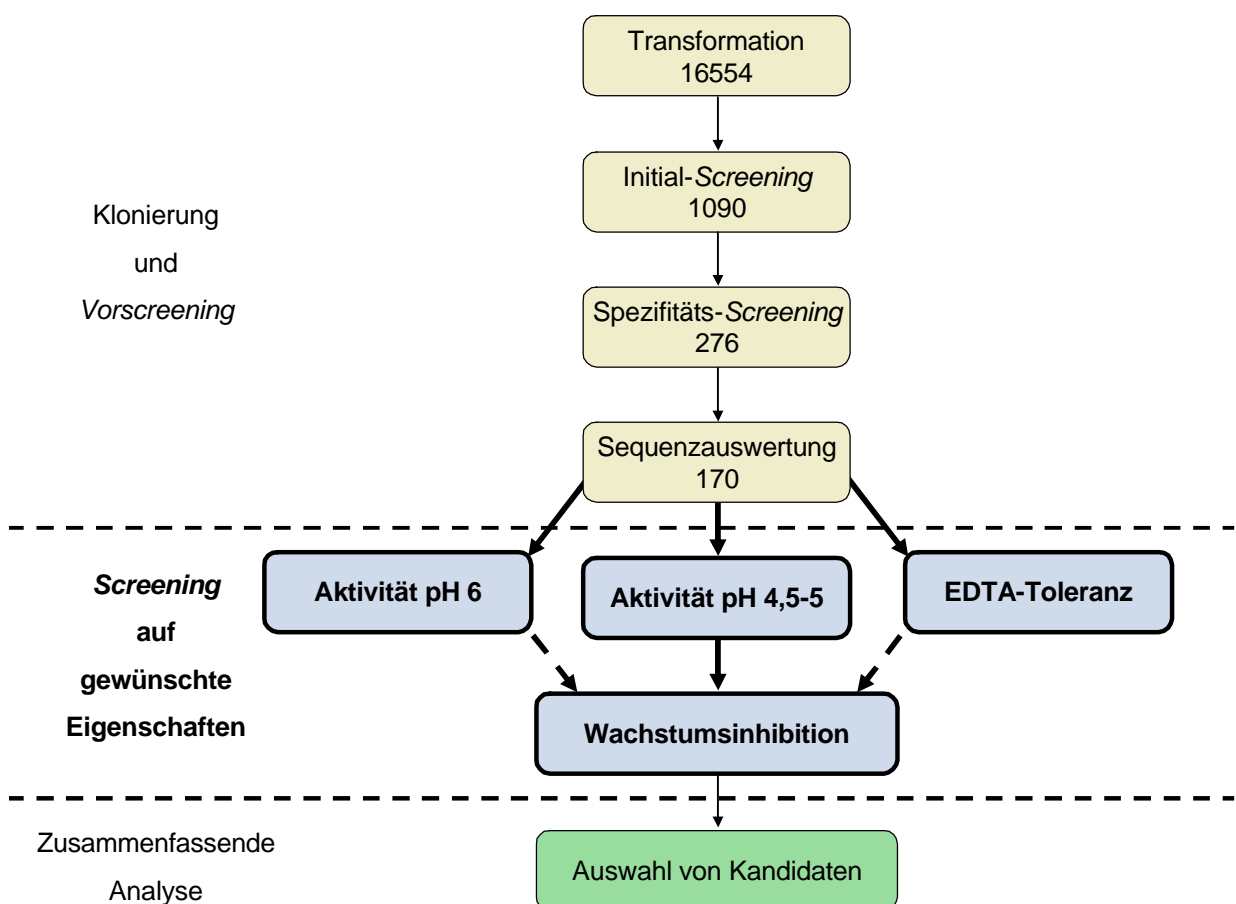


Abbildung 4.22: Schema zum folgenden *Screening*-Verlauf der 2- und 3-Domänen Proteine. Ab *Screening* auf gewünschte Eigenschaften (blau) wurden die 2- und 3-Domänen Proteine parallel analysiert. Die Zahlenwerte umfassen 2- und 3-Domänen Proteine, als Grundlage der 2-Domänen Proteine diente der 1147-Ansatz.

4.2.3.1 Aktivität im Flüssiglysetest

Im Flüssiglysetest sollte die Aktivität der Kandidaten bei saurem pH und in Gegenwart von EDTA bestimmt werden.

Die Durchführung erfolgte über Bestimmung der OD-Abnahme von hitzeinaktivierten Zellen von S1095 sv 1/2a (3.1.6) mit Überstand von induziertem *E. coli*-Aufschluss der Kandidaten (3.5.3), wodurch die Geschwindigkeit der OD-Abnahme stark von der Expression und Löslichkeit der Proteine abhängig war. Um diese Daten trotzdem interpretieren zu können, wurde zunächst ein Flüssiglysetest bei pH 6 durchgeführt und die erhaltenen Messergebnisse wurden als Vergleichswert zu den OD-Abnahmen bei den nächsten *Screening*-Schritten verwendet. Für eine Bewertung der einzelnen *Screening*-Schritte führte die Messung bei pH 6 somit nicht zum Ausschluss von Kandidaten. Trotzdem wurden diejenigen Kandidaten, bei denen schnelle OD-Abnahme beobachtet werden konnte, bestimmt und Kandidaten, die im Folgenden zusätzlich Toleranz von geringeren Mengen an EDTA aufwiesen, wurden weiterverwendet. Als schnelle OD-Abnahme wurde bezeichnet, wenn das Verhältnis von der Steigung der OD-Abnahme von Zellaufschluss mit Ply511 zu der Steigung der OD-Abnahme von Zellaufschluss mit der Variante zwischen 0,4 und 1 lag. Tabelle 7.2 zeigt die Ergebnisse für alle getesteten Proteine.

Bei insgesamt 12 Varianten war in 1,5 h keine messbare OD-Abnahme zu verzeichnen (EcoFP8, EcoFL27, EcoGC10, EcoX2, EcoK8, EcoO2, EcoFQ9, EcoGB20, EcoR3, EcoGR8, EcoGT7, EcoFN11) und die Erstellung neuer Zellaufschlüsse und Wiederholung der Testung mit 6 dieser Kandidaten zeigten wieder dasselbe Ergebnis. Diese Proteine wurden vermutlich nur äußerst gering löslich exprimiert, und können somit nicht über dieses Testformat weiter *gescreent* werden. Bei den restlichen 158 Kandidaten war durchaus eine OD-Abnahme zu beobachten und die Verwendung der Zellaufschluss-Überstände für Flüssiglysetestungen war dadurch möglich.

Nach dem oben genannten Kriterium wurden davon 36 Varianten als „schnell“ bewertet. Neben dem Wildtyp-Protein PlyP40 waren das fünf der 13 eingesetzten 2-Domänen Proteine (Y1, N1, K1, Q3 und M1) und 31 der 157 getesteten 3-Domänen Proteine, 5 davon mit alleiniger serovarspezifischer CBDs (CBD006 bzw. CBDP35 in EcoGY10, EcoGA7, EcoGX7, EcoGB9, EcoFN1), welche jedoch den Teststamm S1095 sv 1/2a binden können. Kandidaten ohne CBD oder mit alleiniger CBD500 (bindet an sv 4, 5, 6) waren nicht enthalten. Zukünftig könnte dieser Test auf mehrere Serovare erweitert werden, um gegebenenfalls unerwünschte Varianten auszuschließen. Von den 31 verschiedenen 3-Domänen Proteinen hatten nur 2 eine Doppel-CBD (EcoGE1 und EcoX1).

Es konnten anhand der hier aufgelisteten Kandidaten keine einheitlichen Prinzipien abgeleitet werden und eine Interpretation der Resultate ist durch die Abhängigkeit der Testung von der Proteinexpression und -löslichkeit nicht sinnvoll. Allerdings könnte die

Tatsache, dass unter diesen Kandidaten keine der 5 Varianten ohne CBDs gefunden wurden, weniger mit zu geringer Löslichkeit dieser Proteine zusammenhängen, sondern eher damit, dass bei der Testung auf OD-Abnahme im Flüssiglysetest im Gegensatz zum Plattenlysetest die Aktivität der Zellbindedomäne stärker ins Gewicht fällt. Denn im Plattenlysetest sind die Zellen im Agar fixiert und bereits eine hohe Konzentration an EADs allein führt nach ausreichender Inkubationsdauer zur Lysehofbildung. Im Flüssigen wird die CBD zur Annäherung der EAD ans Substrat benötigt. Durch die Flüssiglysetestung bei pH 6 wurde daher auf tatsächliche Funktionalität der CBDs und eine geeignete Verknüpfung mit den EADs getestet.

4.2.3.2 Aktivität bei saurem pH

Unabhängig von den Ergebnissen der Lysegeschwindigkeiten bei pH 6 wurden alle 170 Kandidaten aus dem Spezifitäts-Screening (4.2.1.3, 4.2.2.3) auf Lyse bei acidem pH getestet (3.5.3). Zum Vergleich dienten Klone mit den Wildtyp-Proteinen Ply511 und PlyP40. Es wurden dieselben Aufschluss-Überstände wie zur Messung der OD-Abnahme bei pH 6 verwendet (4.2.3.1) und in Puffer mit pH 5 und hitzeinaktivierten Zellen von S1095 sv 1/2a gemessen. Proteine, die bei pH 5 eine vergleichbare Lyse wie bei pH 6 zeigten (Verhältnis OD-Abnahme pH 6 zu pH 5 von 0,4-1), wurden als aktiv bei pH 5 bewertet. Diese Kandidaten wurden anschließend mit demselben Aufschluss-Überstand bei pH 4,5 vermessen und analog ausgewertet.

Abbildung 4.23 stellt Beispiele von Messergebnissen dar. Aufgeführt sind die Resultate der Zellaufschlüsse mit den Wildtyp-Proteinen PlyP40 und Ply511, der Nullkontrolle sowie der positiv *gescreenten* Kandidaten EcoAA1 und EcoGP4. Die OD-Abnahme durch den Zellaufschluss von EcoAA1 verlief zwar deutlich langsamer als bei den Wildtyp-Proteinen, die Steigung blieb jedoch bei beiden pH-Werten gleich. Die Abnahme der Steigung bei EcoGP4 von pH 6 zu pH 4,5 entsprach genau dem zugelassenen Grenzwert für positive Varianten von 0,4. Bei PlyP40 war die Anfangsgeschwindigkeit bei pH 4,5 im Vergleich zu pH 6 schneller, was mit dem später bestimmten pH-Optimum von 4,5 von PlyP40 übereinstimmt (4.3.2.2), im linearen Bereich unterschieden sich die Geschwindigkeiten nicht mehr. Das pH-Optimum von Ply511 liegt in etwa bei 8, die Lysegeschwindigkeit von Ply511 nahm wie erwartet von pH 6 zu pH 4,5 deutlich ab.

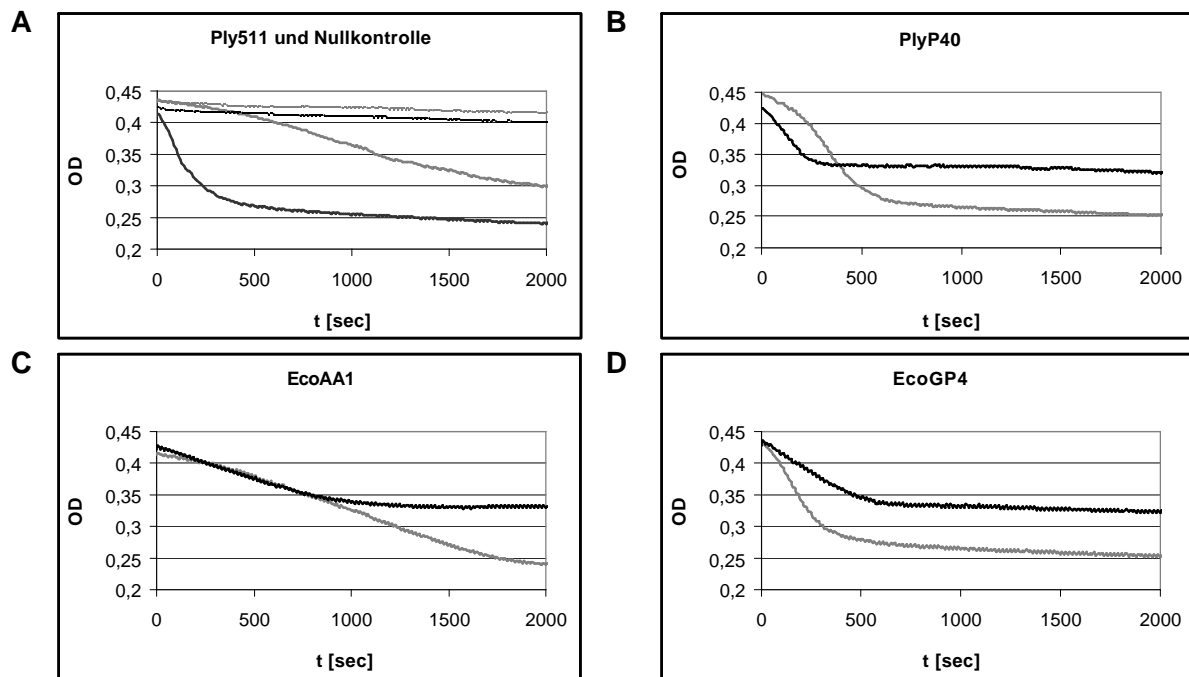


Abbildung 4.23: Beispiele zu Abnahme der OD von hitzeinaktivierten Zellen von S1095 sv 1/2a in Puffer pH 6 im Vergleich zu Puffer von pH 4,5. Getestete Konstrukte: Ply511, PlyP40, EcoAA1 und EcoGP4. (A): Ply511 (ganze Linie) und Nullkontrolle (gestrichelt), (B): PlyP40, (C): EcoAA1, (D): EcoGP4. Schwarz: pH 4,5, grau: pH 6.

Tabelle 4.12 zeigt die 22 bei pH 4,5 und 5 aktiven Kandidaten. Neben dem Vergleichsprotein PlyP40 behielten 1 der 13 untersuchten 2-Domäne Proteine (K1), 3 Proteine mit alleiniger serovarspezifischer CBD (EcoGP8, EcoGA7 und EcoGY10) sowie 18 Proteine mit breiter CBD bzw. CBD-Kombination der getesteten 157 3-Domänen Proteine bei acidem pH vergleichsweise hohe Aktivität. Über die Hälfte der Kandidaten hatten zwei CBDs, in den sequenzierten Klonen ohne Redundanz hatte hingegen nur jedes dritte Protein eine Doppel-CBD. Ein Vertreter ohne CBD war nicht enthalten.

Bis auf 3 Proteine (EcoL4, EcoFR10 und EcoGS17) hatten alle positiven Kandidaten EADP40 allein oder mit einer weiteren EAD kombiniert. Nicht vertreten waren innerhalb der EADs EADB054, EADgp29, IspC, MurA und Sle1.

Tabelle 4.12: Kandidaten mit vergleichbarer OD-Abnahme bei saurem pH wie bei pH 6 im Flüssiglysetest (Verhältnis 0,4-1). +: gute Aktivität bis pH 5; ++: gute Aktivität bis pH 4,5. Wildtyp-Proteine sind grau markiert.

Kandidat	Position 1	Position 2	Position 3	pH 4,5/5	Spezifität EAD (putativ)
EcoGM12	EADP40	CBDP40L	CBDP40nls	+	Amidase
EcoGA7	EADP40	EADPSA	CBDP35	+	L-Ala-D-Glu-Peptidase
EcoGS17	MurA-Var2	CBD511	EADP35	+	D-Glu-meso-DAP-Peptidase
EcoL4	CBD006	CBD511	EAD511	++	Lysozym
EcoGP8	CBD006	EADP40	CBDP35	++	Glucosaminidase
EcoFR10	CBD500	CBDP35	Cellosyl	++	
EcoFQ7	CBD511	CBDP35	EADP40	++	
EcoGD16	CBDP35	CBD511	EADP40	++	
EcoAA3e	CBDP40nls	CBDP35	EADP40	++	
EcoGP4	EAD500	EADP40	CBD511	++	
EcoW1	EADP40	CBD006	CBDP40L	++	
EcoFP1	EADP40	CBD006	CBDP40nls	++	
EcoGY10	EADP40	CBD006	EADPSA	++	
EcoGT9	EADP40	CBD511	CBDP40nls	++	
EcoAA1	EADP40	CBD511	EAD500	++	
EcoGU3	EADP40	CBD511	EADP35	++	
EcoGQ6	EADP40	CBD511	EADP40	++	
EcoFS6	EADP40	CBD511		++	
K1	EADP40	CBD511		++	
PlyP40	EADP40	CBDP40		++	
EcoFS14	EADP40	CBDP40L	CBD511	++	
EcoFS8	EADP40	CBDP40nls	CBD006	++	
EcoGT3	EADP40	EADP40	CBD511	++	

Spezifität EAD (putativ)
Amidase
L-Ala-D-Glu-Peptidase
D-Glu-meso-DAP-Peptidase
Lysozym
Glucosaminidase

Bindung CBD
alle Serovare
bestimmte Serovare

4.2.3.3 Aktivität in Gegenwart von EDTA

Ein weiteres Kriterium war die Toleranz gegenüber EDTA. Für diese Bestimmung wurden ebenfalls alle redundanzfreien 170 Varianten und die beiden Wildtyp-Proteine Ply511 und PlyP40 verwendet. Frische Aliquots der Zellaufschluss-Überstände aus Messung bei pH 6 (4.2.3.1) wurden mit 10 mM EDTA für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend im Flüssiglysetest (3.5.3) auf OD-Abnahme von hitzeinaktivierten Zellen von S1095 sv 1/2a in Puffer mit 10 mM EDTA analysiert. Von Varianten, die eine Steigung der OD-Abnahme von 0,4 bis 1 im Vergleich zur Messung bei pH 6 zeigten, wurden anschließend weitere Aliquots mit 50 mM EDTA und mit 150 mM EDTA inkubiert und in Puffer mit 50 bzw. 150 mM EDTA die OD-Abnahme gemessen.

Tabelle 4.13 zeigt die Domänenkombinationen mit hoher Restaktivität nach Inkubation mit 10, 50 bzw. 150 mM EDTA. Höchste EDTA-Toleranz besaßen neben dem Wildtyp-Protein PlyP40 15 der 157 3-Domänen Proteine, 3 davon mit einer CBD mit begrenztem Serovar-spektrum (EcoGP8, EcoGA7 und EcoGY10). Von den 13 2-Domänen Proteinen war keines vertreten. Alle Varianten mit der höchsten EDTA-Toleranz bis auf EcoFR10 (Cellosyl und zwei CBDs) hatten EADP40 an einer der drei Positionen. 10 hatten eine Doppel-CBD, dies entspricht 66,6 % der hier positiven Kandidaten.

Tabelle 4.13: Beste Klone im Screening auf Toleranz gegen EDTA. EDTA: Toleranz von maximal 10, 50 bzw. 150 mM EDTA. Wildtyp-Proteine sind grau markiert.

Kandidat	Position 1	Position 2	Position 3	EDTA
EcoFJ4	CBD511	CBD500	EAD500	10
EcoV1	CBD511	EAD500	EADgp29	10
EcoGC3	CBD511	EADP40	EAD500	10
EcoGW11	CBD511	EADPSA	EAD500	10
EcoFA7	CBDP35	CBDP35	EAD500	10
EcoAS10	CBDP35	EAD500	CBD511	10
EcoGO5	CBDP40L	CBD511	EAD500	10
EcoGN1	EAD500	CBD006	CBD511	10
EcoA1	EAD500	CBD511	CBD500	10
EcoN6	EAD500	CBD511	Cellosyl	10
EcoGO11	EAD500	CBD511	EAD511	10
EcoAE4	EAD500	CBD511	MurA	10
EcoE21	EAD500	CBD511	Sle1	10
M1	EAD500	CBD511		10
EcoI4	EAD500	CBDP40-L	MurA-Var2	10
EcoAR5	EAD500	EAD500	CBDP40nls	10
EcoGP4	EAD500	EADP40	CBD511	10
EcoAK2	EAD511	CBD511	EADP40	10
EcoGX3	EAD511	EAD500	CBD511	10
EcoGC17	EADP35	CBD511	CBDP40nls	10
EcoW1	EADP40	CBD006	CBDP40L	10
EcoGU3	EADP40	CBD511	EAD500	10
EcoK2	EADP40	EAD500	CBD511	10
EcoGE10	EADP40	EADB054	CBDP40L	10
EcoAS7	EADP40	EADB054	CBDP40nls	10
EcoGX15	EADP40	EADP35	CBD511	10
EcoO3	EADPSA	CBDP40L	EADP40	10
EcoGB9	MurA	CBD006	EAD500	10
EcoFN14	MurA	EADPSA	EADPSA	10
EcoGB16	MurA-Var2	CBD006	EADPSA	10
EcoGY22	MurA-Var2	CBD511	CBD006	10
EcoAS4	MurA-Var2	CBD511	EAD500	10
EcoFA3	MurA-Var2	CBD511	EADPSA	10
EcoCE2	MurA-Var2	CBDP40nls	EADP35	10
EcoGQ5	MurA-Var2	EAD500	CBD006	10
EcoGS9	MurA-Var2	EAD511	CBDP40nls	10
EcoGP5	MurA-Var2	EAD511	EAD500	10
EcoCM3	MurA-Var2	EADB054	CBD511	10
EcoFL8	MurA-Var2	EADB054	Sle1	10
EcoAB4	MurA-Var2	EADP40	CBD511	10
EcoFM17	Sle1	Cellosyl	EADgp29	10

Kandidat	Position 1	Position 2	Position 3	EDTA
Q3	CBD511	EADP40		50
EcoO5a	CBD5025	EADP40	CBD511	50
EcoFL5	Cellosyl	CBD511	EADP40	50
EcoGH1	EAD500	CBD511	EADP40	50
EcoAH3	EAD500	EADP40	CBDP40nls	50
EcoFL11	EADgp29	EADPSA	CBDP40nls	50
EcoFN6	EADP35	CBD511	EAD500	50
EcoFN5	EADP35	EADP40	CBD511	50
EcoAA1	EADP40	CBD511	CBDP40nls	50
EcoAS9	EADP40	CBD511	Cellosyl	50
EcoFQ1	EADP40	CBD511	EAD511	50
EcoGQ6	EADP40	CBD511	EADP35	50
EcoFS6	EADP40	CBD511	EADP40	50
EcoFR9	EADP40	CBD511	MurA-Var2	50
K1	EADP40	CBD511		50
EcoGF2	EADP40	CBDP40L	CBD500	50
EcoGM2	EADP40	CBDP40nls	EAD500	50
EcoGD4	EADP40	EAD500	CBDP40nls	50
EcoGT3	EADP40	EADP40	CBD511	50
EcoFS16	EADP40	EADP40	CBDP40L	50
EcoGO1	EADP40	MurA	CBD511	50
EcoHA4	EADP40	MurA-Var2	CBDP40L	50
EcoGC6	EADP40	MurA-Var2	CBDP40nls	50
J3	MurA-Var2	CBD511		50
EcoGS17	MurA-Var2	CBD511	EADP35	50
EcoAQ8	MurA-Var2	CBDP40-L	EADP40	50
EcoFN2	Sle1	EADP40	CBDP40nls	50
EcoGP8	CBD006	EADP40	CBDP35	150
EcoFR10	CBD500	CBDP35	Cellosyl	150
EcoFQ7	CBD511	CBDP35	EADP40	150
EcoGD16	CBDP35	CBD511	EADP40	150
EcoAA3e	CBDP40nls	CBDP35	EADP40	150
EcoFP1	EADP40	CBD006	CBDP40nls	150
EcoGY10	EADP40	CBD006	EADPSA	150
EcoGT9	EADP40	CBD511	CBD006	150
EcoFB1c	EADP40	CBD511	IspC	150
PlyP40	EADP40	CBDP40		150
EcoFS14	EADP40	CBDP40L	CBD511	150
EcoGM12	EADP40	CBDP40L	CBDP40nls	150
EcoFS8	EADP40	CBDP40nls	CBD006	150
EcoGA7	EADP40	EADPSA	CBDP35	150
EcoAl8	EADP40	EADPSA	CBDP40L	150
EcoGS14	MurA-Var2	EADP40	CBDP40nls	150

Spezifität EAD (putativ)
Amidase
L-Ala-D-Glu-Peptidase
D-Glu-meso-DAP-Peptidase
Lysozym
Glucosaminidase

Bindung CBD
alle Serovare
bestimmte Serovare

Zusätzlich fanden sich unter den Proteinen mit Toleranzgrenze von 50 mM EDTA 3 der 13 2-Domänen Proteine (Q3, K1 und J3) und 25 3-Domänen Proteine. Davon hatten 24 eine EADP40 allein oder in Kombination mit einer weiteren EAD. Enzyme ohne EADP40 enthielten MurA-Var2, EADP35, EAD500, EADgp29 und EADPSA. Nur 3 Kandidaten hatten 2 CBDs.

Toleranz gegen maximal 10 mM EDTA zeigten weitere 41 Kandidaten, darunter 1 2-Domänen Protein (M1). In diesen Enzymen waren alle EADs bis auf IspC zu finden. 9 der Varianten hatten eine Doppel-CBD. Ohne zweite EAD kamen vor: EADP40, MurA-Var2, EAD500 und EADP35. 4 Proteine besaßen gar keine CBD (EcoFN14, EcoGP8, EcoFM17 und EcoFL8).

Es gilt allerdings zu erwähnen, dass bei sehr ähnlichen Domänenkombinationen unterschiedliche EDTA-Toleranzen gemessen wurden. So zeigte EcoW1 (EADP40-CBD006-

CBDP40L) nur Aktivität mit höchstens 10 mM EDTA im Puffer, EcoFP1 (EADP40-CBD006-CBDP40nls) hingegen sogar in Gegenwart von 150 mM EDTA. Weitere Beispiele hierfür waren EcoAA1 (EADP40-CBD511-CBDP40nls) und EcoFS14 (EADP40-CBDP40L-CBD511), EcoGC6 (EADP40-MurA-Var2-CBDP40nls) und EcoGS14 (MurA-Var2-EADP40-CBDP40nls) sowie EcoO3 (EADPSA-CBDP40L-EADP40) mit EcoAI8 (EADP40-EADPSA-CBDP40L). Dies ist vermutlich auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen, die zu einer Schwächung der Bindung des zweiwertigen Ions führen könnten.

4.2.3.4 Fähigkeit zur Inhibition von Listerienwachstum

Zur weiteren Einschränkung der Kandidaten wurde auf Inhibition von Listerienwachstum getestet (3.5.8). Hierzu wurden lebende Listerien von ProCC S1095 sv 1/2a und ProCC S776 sv 4b in Wachstumsmedium bei pH 6 mit sterilfiltrierten, induzierten Zellaufschluss-Überständen bei 30°C inkubiert und Zellwachstum durch OD-Bestimmung nach 24, 48 und 72 h analysiert. Dieser Test kommt den Ansprüchen an das Protein in der späteren Anwendung am nächsten. Die meisten Lebensmittel sind anfänglich nur sehr gering kontaminiert, doch durch die Fähigkeit der Listerien, sich auch unter gekühlten Bedingungen zu vermehren, kommt es im Laufe der Lagerung zu einer kritischen Menge. Deshalb wurden alle bis hierher als positiv bewerteten Varianten zusätzlich in diesem Test eingesetzt.

Verwendet wurden alle Kandidaten, die bei acidem pH und in Gegenwart von 150 mM EDTA gute Lyseaktivität zeigten. Kandidaten, die bei 10 bzw. 50 mM EDTA noch gute Restaktivität besaßen, wurden dann ausgewählt, wenn sie zusätzlich bei pH 6 Lysegeschwindigkeit wie Ply511 gezeigt hatten.

Es ergaben sich hieraus 39 Testungen, darunter 3 2-Domänen Proteine, 4 3-Domänen Proteine mit serovarspezifischer CBD sowie 32 3-Domänen Proteine mit breiter CBD (-Kombination). Als Kontrollen dienten die Klone, die Ply511 und PlyP40 exprimierten, sowie Zellaufschluss von *E. coli* M15 ohne Plasmid.

Tabelle 4.14 zeigt die Ergebnisse und die Domänenkombinationen der jeweiligen Kandidaten sowie die Resultate des vorangegangenen *Screenings* in Flüssiglysetests.

Da die Potenz eines Lysins, Listerienwachstum zu inhibieren, unter anderem von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängt, wurde der Anteil der Kandidaten im Zellaufschluss-Überstand quantifiziert. Dafür wurden von allen Zellaufschlüssen Pellet und Überstand auf SDS-Gelen analysiert und nach der Menge an löslichem Protein im Überstand bewertet. So zeigten beispielsweise Ply511 und PlyP40 hohe Mengen an löslichem Protein im Überstand, bei EcoFB1c hingegen war kaum eine Proteinbande im Überstand zu erkennen und bei EcoGP4 war im Überstand Proteinabbau zu sehen.

Die Testung auf Wachstumsinhibition erfolgte in einer Doppelbestimmung. In Grenzfällen, bei denen einer von zwei Ansätzen bewachsen war, wurde dies als positive Wachstums-

inhibition gewertet. Insgesamt besaßen 23 Varianten demnach zumindest für 24 h bei einem getesteten Listerien-Serovar die Fähigkeit zur Unterdrückung von Wachstum, wobei Wachstum von S1095 sv 1/2a von einer größeren Anzahl an Kandidaten gehemmt werden konnte als von S776 sv 4b. Bei 15 Kandidaten wurde allerdings keine Inhibition von Listerienwachstum beobachtet, denn diese wiesen wie die Ansätze ohne Protein bereits nach 24 h eine Trübung auf. Diese Varianten zeigten unterschiedlich hohe Mengen an rekombinant exprimiertem Protein im Zellaufschluss-Überstand (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.14: Inhibition des Listerien-Wachstums der ausgewählten Klone nach 24, 48 und 72 h.

0: *E. coli* ohne Expressions-Plasmid. Wildtyp-Endolysine sind grau markiert. Eingesetzt wurden je Test ca. 10 Zellen von *L. monocytogenes* ProCC S1095 sv 1/2a bzw. S776 sv 4b. Zellwachstum (graue Schattierung) wurde über Doppelbestimmung gemessen, 1/2: 1 von 2 Ansätzen zeigt Zellwachstum. L: Bewertung der Proteinmenge im Zellaufschluss-Überstand von 0-4 (0: keine lösliche Fraktion, 1-4: aufsteigende Mengen an löslichem Protein), a: mit Abbaubanden. Daneben sind die Ergebnisse aus den Flüssiglysetests, leere Felder: in diesem Test als negativ bewertet; pH 4,5/5 (++, +: Lyseaktivität bis pH 4,5 bzw. pH 5), Toleranz von EDTA (150, 50, 10: Lyseaktivität in Gegenwart von maximal 150, 50 bzw. 10 mM EDTA) und Aktivität bei pH 6 (+: Vergleichbare OD-Abnahme wie bei Ply511-exprimierendem Klon) aufgeführt.

Variante	L	Position 1	Position 2	Position 3	Screening Flüssiglyse			S1095 sv 1/2a			S776 sv 4b		
					pH 4,5/5	EDTA	pH 6	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0	-	-	-	-									
Ply511	4	EAD511	CBD511				+						
PlyP40	4	EADP40	CBDP40		++	150	+						
EcoGQ6	2	EADP40	CBD511	EADP35	++	50	+						1/2
EcoGU3	1	EADP40	CBD511	EAD500	++	10	+		1/2	1/2		1/2	1/2
EcoGA7	2	EADP40	EADPSA	CBDP35	++	150	+						
EcoGP8	2	CBD006	EADP40	CBDP35	++	150			1/2				1/2
EcoFS6	3	EADP40	CBD511	EADP40	++	50	+						
EcoFS8	3	EADP40	CBDP40nls	CBD006	++	150							
EcoGT9	3	EADP40	CBD511	CBD006	++	150							
EcoFQ1	2	EADP40	CBD511	EAD511		50	+						
EcoL4	3	CBD006	CBD511	EAD511	++								
EcoGS17	1	MurA-Var2	CBD511	EADP35	+	50							
EcoGH1	2	EAD500	CBD511	EADP40		50	+	1/2	1/2	1/2			
M1	4	EAD500	CBD511			10	+						
K1	4	EADP40	CBD511		++	50	+						
EcoGM2	3	EADP40	CBDP40nls	EAD500		50	+	1/2					
EcoGY10	4	EADP40	CBD006	EADPSA	++	150	+						
EcoW1	2	EADP40	CBD006	CBDP40L	++	10							
EcoFP1	3	EADP40	CBD006	CBDP40nls	++	150							
EcoAA1	2	EADP40	CBD511	CBDP40nls	++	50							
EcoFR10	2	CBD500	CBDP35	Cellosyl	++	150							
EcoFQ7	2	CBD511	CBDP35	EADP40	++	150							
EcoGP4	1a	EAD500	EADP40	CBD511	++	10	+						
EcoAS4	4	MurA-Var2	CBD511	EAD500		10	+						
GB9	2	MurA	CBD006	EAD500		10	+						

Neben den Wildtyp-Proteinen besaßen 4 3-Domänen Proteine die besten Ergebnisse. Sie konnten 72 h lang S776 sv 4b und 72 bzw. 48 h lang S1095 sv 1/2a in Wachstum inhibieren. Darunter befanden sich EcoGQ6 und EcoGU3. Diese Proteine haben an Position 1 EADP40, an Position 2 CBD511 und an Position 3 eine (putative) Peptidase, EADP35 bei EcoGQ6 und EAD500 bei EcoGU3. Die beiden anderen Kandidaten sind überraschenderweise EcoGP8 und EcoGA7, welche beide serovarspezifische CBDs besitzen, wonach nur Inhibition auf S1095 sv 1/2a zu erwarten gewesen wäre. Es zeigte sich also, dass es sich bei

diesen Varianten keinesfalls eindeutig um falsch Positive handelte, die nur durch die Wahl des Stammes in den vorausgegangenen *Screening*-Schritten behalten wurden.

Von allen 4 besten Varianten war deutlich weniger Protein im verwendeten Zellaufschluss als bei Ply511 und PlyP40.

Die beiden einzigen 2-Domänen Proteine K1 und M1 mit vergleichsweise hohen Mengen löslichen Proteins im verwendeten Überstand unterdrückten das Zellwachstum für 24 h bei beiden Stämmen.

4.2.3.5 Auswahl der geeigneten Kandidaten

Im Anschluss an das *Screening* sollten einzelne Kandidaten für die Charakterisierung von Aktivität und Proteinstabilität gereinigt werden. Es sollten 2- und 3-Domänen Proteine analysiert werden. Abbildung 4.24 gibt einen Gesamtüberblick über die bisher erfolgten *Screening*-Schritte und die Anzahl der erhaltenen bzw. analysierten Kandidaten.

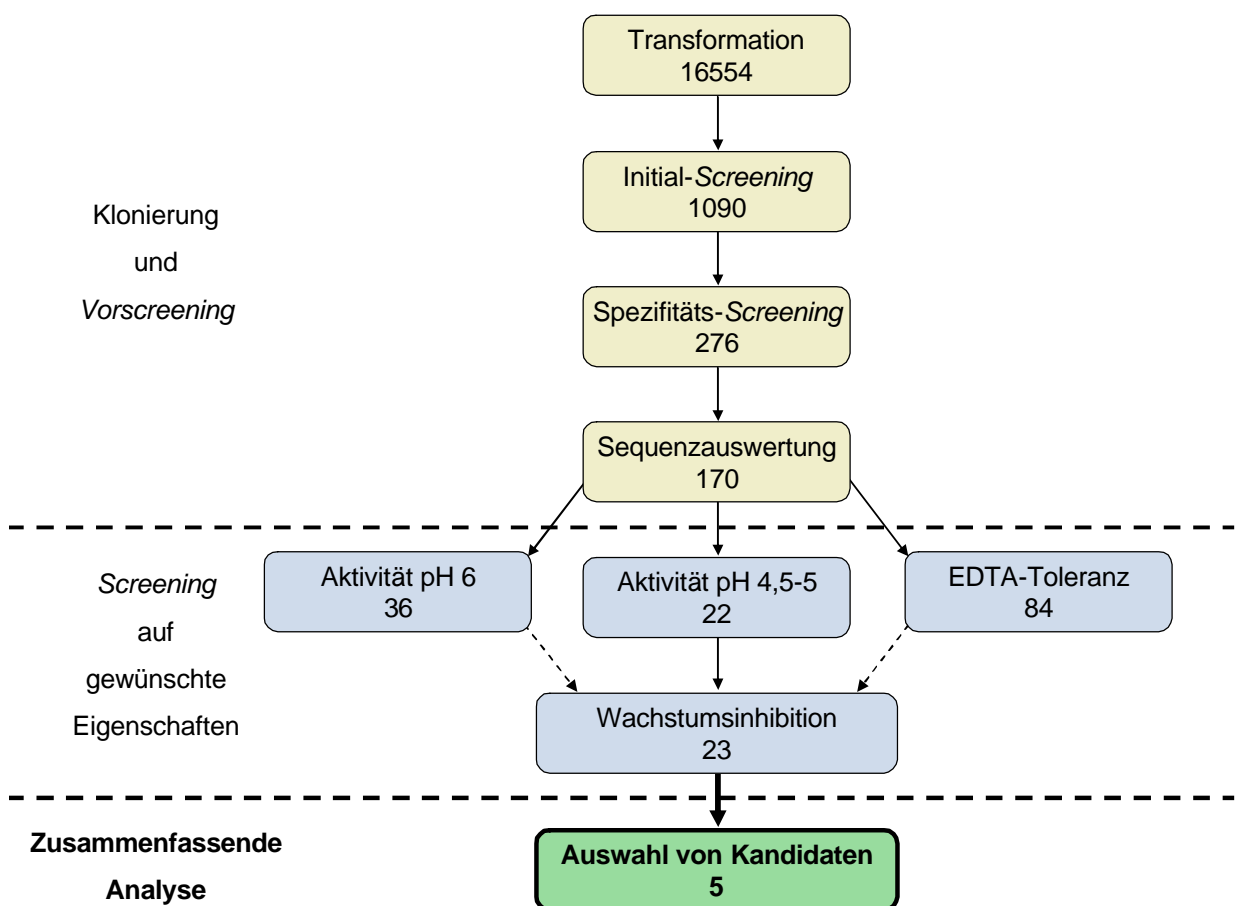


Abbildung 4.24: Schema zum *Screening*-Verlauf der 2- und 3-Domänen Proteine. Ab *Screening* auf gewünschte Eigenschaften (blau) wurden die 2- und 3-Domänen Proteine parallel analysiert. Die Zahlenwerte umfassen 2- und 3-Domänen Proteine, als Grundlage der 2-Domänen Proteine diente der 1147-Ansatz.

Für die Auswahl der zu charakterisierenden Proteine wurde am meisten Gewicht auf die Ergebnisse der Inhibition des Listerien-Wachstums gelegt.

Selektiert wurden daher EcoGQ6, EcoGU3, M1, und K1. Von den 3-Domänen Proteinen mit breiter CBD konnten EcoGQ6 und EcoGU3 am längsten das Wachstum der beiden getesteten Listerienstämme unterdrücken. Die 2-Domänen Proteine M1 und K1 zeigten zumindest für 24 Stunden Aktivität auf beiden Stämmen. Zusätzlich sollte EcoGP8 charakterisiert werden. Dies begründet sich mit den überraschenden Ergebnissen von EcoGP8 und EcoGA7, deren CBDs theoretisch nicht an den Teststamm S776 sv 4b binden können, die aber trotzdem in der Lage waren, auch S776 sv 4b im Wachstum zu unterdrücken (4.2.3.4). Beispielhaft sollte dieser Umstand anhand von EcoGP8 genauer analysiert werden, welches im Gegensatz zu den anderen zu charakterisierenden Kandidaten zwei CBDs besitzt.

Die 5 Proteine M1, K1, EcoGU3, EcoGQ6 und EcoGP8 besaßen zudem alle eine höhere EDTA-Toleranz als das Wildtyp-Protein Ply511 und außer bei M1 war bei diesen Kandidaten gute Restaktivität bei acidem pH zu beobachten, was auf die EADP40 in diesen Molekülen zurückzuführen ist. Des Weiteren zeigten bis auf EcoGP8 alle Kandidaten bei pH 6 eine zu Ply511 vergleichbare OD-Abnahme.

Die beiden 2-Domänen Proteine haben am C-Terminus CBD511, am N-Terminus hat M1 die Peptidase EAD500, K1 das putative Lysozym EADP40. EcoGU3 und EcoGQ6 entsprechen K1 mit einer zusätzlichen (putativen) Peptidase an der 3ten Position: EAD500 bei EcoGU3, EADP35 bei EcoGQ6. EcoGP8 hat am N-Terminus CBD006 gefolgt von EADP40 und CBDP35. Insgesamt bestehen die *Screening*-Kandidaten sämtlich aus Endolysin-Domänen. In Tabelle 4.15 sind diese Resultate aus den *Screening*-Schritten der 5 selektierten Kandidaten zusammengefasst.

Tabelle 4.15: *Screening*-Daten der ausgewählten Domänenkombinationen. pH 4,5: ++ gute Restaktivität bei pH 4,5. EDTA: Toleranz der entsprechenden EDTA-Konzentration in mM. pH 6: + verweist auf vergleichbare OD-Abnahme wie bei Ply511-exprimierendem Klon.

Kandidat	Domänen	pH 4,5	EDTA	pH 6	Listerien-Inhibition
M1	EAD500 CBD511		10	+	24 h
K1	EADP40 CBD511	++	50	+	24 h
EcoGQ6	EADP40 CBD511 EADP35	++	50	+	72 h
EcoGU3	EADP40 CBD511 EAD500	++	10	+	72 h
EcoGP8	CBD006 EADP40 CBDP35	++	150		48/72 h

4.3 Proteinreinigung und Charakterisierung

Die neuen Proteinvarianten sollten mit den Wildtyp-Endolysinen Ply511, PlyP40 und PlyP825 verglichen werden. Das gereinigte Endolysin Ply511 aus dem Phagen A511 wurde von der Hyglos GmbH in Puffer mit 0,09 % Azid zur Verfügung gestellt. Für Testungen in dieser Arbeit wurde Ply511 gegen 40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8 dialysiert (3.3.4), denn nur so war sichergestellt, dass in Assays zur Bestimmung von bakteriostatischer und bakterio-lytischer Aktivität allein die Wirkung des Endolysins gemessen wurde.

PlyP40 und PlyP825 wurden im Folgenden zusammen mit den *gescreenten* Proteinen gereinigt.

4.3.1 Proteinreinigung

4.3.1.1 Löslichkeit der Proteine

Für die anschließende Charakterisierung sollten die fünf ausgewählten Kandidaten des Screenings M1, K1, EcoGQ6, EcoGU3 und EcoGP8 und zum Vergleich die Wildtyp-Endolysine PlyP40 und PlyP825 gereinigt werden. Zur Ermittlung der geeigneten Expressionstemperatur wurde zunächst die Löslichkeit der Proteine bei verschiedenen Temperaturen untersucht (3.3.1).

Die Wildtyp-Endolysine PlyP825 und PlyP40 wurden unabhängig von der Temperatur zu ca. jeweils 50 % löslich exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.16: Einschätzung der Löslichkeiten der selektierten Proteine im Vergleich zu den Löslichkeiten der Einzel-Domänen (im T5-System). D1, D2, D3: Domänen an Position 1, 2, 3.

+++ geschätzt 80-100 % löslich exprimiert, + weniger als 40 % löslich exprimiert,
 ++ geschätzt 40-80 % löslich exprimiert, - vorwiegend unlöslich.

Kandidat	Domänenkombination	D1	D2	D3
M1	Zusammensetzung	EAD500	CBD511	
	Löslichkeit RT	++	++	
	Löslichkeit 30°C	+++	++	
K1	Zusammensetzung	EADP40	CBD511	
	Löslichkeit RT	++	++	
	Löslichkeit 30°C	++	++	
EcoGQ6	Zusammensetzung	EADP40	CBD511	EADP35
	Löslichkeit RT	++	++	-
	Löslichkeit 30°C	++ (Abbau)	++	-
EcoGU3	Zusammensetzung	EADP40	CBD511	EAD500
	Löslichkeit RT	+++	++	++
	Löslichkeit 30°C	+++	++	+++
EcoGP8	Zusammensetzung	CBD006	EADP40	CBDP35
	Löslichkeit RT	+	++	+++
	Löslichkeit 30°C	+	++	+++

Die Ergebnisse zu den Löslichkeiten der 3-Domänen Proteine in den Expressionsstämmen *E. coli* NEB Express I^Q und M15 waren insgesamt sehr ähnlich. In Tabelle 4.16 sind die Einschätzungen der löslichen Proteinexpression bei Raumtemperatur und 30°C von den Klonen angegeben, die zur präparativen Proteinexpression verwendet wurden. Daneben wurden die Löslichkeiten der 2- und 3-Domänen Proteine mit den Löslichkeiten der Einzeldomänen verglichen.

Das Löslichkeitsverhalten der Einzeldomänen spiegelt sich in den Domänenkombinationen weitestgehend wieder. So führte vermutlich die schlecht löslich exprimierte EADP35 zu einer ebenfalls unlöslicheren Expression von EcoGQ6 im Vergleich zu EocGU3. Anders verhielt es sich mit der Löslichkeit von EcoGP8. Das 3-Domänen Protein war weniger löslich als seine einzelnen Domänen.

Bei der Expression von EcoGQ6 bei 30°C fielen in der löslichen Fraktion deutliche Abbauanden des Proteins auf, welche im Pellet nicht enthalten waren. Dieser Abbau war bei der Testung auf Löslichkeit bei Raumtemperatur auf dem SDS-Gel nicht sichtbar.

4.3.1.2 Rückfaltung von EcoGQ6

Zunächst wurde versucht, EcoGQ6 aus dem Zellaufschluss-Überstand zu reinigen. Wegen hydrolytisch aktiven Abbauanden von EcoGQ6 mit unterschiedlichen Größen von etwa 30 bis 55 kDa in der löslichen Zellfraktion, die sich während der Reinigung ähnlich zum Volllängenprotein verhielten, konnte das Protein nicht löslich gereinigt werden. Vermutlich handelte es sich hierbei um dieselben Abbauprodukte, die bereits bei der Testung auf Löslichkeit bei 30°C zu sehen waren. Die Entstehung und Intensivierung dieser Abbauanden konnte jedoch auch durch Veränderung der Expressionstemperatur, Expression in dem proteasedefizienten *E. coli* NEB Express I^Q und Verwendung von bis zu 10 mM EDTA während der Reinigung nicht verhindert werden, wie SDS-Gel-Analysen der Reinigungsversuche über Säulenchromatographie zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Abbauanden wurden daher vermutlich bereits während der Proteinexpression gebildet.

Im Gegensatz zum Volllängenprotein wurden diese Abbauanden allerdings vollständig löslich exprimiert, weshalb *Inclusion Bodies* mit EcoGQ6 aus dem induzierten Zellpellet von *E. coli* NEB Express I^Q isoliert wurden (3.3.3.2). Während des Waschens der *Inclusion Bodies* mit 5 mM Tris-HCl pH 8 mit 2,5 % (v/v) Triton X-100, 5 mM Tris-HCl pH 8 und Wasser wurde bereits Zielprotein ausgewaschen und Aktivitätstests im Photometer (3.5.4) bestätigten lytische Aktivität in den einzelnen Überständen der Waschfraktionen (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde das unlöslich exprimierte, nicht abgebaute Protein in den *Inclusion Bodies* mit 8 M Harnstoff solubilisiert. Der aufgeklärte Ansatz wurde durch Verdünnen in Anwesenheit von Zn^{2+} rückgefaltet (3.3.3.3), da EADP35 wie auch EAD500 das Domänenmotiv VanY besitzt und daher vermutlich wie EAD500 ein Zink-Ion im aktiven Zentrum benötigt (Korndörfer *et al.*, 2008).

Abbildung 4.25 zeigt die Analyse der Reinigung von *Inclusion Bodies* sowie der Rückfaltung des Proteins. Die gewaschenen *Inclusion Bodies* enthielten unerwünschte Banden, die in der Fraktion der Rückfaltung nicht zu sehen waren, da das rückgefaltete Protein ca. 200fach verdünnt war. Nach Bestätigung der Listerien-lytischen Aktivität des rückgefalteten EcoGQ6 über photometrische Lysetestung (3.5.4) wurde deshalb das rückgefaltete Protein zur Entfernung von Fremdprotein über Säulen-Chromatographie gereinigt (4.3.1.3).

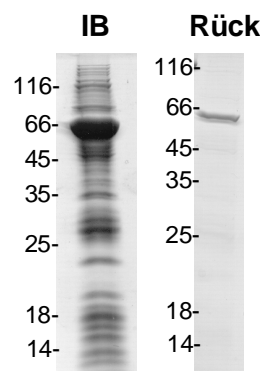


Abbildung 4.25: Analyse der gewaschenen *Inclusion Bodies* von EcoGQ6 und der Rückfaltung über SDS-Gelelektrophorese. IB: gewaschene *Inclusion Bodies* (1:10 verdünnt aufgetragen). Rück: Probe des rückgefalteten Solubilisierungsansatzes. Das Molekulargewicht von EcoGQ6 beträgt 60,3 kDa. Der Protein-Standard ist in kDa angegeben. Die Analyse erfolgte auf einem 15 %igen SDS-Gel.

4.3.1.3 Säulen-Chromatographie von PlyP40, PlyP825, M1, K1, EcoGU3, EcoGP8 und rückgefaltetem EcoGQ6

Sowohl die beiden Wildtyp-Proteine als auch die 5 Chimären wiesen hohe isoelektrische Punkte mit Werten zwischen 9,5 und 10 auf (Tabelle 4.17), weshalb die Zellaufschluss-Überstände mit pH 8 über Säulen-Chromatographie mittels Kationen-Austauscher gereinigt wurden. Hierzu wurde das Material Toyopearl SP650M (Tosoh, Biosciences GmbH, Stuttgart) verwendet, dabei enthielt der Zellaufschluss eine Ionenstärke von weniger als 8 mS und die Elution erfolgte mit einem Salz-Gradienten bis 500 mM NaCl (3.3.3.5).

Tabelle 4.17: Molekulargewicht, Extinktionskoeffizient und isoelektrischer Punkt der zu reinigenden Proteine. Ermittelt über ExPASy ProtParam. ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$].

Protein	MW [kDa]	ϵ_{280}	pI
PlyP40	38,3	59945	9,69
PlyP825	34,2	53985	9,82
M1	35,2	56965	9,75
K1	43,2	55935	9,68
EcoGQ6	60,3	87000	9,63
EcoGU3	60,6	94115	9,59
EcoGP8	55,7	81500	9,8

Alle Proteine konnten über dieses Verfahren gereinigt werden, EcoGQ6 musste zuvor aus *Inclusion Bodies* rückgefaltet werden (4.3.1.2). Tabelle 4.18 fasst Details zur Anzucht und Reinigung zusammen.

Tabelle 4.18: Bedingungen während der Proteinexpression und -reinigungen. Aufgelistet sind Expressionsbedingungen, verwendeter *E. coli*, Leitfähigkeit des Elutionsmaximums, sowie die Ausbeute in mg pro Liter Anzucht. *Säulenlauf erfolgte nach Rückfaltung. M15: *E. coli* M15, NEB: *E. coli* NEB Express I^Q.

Bedingung	PlyP40	PlyP825	M1	K1	EcoGQ6*	EcoGU3	EcoGP8
Expressions-volumen	2 l	2 l	1 l	2 l	2 l	1 l	4 l
Expressions-temperatur	30°C	30°C	30°C	RT	RT	RT	RT
Expressions-dauer	4 h	4 h	4 h	ÜN	ÜN	ÜN	ÜN
Stamm	M15	M15	NEB	NEB	NEB	M15	NEB
EDTA	-	10 mM	5 mM	5 mM	-	5 mM	-
Elutions-maximum	30 mS	22,5 mS	20 mS	20,5 mS	28 mS	22 mS	35 mS
Ausbeute [mg/L]	3,5	5	8	2,5	7	3,66	0,7
Reinheit	>95 %	>95 %	ca. 90 %	ca. 90 %	ca. 90 %	ca. 90 %	ca. 90 %

Bei PlyP40, M1, EcoGU3 und EcoGP8 befanden sich die Zielproteine zum Teil auch im Durchlauf. Photometerlysetests (3.5.4) zeigten, dass das EcoGP8 im Durchlauf Aktivität besaß. Da die an die Säule gebundene Menge von EcoGP8 deutlich unterhalb der Bindekapazität lag, kann dies als Ursache ausgeschlossen werden. Andere Reinigungsstrategien, wie die Verwendung von anderen Säulenmaterialien, Auftrag mit pH 7 oder der Versuch EcoGP8 aus *Inclusion Bodies* zurückzufalten, führten zu keiner Verbesserung der Ausbeuten (Daten nicht gezeigt). So ließ sich EcoGP8 zwar sowohl in Harnstoff als auch in GdnHCl solubilisieren, Rückfaltungsversuche aus beiden Solubilisierungsansätzen führten jedoch zu keinem aktiven rückgefalteten Protein.

Um Proteinabbau während der Reinigung zu verhindern, wurden die Reinigungen von M1, K1, EcoGU3, EcoGQ6 und PlyP825 unter Zusatz von EDTA wiederholt. Da EDTA auch die ionischen Cofaktoren der Zielproteine komplexieren kann, wurden die gereinigten Proteine

mit EADs, die bekanntermaßen bzw. vermutlich aufgrund von Homologien ein zweiwertiges Ion benötigen wie EAD500, EADP35 und EADP825 im Anschluss auf ihre Aktivität durch Vergleich mit Chargen aus Reinigungen ohne EDTA überprüft. M1, K1 und GU3 waren nach Reinigung mit 5 mM EDTA und anschließender Dialyse ebenso aktiv im Photometerlysetest wie die nativ gereinigten Proteine. PlyP825 hatte nach Reinigung mit 10 mM EDTA die lytische Aktivität verloren, was das Vorhandensein eines ionischen Cofaktors bestätigte. Diesbezüglich wurde bereits mehrfach beschrieben, dass bei Endolysinen die Aktivität durch Inkubation mit verschiedenen Ionen wiederhergestellt werden kann, und abhängig vom verwendeten Ion unterschiedlich hohe Aktivitäten in Relation zur Aktivität vor der Inkubation mit EDTA erreicht werden (Shida, 2001; Schmelcher, 2007; Mikoulinskaia *et al.*, 2009). Vermutlich ist im natürlich vorkommenden PlyP825 nur ein bestimmtes zweiwertiges Ion integriert, da dies jedoch nicht bekannt war, wurde das Protein nach Säulen-Chromatographie mit Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} inkubiert, dialysiert und danach auf Aktivität überprüft (3.3.3.5, 3.5.4). Die Aktivität des Endolysins ließ sich durch 1 h Inkubation mit gleichzeitig 10 mM Zinksulfat und 10 mM Calciumchlorid und anschließender Dialyse wiederherstellen. Bei geringen Konzentrationen der Eluate wurden die Proteine mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren zu 0,2-1 mg/ml aufkonzentriert.

Nach der Dialyse gegen 40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8 (3.3.4) wurden die Proteine bei $-20^{\circ}C$ gelagert. Abbildung 4.26 zeigt die gereinigten und dialysierten Proteine. Die beiden Wildtyp-Endolysine lagen mit über 95 % Reinheit und die *gescreenten* Kandidaten mit einer Reinheit von in etwa 90 % vor. Bei den Fremdbanden der Proteine M1, K1, EcoGU3, EcoGQ6 und EcoGP8 handelt es sich möglicherweise um Proteinabbau, der trotz der teilweisen Verwendung von EDTA und dem proteasedefizienten Expressionsstamm *E. coli* NEB Express I^Q nicht verhindert werden konnte.

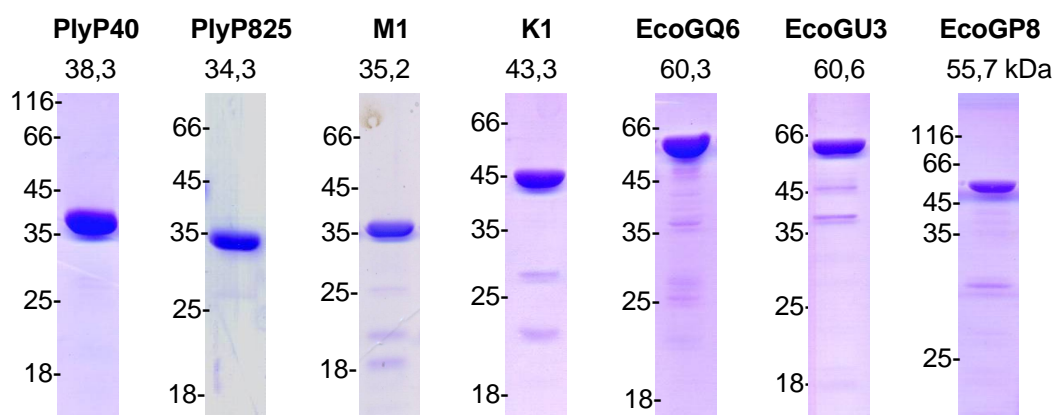


Abbildung 4.26: SDS-Gel-Analysen der gereinigten Proteine. Der Protein-Standard ist in kDa angegeben. Die Analyse erfolgte auf 15 %igen SDS-Gelen.

4.3.2 Aktivität der gereinigten Proteine

4.3.2.1 Spezifische Aktivität

Zur Berechnung der spezifischen lytischen Aktivität der Proteine wurde zu Grunde gelegt, dass 1 U derjenigen Proteinmenge entspricht, die für die OD-Abnahme von 0,01/min benötigt wird. Alle Proteine wurden unter gleichen Bedingungen analysiert (pH 6 und 100 mM NaCl) und nicht unter den jeweiligen Optima. Dies liegt darin begründet, dass die hier gewählten Bedingungen der späteren Anwendung nahe kommen sollten und zudem den Parametern der Flüssiglysetestung bei pH 6 des *Screenings* entsprechen. Nach Auswertung von photometrischen Lysetests mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (3.5.4) zwischen 0,03 und 10 µg/ml gegen hitzeinaktivierte Zellen von ProCC S1095 sv 1/2a bei pH 6 wurden die Aktivitäten berechnet. Tabelle 4.19 fasst die erhaltenen Daten zusammen.

Unter diesen Bedingungen besaßen die Proteine EcoGP8, PlyP40, EcoGQ6 sowie M1 die niedrigsten Aktivitäten. Fast doppelt so hohe Aktivitäten wurden von PlyP825, K1 und EcoGU3 erreicht und Ply511 zeigte mit 7,6 U/µg die schnellste Reaktion.

Tabelle 4.19: Spezifische Aktivitäten der untersuchten Proteine. Reaktionsbedingungen: 20 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 µg/ml DNase, pH 6 bei 30°C.

Protein	Domänen-Kombination	U/µg
Ply511	EAD511-CBD511	7,6
PlyP40	EADP40-CBDP40	3,5
PlyP825	EADP825-CBDP825	4,8
M1	EAD500-CBD511	3,5
K1	EADP40-CBD511	5,7
EcoGQ6	EADP40-CBD511-EADP35	2,8
EcoGU3	EADP40-CBD511-EAD500	5,7
EcoGP8	CBD006-EADP40-CBDP35	3,1

4.3.2.2 pH-Optimum

Für die gereinigten Proteine wurden die Lyseaktivitäten in Abhängigkeit des pH Werts über photometrische Lysetests ermittelt. Hierzu wurden hitzeinaktivierte Zellen von ProCC S1095 sv 1/2a in Puffer mit 50 mM Natriumcitrat, 50 mM NaH₂PO₄ und 50 mM Borat und 100 mM NaCl aufgenommen, der jeweils auf pH 4,5, 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 bzw. 9,5 eingestellt wurde (3.5.4). In Abbildung 4.27 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die 2-Domänen Proteine M1, PlyP825 und Ply511 besaßen ein pH-Optimum bei neutralem bis leicht basischen pH und das Ergebnis für Ply511 entspricht somit dem bekannten pH-Optimum von pH 8 (Pieper, 2005). Alle weiteren getesteten Proteine hatten am N-Terminus EADP40 und hatten wie das Wildtyp-Protein PlyP40 die höchste Lyseaktivität bei acidem pH. Die Aktivitäten der 3-Domänen Proteine mit 2 EADs, EcoGU3 und EcoGQ6, fielen zu

steigendem pH hin weniger stark ab, was vermutlich von den Aktivitäten der EADs am C-Terminus hervorgerufen wurde. Bei EcoGP8 mit nur einer EAD war dies nicht der Fall.

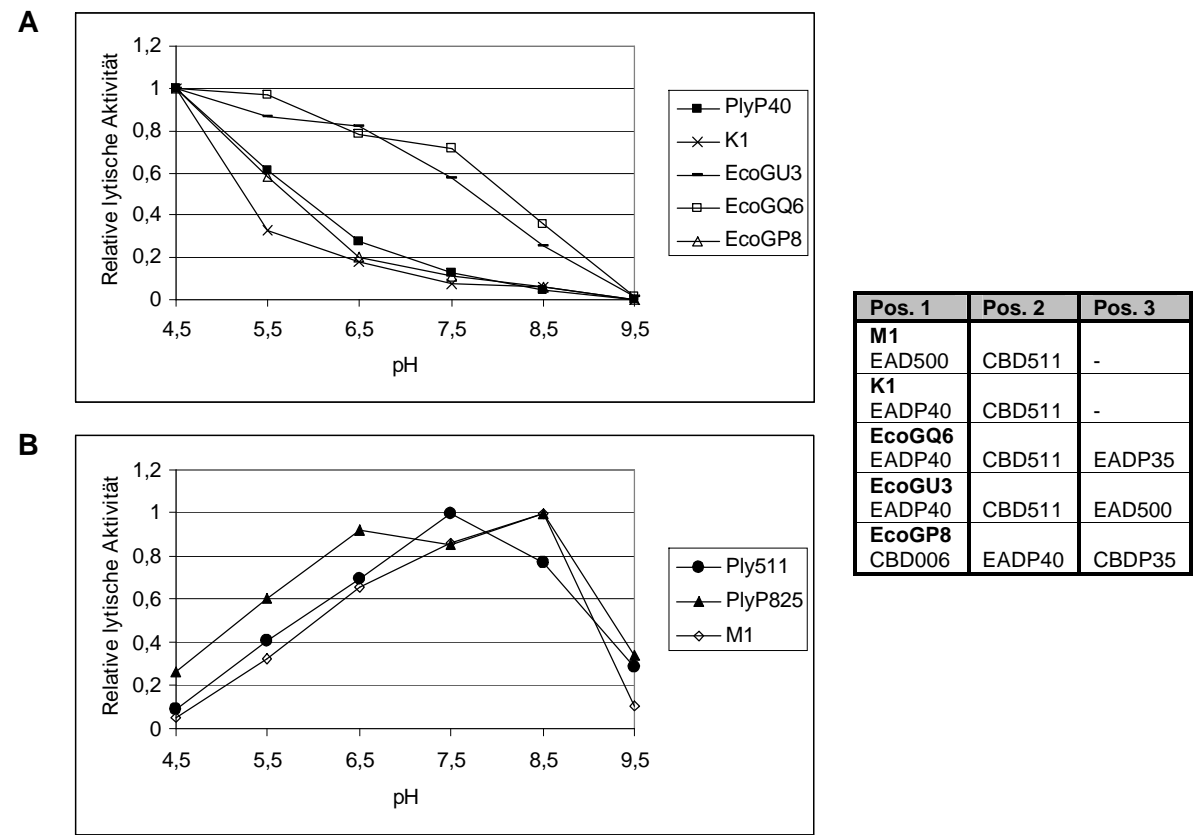


Abbildung 4.27: Relative lytische Aktivitäten in Abhängigkeit des pH-Werts. Für Proteine mit Optimum bei saurem (A) und neutralem bis basischen pH (B) wurden getrennte Graphen erstellt. Die Werte wurden auf den Wert mit höchster lytischer Aktivität normiert.

Da die meisten Lebensmittel niedrige pH-Werte haben, wurde das erfolgte *Screening* sowie die späteren Versuchsreihen allesamt bei pH 6 und damit unabhängig von den pH-Optima der gereinigten Proteine durchgeführt (bis auf Versuche in Milch mit einem pH Wert von 6,5-6,8).

4.3.2.3 Salz-Optimum

Anschließend wurde die Lyseaktivität in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration bestimmt. Getestet wurden die Salzkonzentrationen 0, 10, 50, 100, 150, 250 und 500 mM NaCl bei pH 6 mit hitzeinaktivierten Zellen von ProCC S1095 sv 1/2a.

Die Ergebnisse waren für die analysierten Proteine im Allgemeinen ähnlich (Abbildung 4.28). Das Salz-Optimum für EcoGP8 war bei 250 mM und Ply511, PlyP825, M1, EcoGU3 und EcoGQ6 hatten höchste lytische Aktivität zwischen 150-250 mM NaCl. Für Ply511 fand sich dies mit Ergebnissen der Profos AG (heute Hyglos GmbH, Daten nicht veröffentlicht)

bestätigt. Für PlyP40 lag das Optimum etwas niedriger bei 150 mM und K1 hatte mit 100 mM NaCl das niedrigste Salz-Optimum der analysierten Enzyme. Zusammen mit PlyP40 zeigte es daher die besten Werte für Restaktivität bei niedrigeren Salzkonzentrationen. So hatten PlyP40 und K1 noch 50 % Aktivität bei ca. 30 mM NaCl, M1 bei ca. 50 mM, EcoGU3 und EcoGQ6 bei ca. 75 mM und Ply511, PlyP825 und EcoGP8 bei ca. 100 mM NaCl.

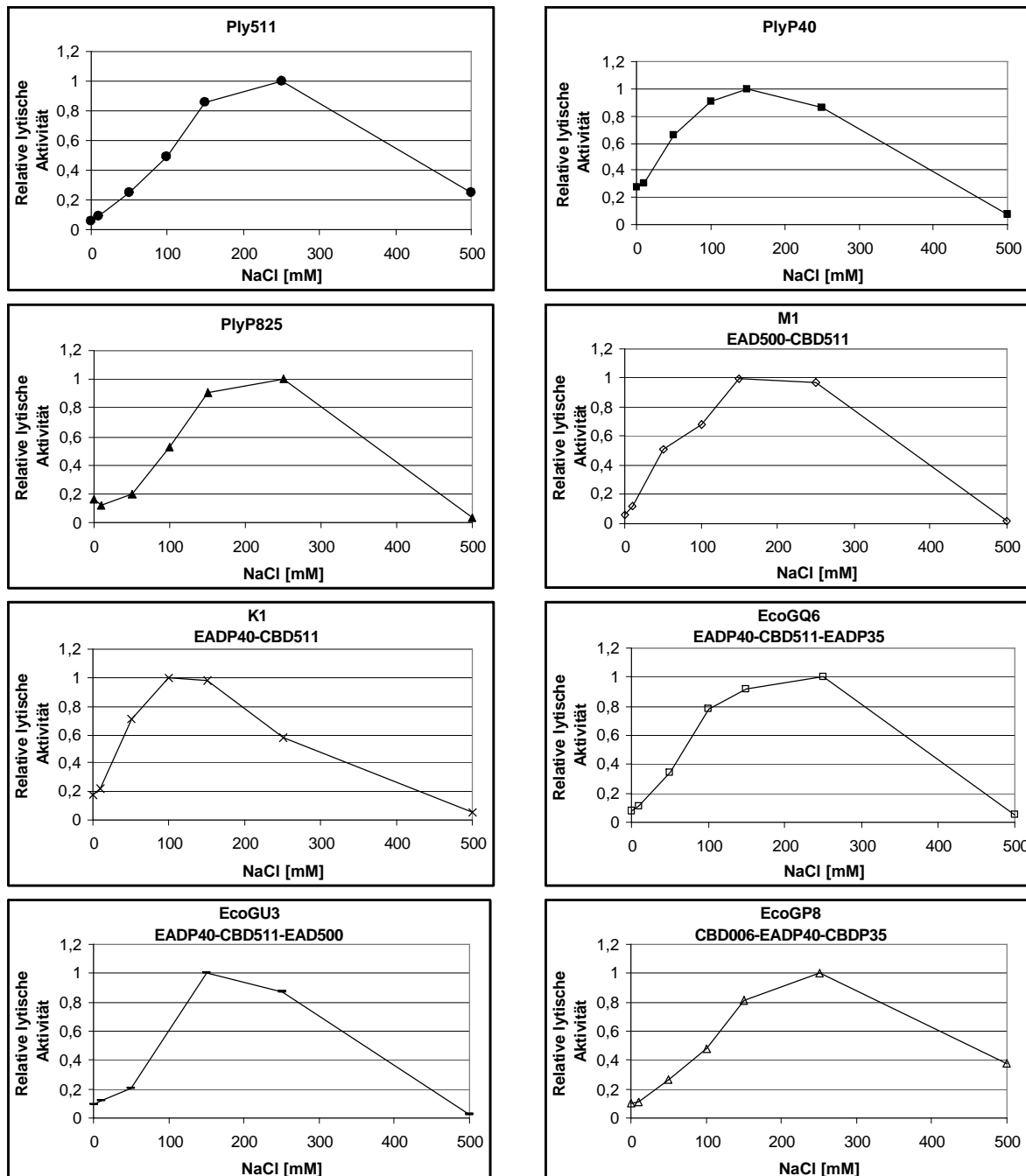


Abbildung 4.28: Relative lytische Aktivitäten bei verschiedenen Salzkonzentrationen bei pH 6.

Die Restaktivität von 50 % bei steigenden NaCl-Konzentrationen können hieraus nur angenähert werden. Sie bewegen sich von ca. 300 mM für K1, zwischen 350 - 400 mM für

PlyP40, M1, EcoGQ6 und EcoGU3, bei in etwa 400 mM für PlyP825 bis 400 - 450 mM für Ply511 und EcoGP8. Bei den hier höchsten getesteten Konzentration von 500 mM besaßen nur Ply511 (25 %) und EcoGP8 (40 %) erwähnenswerte Restaktivität. Hier ist allerdings zu bemerken, dass lebende Zellen durch derart hohe Salzkonzentrationen trotz Destabilisierung der Peptidoglykanschicht osmotisch gegen eine Disruption der Zelle stabilisiert und daher nicht abgetötet werden. Da diese Testung mit hitzeinaktivierten Zellen durchgeführt wurde, ist trotzdem eine OD-Abnahme und somit eine lytische Aktivität der Enzyme zu beobachten.

4.3.2.4 Aktivität in Gegenwart von EDTA

Die gereinigten Proteine wurden wie bereits im *Screening* auf Toleranz gegenüber EDTA getestet. Hierzu wurden photometrische Lysetests mit ProCC S1095 sv 1/2a nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von 1 bis 250 mM EDTA bei pH 6 durchgeführt (3.5.4). In Abbildung 4.29 sind die Ergebnisse dargestellt.

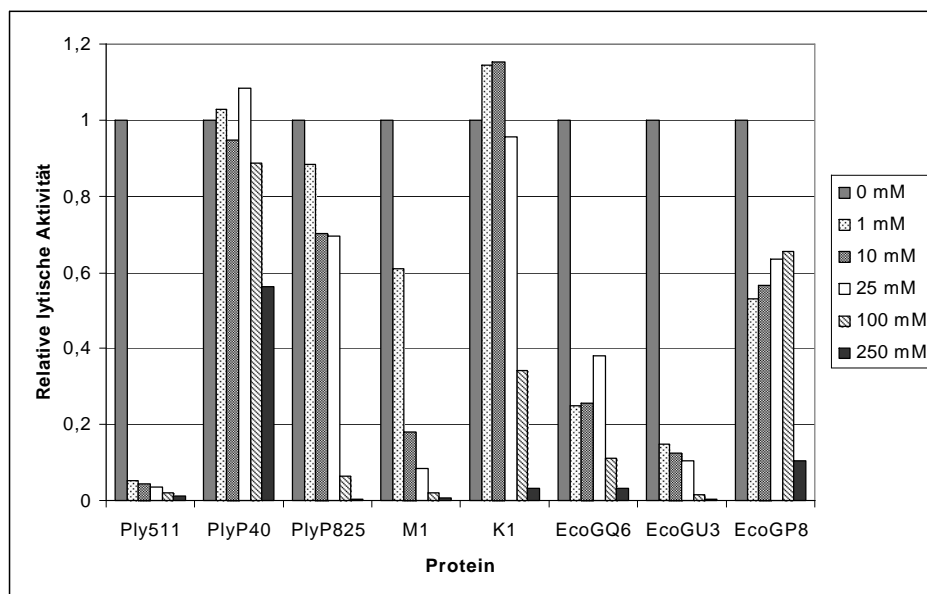


Abbildung 4.29: Relative lytische Aktivitäten nach Inkubation mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen. Die Werte wurden auf die Aktivität bei 0 mM EDTA normiert.

Die Wildtyp-Proteine zeigten äußerst unterschiedliches lytisches Verhalten nach Inkubation mit EDTA. Ply511 wurde bereits durch 1 mM EDTA inaktiviert, bei 250 mM EDTA lag die Restaktivität bei etwa 1 %. PlyP40 besaß nahezu unveränderte Aktivität bis 100 mM EDTA. Die Aktivität von PlyP825 blieb bis 25 mM EDTA auf einem Niveau von ca. 70 %, bei höheren Konzentrationen wurde das Protein inaktiv. Bei 250 mM EDTA verblieben lediglich ca. 2,5 % Aktivität. PlyP825 enthält eine putative Peptidase-Domäne, dies entspricht derselben Spezifität wie die der EAD500 im Protein M1. Bereits bei 1 mM EDTA sank die

Aktivität von M1 auf ca. 60 %, bei 250 mM EDTA verblieben lediglich in etwa 1 %. K1 mit EADP40 zeigte noch bei 25 mM EDTA volle Aktivität. Bei höheren Konzentrationen nahm die Aktivität in K1 stärker ab als im Wildtyp PlyP40. Die 3-Domänen Proteine EcoGU3, EcoGQ6 zeigten eine 2stufige EDTA-Toleranz. Da sie in den ersten beiden Domänen K1 entsprechen, sind abweichende Charakteristika auf das Vorhandensein und die Eigenschaften der Domäne in der jeweiligen dritten Position zurückzuführen (EAD500 bei EcoGU3 und EADP35 bei EcoGQ6). Möglicherweise blieb die Aktivität von EADP40 wie in K1 und im Wildtyp-Protein PlyP40 bei höheren EDTA-Konzentrationen erhalten, wohingegen die (putativen) Peptidase-Domänen bereits bei niedrigeren Konzentrationen inaktiviert wurden. Die Aktivität von EcoGU3 sank bei 1 mM EDTA auf ca. 15 % und ging ab 100 mM völlig verloren. Bei EcoGQ6 verringerte sich die Aktivität bei 1 mM EDTA auf ca. 25 % und nahm ab 100 mM weiter deutlich ab. Hierbei wurde deutlich, dass von EcoGU3 die Gesamtaktivität beispielsweise bei 1 mM EDTA stärker sinkt als von M1. Die Aktivitätsabnahme in EcoGU3 konnte daher nicht nur allein auf Inaktivität der EAD500 beruhen. Da keine Vergleichsdaten von PlyP35 vorhanden sind, kann dies nicht für EcoGQ6 abgeschätzt werden. Bei EcoGP8 führte die Inkubation mit EDTA ebenfalls zu zwei Stufen, das Enzym behielt bei 1 mM EDTA ca. 50 % der Aktivität und lysierte erst bei 250 mM geringer. Möglicherweise wurde die Funktionalität einer CBD des Proteins durch EDTA gestört.

4.3.2.5 Minimale inhibitorische Konzentration bei pH 6

Die minimale inhibitorische Konzentration (*minimum inhibitory concentration*, MIC) ist definiert als die niedrigste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes, die das sichtbare Wachstum eines Mikroorganismus nach Inkubation unterdrückt (Andrews, 2001). Zur Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration wurden jeweils Zellen von *Listeria monocytogenes* ProCC S1095 sv 1/2a, ProCC S1135 sv 3a, ProCC S776 sv 4b und dem apathogenen Stamm *Listeria innocua* ProCC S1147 sv 6a in TB pH 6 mit verschiedenen Proteinkonzentrationen inkubiert. Listerienwachstum konnte durch OD-Bestimmung verfolgt werden (3.5.7). In Abbildung 5.32 sind die Ergebnisse für alle Proteine zusammengefasst, zum besseren Vergleich sind darin die Daten in pmol/ml angegeben. Abbildung 4.31 zeigt als Beispiele die Messwerte von Ply511 und K1.

Es war zu beobachten, dass die MIC-Werte je nach eingesetztem Listerienstamm variierten. Zur Inhibition von S1095 sv 1/2a und S1135 sv 3a wurde meist weniger Protein benötigt als von S1147 sv 6a und S776 sv 4b. Die niedrigsten MIC-Werte hatte Ply511 mit 0,0038-0,12 µg/ml beziehungsweise 0,10 bis 3,34 pmol/ml. Die nächstbesten Ergebnisse wurden vom *gescreenten* 2-Domänen Protein K1 erzielt, hier lagen die molaren Konzentrationen in etwa um den Faktor 1,75 bis 3,5 höher als bei Ply511 und entsprachen etwa den wirksamen Mengen von PlyP40. EcoGU3 zeigte 1,3- bis 10-mal höhere, PlyP825 je nach Stamm 2,3-

mal niedrigere bis 17,75-mal höhere MIC-Werte als PlyP40. Die MIC von M1 und EcoGQ6 konnte gegen keinen der verwendeten Stämme ermittelt werden, da die eingesetzten Proteinmengen nicht ausreichten, Wachstum zu unterdrücken. EcoGP8 konnte S776 sv 4b und S1147 sv 6a nicht im Wachstum unterdrücken, was den Bindefähigkeiten der CBD006 und CBDP35 entspricht. Gegen S1095 sv 1/2a und S1135 sv 3a wurde von EcoGP8 im Vergleich zu Ply511 ca. 45- bis 90-mal so viel Protein benötigt.

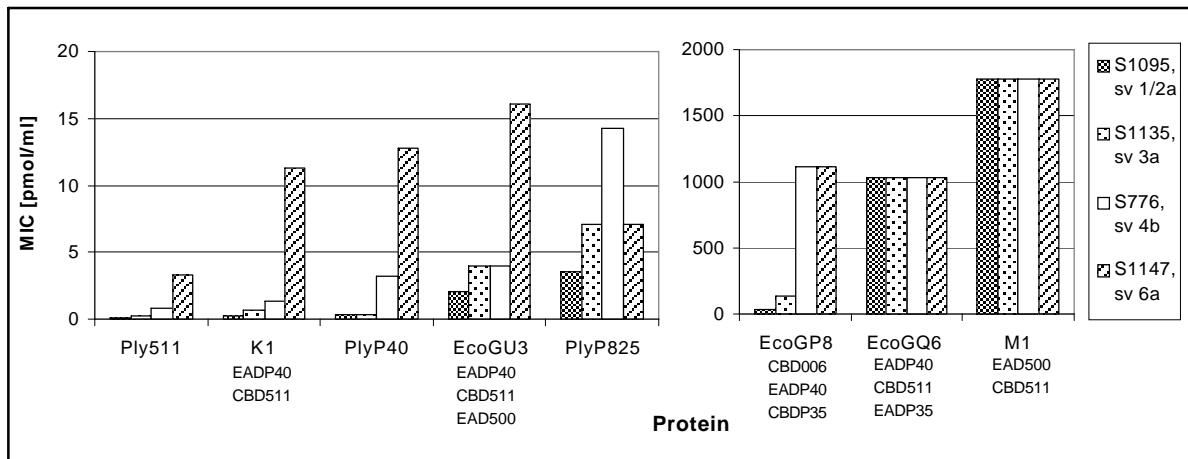


Abbildung 4.30: Zusammenfassung der MIC-Werte nach 24 h in TB pH 6 in pmol/ml. Die Analyse erfolgte über Doppelbestimmungen.

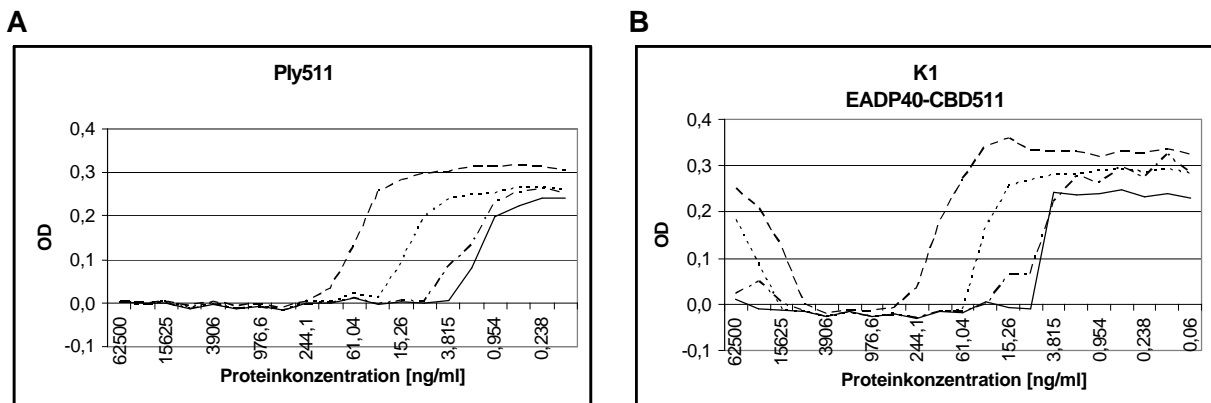


Abbildung 4.31: Beispiele zu Messergebnissen der MIC von Ply511 (A) und K1 (B). Bei K1 ist eine abnehmende Wirkung bei steigender Proteinkonzentration zu beobachten. Durchgezogene Linie: ProCC S1095 sv 1/2a; lang gestrichelt: ProCC S1147 sv 6a; gepunktet: ProCC 776 sv 4b; strichpunkt: ProCC S1135 sv 3a.

Des Weiteren sank bei PlyP40, K1 und EcoGP8 mit zunehmender Proteinkonzentration die Fähigkeit, Listerienwachstum zu unterdrücken. Die korrespondierenden Konzentrationen der Proteine waren teilweise ebenfalls abhängig vom getesteten Listerienstamm. Bei PlyP40 erfolgte dies bei über 1631,9 pmol/ml, bei K1 bei über 180,9 bis 723,4 pmol/ml und bei EcoGP8 bei über 119,6 bis 478,6 pmol/ml. Im Beispiel zur MIC von K1 in Abbildung 4.31 ist

dies zu sehen. Ob dieser Effekt auch bei M1 und EcoGQ6 auftrat, konnte nicht ausgewertet werden, da bei allen Konzentrationen Wachstum erfolgte.

4.3.2.6 Minimale bakterizide Konzentration bei pH 6

In Anlehnung an die gängige Vorgehensweise wurde die minimale bakterizide Konzentration (*minimum bactericidal concentration*, MBC) als diejenige Konzentration definiert, bei der mindestens 3 log von der Ausgangszellzahl reduziert wurden, dies entspricht der Entfernung von 99,9 % der eingesetzten Zellen (Kusuma und Kokai-Kun, 2005).

Zur Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBC) wurden die Proteine in 0,5 ml mit in etwa 10^5 Zellen von Listerien der Stämme ProCC S1095 sv 1/2a, S1135 sv 3a, S776 sv 4b und S1147 sv 6a für 1 h bei 30°C in Puffer mit pH 6 und 50 mM NaCl inkubiert (3.5.5).

Die geringe Salzkonzentration wurde gewählt, um die Zellen osmotisch nicht zu stabilisieren und damit besser die Wirkung der lytischen Enzyme beobachten zu können.

Nach Plattieren wurden die erhaltenen Zellzahl-Reduktionen mit den verschiedenen Proteinkonzentrationen ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Reduktion der Zellzahl durch Verwendung höherer Proteinkonzentrationen nicht beliebig gesteigert werden konnte. Zudem war bei PlyP40, K1 und EcoGP8 wie bereits bei der Bestimmung der MIC der Effekt zu beobachten, dass mit steigender Proteinkonzentration die Wirkung der Proteine abnahm. Dieser Effekt zeigte sich in der MBC ebenfalls bei PlyP825, M1 und EcoGQ6 und war bei M1 und EcoGQ6 in der MIC-Testung vermutlich aufgrund der geringen inhibitorischen Wirkung dieser Proteine nicht erkennbar gewesen. Ply511 und EcoGU3 waren damit die einzigen Proteine, die bei den hier höchsten verwendeten Proteinkonzentrationen ihre Effektivität beibehielten. Abbildung 4.32 stellt die Resultate dieser Versuchsreihe für die Wildtyp-Proteine, M1, K1, EcoGU3, EcoGQ6 und EcoGP8 graphisch dar.

Alle Proteine zeigten in der MBC Aktivität gegen sämtliche getesteten Listerien-Serovare, jedoch waren hierfür je nach Protein unterschiedliche Proteinkonzentrationen notwendig und es konnten unterschiedlich viele Zehnerpotenzen an Zellen lysiert werden.

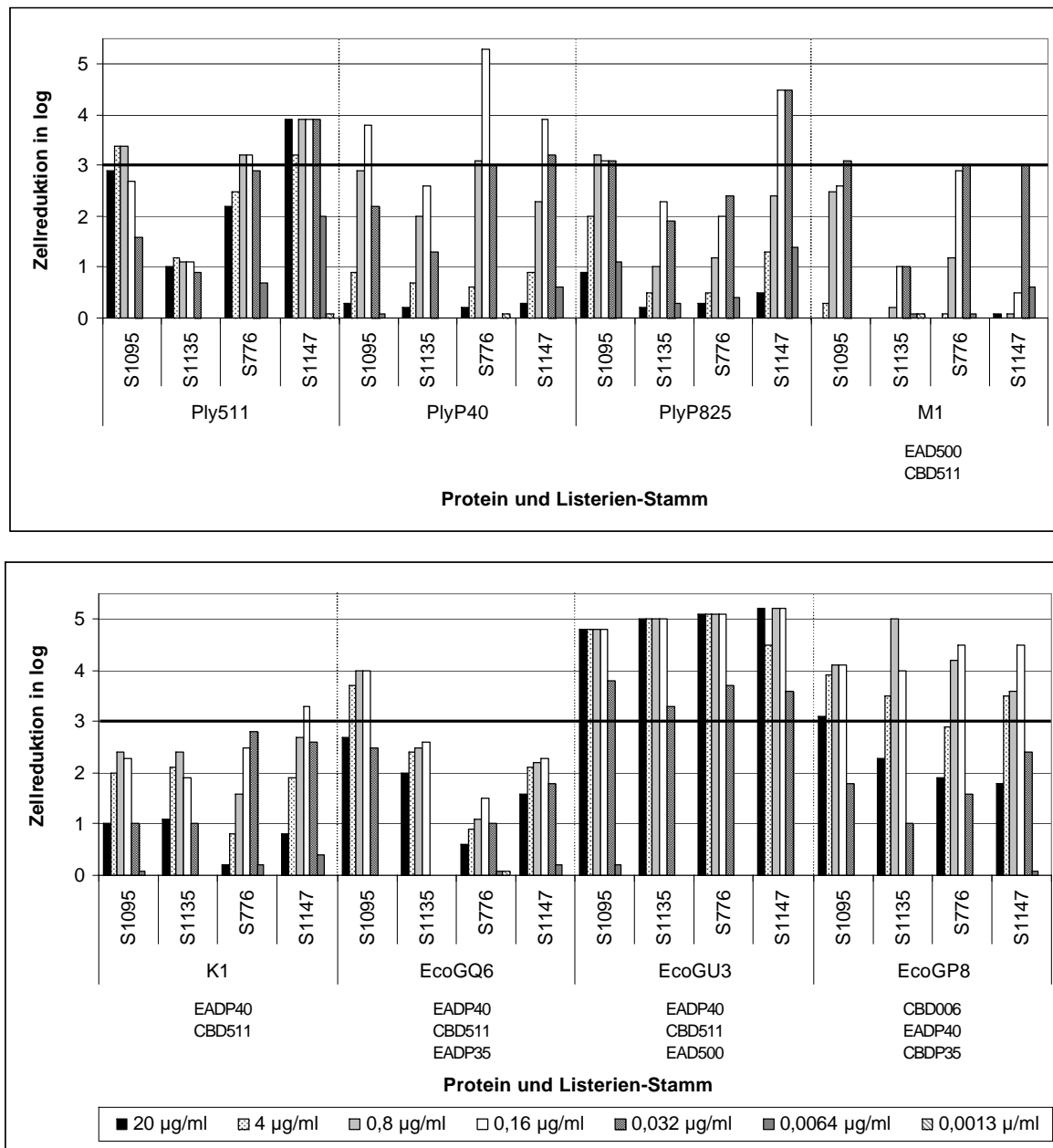


Abbildung 4.32: Darstellung der MBC von Ply511, PlyP40, PlyP825, K1, M1, EcoGQ6, EcoGU3 und EcoGP8 gegen 4 verschiedene Listerienstämme. Getestet wurde gegen ProCC S1095 sv 1/2a, ProCC S1135 sv 3a, ProCC S776 sv 4b und ProCC S1147 sv 6a in Niedrigsalzpuffer pH 6 bei 30°C in Doppelbestimmungen. Die Legende zeigt die Proteinkonzentrationen im Test in µg/ml. Die verdickte horizontale Linie gibt die für die MBC-Bewertung erforderlichen 3 log Zellreduktion an.

In der MIC-Testung war beobachtet worden, dass eine Korrelation zwischen verwendetem Teststamm und benötigter Konzentration zur Wachstumsinhibition bestand. Ein Zusammenhang der Proteinkonzentration mit den MBC-Werten war nicht vorhanden, allerdings konnten bis auf zwei Proteine nur weniger als 3 Zehnerpotenzen von *Listeria monocytogenes* S1135 sv 3a lysiert werden. Gemäß der Definition der MBC konnte somit gegen S1135 sv 3a von den drei Wildtyp-Endolysinen Ply511, PlyP40, PlyP825 und von M1, K1 sowie EcoGQ6 keine entsprechende Konzentration ermittelt werden. K1 und EcoGQ6 zeigten dabei insgesamt nur

bei einem Stamm mehr als drei Zehnerpotenzen Zellreduktion, so wurden jeweils mit den minimalen bakteriziden Konzentrationen von 0,16 µg/ml von K1 bei S1147 sv 6a 3,3 log und von EcoGQ6 bei S1095 sv 1/2a 4 log abgetötet. PlyP825 und M1 wiesen niedrigere MBC-Werte von 0,032 µg/ml auf, wobei PlyP825 von S776 sv 4b nur 2,3 log Zellen reduzierte aber umgekehrt 4,5 Zehnerpotenzen von S1147 sv 6a abtöten konnte. Die MBC-Werte von Ply511 lagen je nach Teststamm zwischen 0,032 und 0,16 µg/ml, die maximale Reduktion betrug dabei zwischen 3,2 und 3,9 log. Auch bei PlyP40 konnten mit 0,032-0,16 µg/ml ebenfalls von den verbleibenden drei Serovaren mindestens drei Zehnerpotenzen lysiert werden und bei S776 sv 4b wurden mit 0,16 µg/ml sogar sämtliche Zellen im Test zerstört. Die besten Resultate waren bei EcoGU3 und EcoGP8 zu sehen. Beide Proteine konnten unabhängig vom Serovar mehr als 3 Zehnerpotenzen lysieren. Bei EcoGU3 wurde als MBC-Wert jeweils 0,032 µg/ml ermittelt und mit der fünffachen Menge wurden alle 10^5 Listerien im Test abgetötet. Von EcoGP8 waren für die MBC 0,16 µg/ml nötig, bei S1135 sv 3a konnten mit 0,8 µg/ml zudem 5 log Zellen im Test lysiert werden.

Somit konnte in der MBC-Testung im Gegensatz zur MIC von EcoGP8 keine unterschiedliche Aktivität gegen verschiedene Serovare beobachtet werden, womit das Ergebnis aus dem *Screening*-Test der Wachstumsinhibition (4.2.3.4) bestätigt werden konnte.

4.3.2.7 Bakterizide Wirkung in Milch

Als Extrembeispiel einer komplexen Lebensmittelmatrix wurde ultrahocherhitzte Milch mit 1,5 % Fett-Anteil verwendet. Getestet wurde auf bakterizide Wirkung in 0,5 ml mit in etwa 10^5 Zellen von ProCC S1095 sv 1/2a mit 3 h Inkubation bei 30°C (3.5.6).

In Orientierung an die ermittelten MBC-Werte in Puffer wurden in Milch die Proteinkonzentrationen von 0,032, 0,8 und 20 µg/ml verwendet, so dass außer von PlyP40 von den Proteinen die jeweils höchsten Zellzahlreduktionen erreicht werden konnten.

Es zeigte sich, dass in Milch die Wirkkonzentrationen zu höheren Werten verschoben waren, so dass mit 0,032 und 0,8 µg/ml Enzym jeweils kaum Zellen lysiert wurden (zwischen 0 und 0,2 log, Daten nicht gezeigt). Abbildung 4.33 stellt die Zellreduktion mit 20 µg/ml Protein in Milch in Zehnerpotenzen dar.

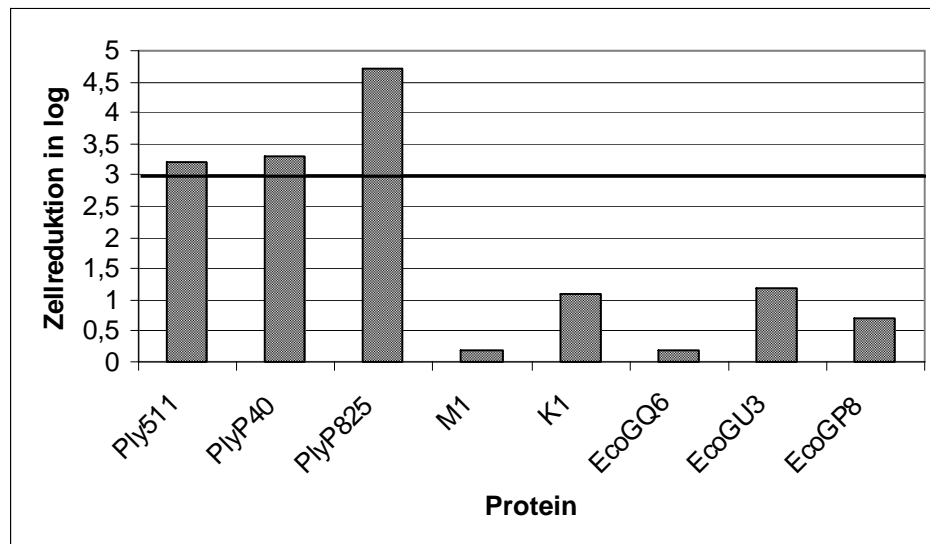


Abbildung 4.33: Listerienreduktion in Milch der gereinigten Proteine. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 20 µg/ml. Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmungen. Die verdickte horizontale Linie gibt die Zellreduktion von 3 log an.

Die Wildtyp-Proteine Ply511 und PlyP40 zeigten prinzipiell ähnliche Effizienzen wie in Puffer mit pH 6 und zerstörten etwas mehr als 3 log. PlyP825 besaß die höchste Wirkung und nahezu alle Zellen wurden abgetötet. Somit war bei den Wildtyp-Endolysinen eine vergleichbare, im Fall von PlyP825 sogar höhere Zellzahlreduktion als in Puffer zu beobachten, wobei allerdings in Milch höhere Proteinmengen nötig waren und sowohl bei PlyP40 als auch bei PlyP825 trat mit 20 µg/ml daher keine Hemmung durch eine zu hohe Proteinkonzentration wie in Puffer auf.

Deutlich schlechtere Zellzahlreduktion war bei den *gescreenten* Proteinen zu beobachten. M1 und EcoGQ6 erreichten 0,2, EcoGP8 0,7, K1 und EcoGU3 1,1 bzw. 1,2 log Zellzahlreduktion.

Bei Verwendung von 20 µg/ml Protein von K1 und M1 konnte sowohl in Puffer als auch in Milch keine 3 log an Zellen lysiert werden. Außerdem konnten in Milch mit K1 und M1 auch nicht mit 0,032 bzw. 0,8 µg/ml die in Puffer erhaltenen Zellzahlreduktionen erreicht werden. Ob die optimale Wirkkonzentration dieser 2-Domänen Proteine in Milch zwischen den getesteten Konzentrationen oder höher als 20 µg/ml lag, müsste experimentell bestimmt werden.

Ähnliches gilt für die 3-Domänen Proteine EcoGQ6 und EcoGP8, denn auch bei diesen Kandidaten war konzentrationsabhängige Hemmung beobachtet worden. Unerwartet war diesbezüglich das Ergebnis von EcoGU3, denn bei diesem Protein trat zuvor in Puffer und Medium keine konzentrationsabhängige Hemmung auf, weshalb bei diesem Protein die niedrige Zellzahlreduktion in Milch eindeutig auf die Matrix der Milch zurückzuführen ist.

4.3.3 Proteinstabilität

4.3.3.1 Proteolytische Stabilität

Für eine Anwendung im Lebensmittel sollte gewährleistet sein, dass die Zellwand-Hydrolase in der Lebensmittelmatrix nicht unmittelbar proteolytisch abgebaut wird. Als Beispiel für eine Protease wurde Trypsin gewählt. Trypsin ist eine Endopeptidase, die hinter den basischen Resten Lysin (K) und Arginin (R) spaltet, sofern nicht bestimmte Ausnahmen zutreffen. So spaltet Trypsin z. B. meist nicht, wenn auf Lysin bzw. Arginin ein Prolin folgt.

Zum Vergleich der proteolytischen Stabilität wurden dieselben molaren Mengen der gereinigten Proteine im molaren Verhältnis von 1 zu 10 mit Trypsin verdaut (3.4.3.1). In bestimmten Zeitabständen wurden Aliquots zur Analyse auf SDS-Gelen entnommen. Die Resultate sind in Abbildung 4.34 gezeigt. Die Höhe der Proteinbanden korrelieren nicht exakt mit dem Protein-Standard, was vermutlich mit dem veränderten Laufverhalten auf dem 4-12 %igen Gradienten-Gel zurückzuführen ist.

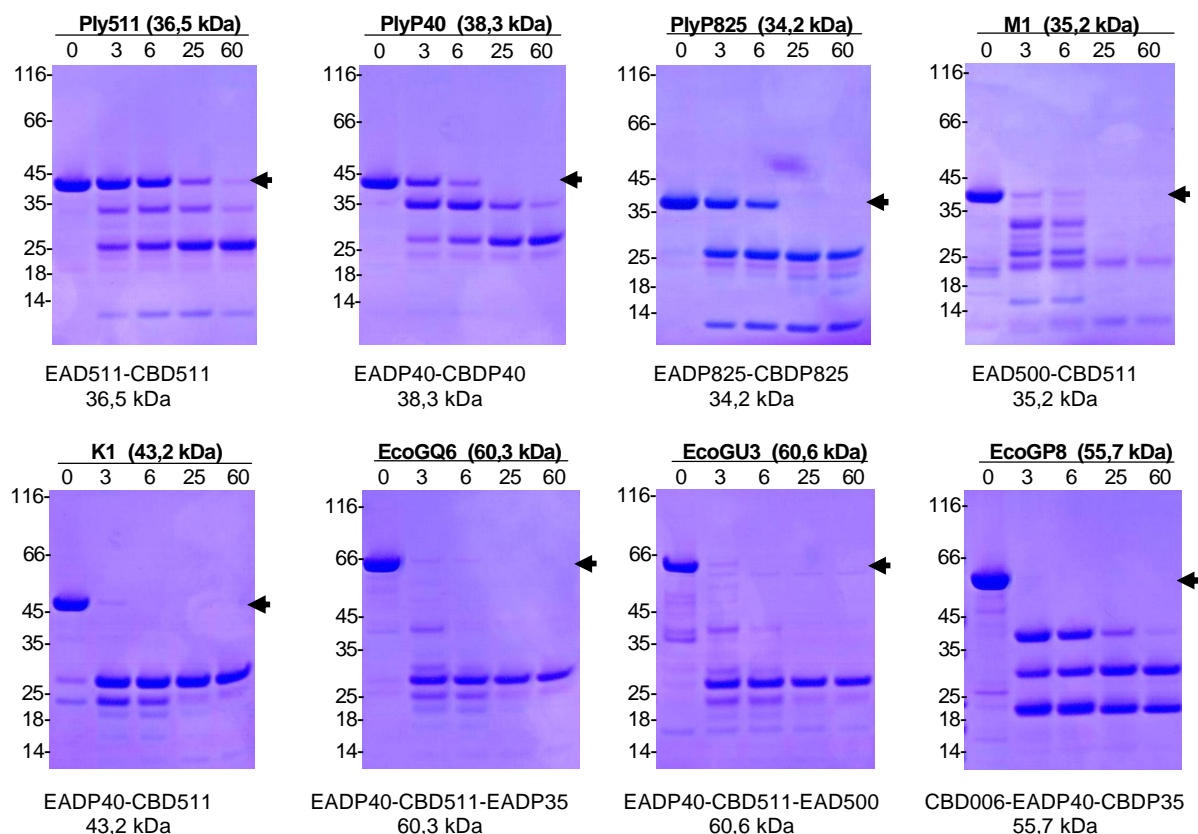


Abbildung 4.34: Analyse des Trypsinverdaus der gereinigten Proteine über SDS-Gelelektrophorese. Probenentnahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 25 und 60 min. Banden der Vollständigkeitsproteine sind mit einem Pfeil markiert. Der Protein-Standard ist in kDa angegeben. Analysiert wurde auf einem 4-12 %igen Gradienten-Gel (NuPage Novex, Invitrogen GmbH, Darmstadt).

Durch Proteolyse mit Trypsin entstanden bei allen getesteten Proteinen distinkte Abbauanden, die höhere Proteaseresistenz als die Volllängenproteine besaßen. Bei M1 war dies allerdings weniger gut zu beobachten. PlyP825, dessen CBD homolog zur CBD511 ist, zeigte ein ähnliches Abbaumuster jedoch um eine Abbaubande weniger.

Während bei allen Wildtyp-Endolysinen nach 6 min Inkubation noch Volllängenprotein zu sehen war, wurden die *gescreenten* Proteine bereits nach 3 min zu Fragmenten zerlegt. Dabei hatten K1, EcoGQ6 und EcoGU3 das identische verbleibende Bandenmuster. Diese drei Proteine haben an Position 1 EADP40 und an Position 2 CBD511.

Der Abbau von Ply511 durch Trypsin wurde bereits untersucht und erfolgt in der CBD am Sequenzmotiv LLSKIK an K246 und K248 sowie an den hintereinander liegenden Lysinen K267 K268 (Patent 2009, s. Anhang). Die verbleibenden Proteinfragmente sind 26,5 und 9,9 kDa bzw. 28,5 und 7,9 kDa groß und bestehen aus EAD511 mit Teilen der CBD511 bzw. den C-Termini der CBD511.

In der zur CBD511 homologen Sequenz von PlyP825 ist mit LLAKIK ein ähnliches Sequenzmotiv wie LLSKIK vorhanden, korrespondierende Aminosäuren für K267 K268 hingegen nicht. Zu dieser Tatsache passend entstanden durch Trypsinverdau von PlyP825 nur Abbaubanden mit den Größen von 23,0 und 11,2 kDa, die vermutlich durch Proteolyse an LLAKIK herrühren. Die entstandenen Fragmente aus EADP825 mit dem N-Terminus der CBDP825 sowie der C-Terminus der CBDP825 blieben über die 60 min Verdau stabil.

M1, dessen EAD500 und CBD511 jeweils hohe Anteile homologer Aminosäuren zu PlyP825 aufweisen, wurde im Gegensatz zu PlyP825 und Ply511 gänzlich abgebaut. Somit scheint EAD500 im Vergleich zu EADP825 in diesem Zeitraum von Trypsin mehrmals geschnitten zu werden. Allerdings existiert in EADP825 lediglich eine potentielle Trypsin-Schnittstelle weniger und in beiden EADs ist die Aminosäure der vorangehenden Position ein Lysin (Daten nicht gezeigt), welches wahrscheinlich bei Exponiertheit in beiden Fällen verdaut wird. Es wäre interessant zu sehen, ob EAD500 auch im Wildtyp-Endolysin Ply500 derart schnell abgebaut wird, oder ob diese proteolytische Instabilität mit der Wahl des Sequenzabschnittes oder der Fusion an die CBD511 zusammenhängt.

Bei den Proteinen K1, EcoGU3 und EcoGQ6 wurden durch Inkubation mit Trypsin identische Abbaubanden gebildet. Da alle drei Proteine an Position 1 EADP40 und an Position 2 CBD511 haben und bei EcoGU3 und EcoGQ6 an der dritten Position jeweils EAD500 bzw. EADP35 ist, scheinen die Domänen an der dritten Position gänzlich von Trypsin abgebaut zu werden, was bezüglich der EAD500 zu dem bereits beschriebenen Abbau von M1 passt.

Die 60 min lang stabilen Banden von K1, EcoGU3 und EcoGQ6 entstanden vermutlich durch Proteolyse der CBD511, welche bei vollständigem Erhalt der EADP40 bei 33,5 + 9,7 und 31,3 + 11,9 kDa liegen sollten. Die verbliebenen Banden von K1, EcoGQ6 und EcoGU3

wirken jedoch kleiner, was durch einen weiteren Trypsinverdau in der EADP40 hervorgerufen werden könnte.

Die Abbaubanden von PlyP40 und von EcoGP8 können nicht zugeordnet werden, die Ergebnisse zeigten jedoch in PlyP40 zwei und in EcoGP8 mindestens zwei zugängliche Trypsin-Schnittstellen, von denen zumindest eine in der EADP40 liegt, wie die Resultate von K1, EcoGU3 und EcoGQ6 vermuten lassen.

Insgesamt war von den Wildtyp-Endolysinen länger nicht abgebautes Protein vorhanden als von den *gescreenten* Kandidaten. Die Stabilitäten dieser Proteine sollten daher vor einer Anwendung beispielsweise durch Zufallsmutagenese und Veränderung der verwendeten Domänenabschnitte optimiert werden.

4.3.3.2 Thermische Stabilität

Die *gescreenten* chimären Proteine und die Wildtyp-Endolysine wurden zum Vergleich bezüglich ihrer thermischen Stabilität analysiert. Hierzu wurden Aliquots der Proteine bei 55°C inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten bis zu 50 min auf Restaktivität mittels Lysetest (3.4.3.4) überprüft. Um während der Messung pufferbedingte pH-Veränderungen zu vermeiden, erfolgte die thermische Inkubation in Phosphatpuffer. Abbildung 4.35 stellt die Ergebnisse graphisch dar und die ermittelten Halbwertszeiten sind in Tabelle 4.20 gezeigt.

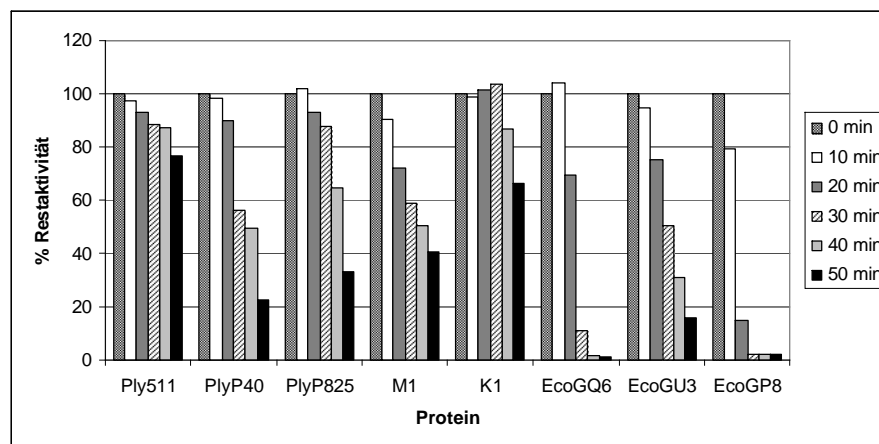


Abbildung 4.35: Erhalt der Aktivität nach Inkubation bei 55°C. Die Probennahme erfolgte nach 0, 10, 20, 30, 40 und 50 min.

Das temperaturstabilste Protein war unter diesen Bedingungen Ply511, gefolgt von K1. Für diese beiden Proteine konnten die t_{50} -Werte nicht aus der Messung abgelesen werden und wurden extrapoliert. Ply511 würde demnach nach 118 min bei 55°C noch 50 % der Restaktivität besitzen und K1 nach 59 min. Die Temperaturstabilität von M1 war vergleichbar mit

den Wildtyp-Proteinen PlyP40 und PlyP825. Am wenigsten stabil waren die 3-Domänen Proteine.

Tabelle 4.20: Halbwertszeiten der Endolysine bei 55°C. *Errechnet durch Extrapolation.

Protein	Ply511	PlyP40	PlyP825	M1	K1	EcoGQ6	EcoGU3	EcoGP8
t ₅₀ (55°C)	118 min*	40 min	45 min	40 min	59 min*	23,5 min	30 min	13 min

Ply511 zeigte nach 50 Minuten Inkubation bei 55°C fast 80 % Restaktivität und war daher in dieser Testung stabiler als N-terminal His-markiertes His-Ply511, welches nach 30 min bei 50°C nur noch 70 % verbleibende Aktivität hatte (Schmelcher, 2007). NHis-Ply511 besaß in derselben Messreihe dabei höhere thermische Stabilitäten als NHis-Ply500 mit 50 % Aktivität nach 30 min oder NHis-PlyP35 mit ca. 30 %. Die Ergebnisse dieser His-markierten Wildtyp-Endolysine sind vermutlich aufgrund des His-tags nicht gänzlich übertragbar, wie allein der Vergleich von Ply511 und NHis-Ply511 zeigt, sie geben jedoch einen Hinweis auf die abnehmende Stabilität von Ply511 zu Ply500 zu PlyP35.

Die im Vergleich zu K1 thermisch weniger stabilen Konstrukte EcoGU3 und EcoGQ6 mit zusätzlicher EAD500 bzw. EADP35 an der dritten Position könnten daher auch von den intrinsisch geringeren thermischen Stabilitäten der EADs aus Ply500 und PlyP35 negativ beeinflusst werden. Es scheint in den chimären Konstrukten allerdings generell eine Tendenz zu geben, dass Kandidaten mit drei Domänen schneller inaktiviert wurden als jene mit zwei Domänen. Dies ist auch erklärbar, wenn man bedenkt, dass diese Domänen ohne weitere Optimierung und vorhersagbaren stabilisierenden Interaktionen aneinander ligiert wurden.

Dadurch ist auch interessant, dass die thermischen Stabilitäten der chimären 2-Domänen Proteine mit denen der beiden Wildtyp-Proteine PlyP825 und PlyP40 mindestens vergleichbar, im Fall von K1 sogar höher waren. Die Stabilität von K1, welches aus EADP40 und CBD511 besteht, lag damit bezüglich der thermischen Stabilität zwischen den Werten der parental Proteine PlyP40 und Ply511, so dass in K1 anscheinend weniger die Verbindung der Domänen als mehr die Eigenschaften der Domänen die Stabilität beeinflussten.

Bei Gegenüberstellung der Proteine M1 und PlyP825 mit vergleichbarer Domänenkombination zeigt hierzu, dass die verbleibende Aktivität von M1 zu Beginn deutlich schneller abnahm als von PlyP825. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf vorhandene stabilisierende ionische Wechselwirkungen beispielsweise von der EAD zum Linker und zur CBD sowie vom Linker zur CBD im PlyP825.

Eine längere Lagerung von Lebensmitteln und die damit verbundene Anwendung der Zellwandhydrolasen geschehen maximal bei Raumtemperatur. Da zudem die Lyse der

Listerien-Zellen sehr schnell erfolgt, spricht die geringe Temperaturstabilität von beispielsweise EcoGQ6, EcoGU3 und EcoGP8 nicht gegen eine Anwendung im Lebensmittel. Vielmehr wäre die Langzeitstabilität der Proteine entscheidend, um diese zu ermitteln müssten allerdings über weitere Reinigungsschritte sämtliche störenden Proteasen von den Proteinen abgetrennt werden.

4.3.3.3 Chemische Stabilität gegen Guanidin-Hydrochlorid

Die gereinigten Proteine wurden bezüglich der chemischen Stabilität gegenüber Guanidin-Hydrochlorid untersucht (3.4.3.3). Die Auswirkung von GdnHCl auf Ply511 wurde bereits untersucht (Pieper, 2005) und demnach ist das Protein bis 1 M GdnHCl stabil und wird bei 1,6 M zu 50 % denaturiert. Für die Auswahl der Messpunkte wurden diese Angaben als Grundlage verwendet. Da nach 24 h die Denaturierung noch nicht abgeschlossen war, wurden die Daten nach fünf Tagen Inkubation erhoben.

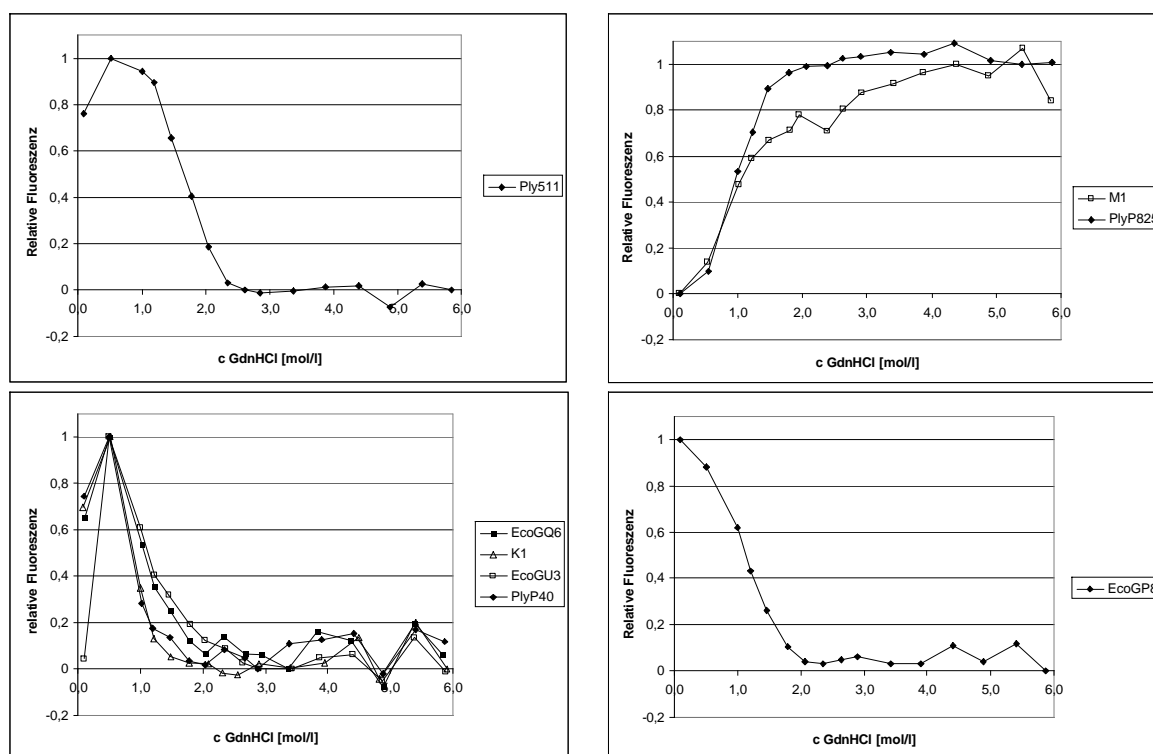


Abbildung 4.36: Denaturierung der gereinigten Proteine über GdnHCl. Die Inkubation der Proben mit jeweils 274 pmol/ml Protein erfolgte bei Raumtemperatur für fünf Tage. Gemessen wurde mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm und Emissionswellenlänge von 326,5 nm bei Ply511, von 317,5 nm bei PlyP40, von 370 nm bei PlyP825, von 387,5 nm bei M1, von 318 nm bei K1, von 321 nm bei EcoGQ6, von 317,5 nm bei EcoGU3 und von 318 nm bei EcoGP8. Die spektrale Bandbreiten für Anregung betrug 5 nm und für Emission 10 nm.

Abbildung 4.36 zeigt die relative Fluoreszenz in Abhängigkeit der Konzentration von GdnHCl für die analysierten Proteine. Graphisch zusammengefasst wurden die Proteine M1 und

PlyP825, die beide aus einer N-terminalen (bei PlyP825 putativen) Peptidase und einer CBD511 oder CBD511-homologen Domäne am C-Terminus bestehen. Auch PlyP40, K1, EcoGQ6 und EcoGU3 wurden gemeinsam dargestellt, diese Proteine beginnen alle mit EADP40.

Denaturierung führte bei Ply511, PlyP40, K1, EcoGQ6, EcoGU3 und EcoGP8 zu einer Signalabnahme, bei M1 und PlyP825 zu einer Zunahme. Ply511 zeigte sich als das chemisch stabilste Protein der untersuchten Kandidaten. Ply511 war in etwa bei 1,65 M GdnHCl zu 50 % denaturiert. Die c_{50} -Werte für die anderen Proteine lagen niedriger. Aus diesen Kurven könnte man Werte zwischen 0,85-1,1 M GdnHCl abschätzen, für genauere Bestimmung müssten engere Punkte zwischen 0-1,5 M GdnHCl genommen werden.

Bei der geringsten GdnHCl-Konzentration von 50 mM tendierten die Proteine Ply511, PlyP40, K1, EcoGQ6 und EcoGU3 entweder zu Aggregation oder zu Adsorption an die Gefäßwände der Reaktionsgefäße. Dieser Effekt konnte bei 0,5 M GdnHCl unterdrückt werden, deshalb sind die Messwerte bei dieser Konzentration höher als bei 50 mM GdnHCl.

Beim Vergleich der Kurven für EcoGQ6, EcoGU3, K1 und PlyP40 ergab sich ein flacherer Abfall der Steigung bei höheren GdnHCl-Konzentrationen bei den 3-Domänen Proteinen. Dies könnte auf unabhängig voneinander entfaltende Domänen zurückzuführen sein.

Insgesamt zeigten die Domänenkombinationen jedoch keine auffällig abweichenden chemischen Stabilitäten.

5 Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur zufälligen Kombination von Protein-Domänen, speziell Endolysin-Domänen, zu entwickeln. Über je nach beabsichtigter Protein-Applikation definierte *Screening*-Schritte wurden anschließend Varianten mit den erforderlichen Eigenschaften selektiert. Damit soll die bisherige Strategie abgelöst werden, einzelne Konstrukte zu entwerfen, zu klonieren, zu reinigen und zu testen, die sehr zeitaufwändig und arbeitsintensiv ist und zudem meist nicht zu funktionsfähigen Enzymen führt (Daniel *et al.*, 2009).

Ein möglicher Grund für unbrauchbare Domänenkombinationen ist, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Domänen in allen Wildtyp-Proteinen tatsächlich völlig unabhängig voneinander sind. Die Struktur des Endolysins Cpl-1 aus einem Streptococcen-Phagen zeigt beispielsweise, dass die Domänen miteinander interagieren. Der C-Terminus der CBD befindet sich in einer hydrophoben Grube der EAD, wodurch die hydrophobe Berührungsfläche abgeschirmt wird. Diese hydrophobe Grube ist im strukturhomologen, nicht modularen Bakteriozin Cellosyl nicht vorhanden (Hermoso *et al.*, 2003). Eine derartige Interaktion konnte auch bei dem Listerien-Endolysin PlyPSA nicht beobachtet werden (Abbildung 1.7, S. 13; Korndörfer *et al.*, 2006).

5.1 Generierung und *Screening* einer Genbank aus 19 zufällig kombinierten Domänen

5.1.1 Konzeption der Klonierungsstrategie

Eine geeignete Klonierungsmethode sollte dazu führen, dass mehrere, völlig unterschiedliche Domänen auf DNA-Ebene zufällig miteinander kombiniert werden können. Die Methode der Klonierung sollte die Anzahl der verschiedenen zu kombinierenden Domänen nicht beschränken und die Generierung von Proteinen aus einer definierten Anzahl von 2, 3 oder auch mehr Domänen erlauben. Dabei sollten alle Domänen grundsätzlich an allen Positionen zugelassen werden. Außerdem sollen die eingesetzten Domänen keinerlei Voraussetzungen wie z. B. Homologien mit sich bringen müssen.

Im Fall der Endolysine sollten so auch Moleküle mit N-terminaler CBD und C-terminaler EAD entstehen können. Ein solcher Aufbau ist von bisher bekannten Endolysinen aus Phagen gegen grampositive Bakterien nicht bekannt (Fischetti, 2010). Bei anderen Zellwand-Hydrolasen wie den Autolysinen sind die enzymatisch aktiven Domänen jedoch auch am C-Terminus zu finden. Ebenso bei den Endolysinen Φ KZ144 und EL188 aus Phagen gegen

Pseudomonas, einem gramnegativen Bakterium, sind die Zellbindedomänen N-terminal und die enzymatisch aktiven Domänen C-terminal angeordnet (Briers *et al.*, 2007).

Für spätere Variationen der Methode oder nachfolgende Generationen basierend auf einem ersten *Screening* sollte es möglich sein, bestimmte Sequenzen nur an einer gewünschten Position zuzulassen, wie beispielsweise Domänen, die erfahrungsgemäß nur an einer Position optimal funktionsfähig sind. Zusätzlich sollte eine nachträgliche Modifikation wie z. B. der gezielte Austausch einzelner Domänen leicht möglich sein.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Ansätze zur *in vitro*-Fusion von DNA-Fragmenten: über Aneinanderreihung mit Hilfe homologer Abschnitte in einer PCR-Reaktion oder durch Ligation zueinander passender Enden. Voraussetzung ist in jedem Fall die Verwendung positionsspezifischer Sequenzabschnitte, um eine gerichtete Assemblierung zu ermöglichen. Im Folgenden werden Beispiele zu beiden Vorgehensweisen kurz vorgestellt und anschließend die Wahl der hier verwendeten Methode diskutiert.

Für eine zufällige Kombination von DNA-Fragmenten mittels PCR müssen die Fragmente zunächst beidseitig mit den später rekombinierenden Sequenzabschnitten versehen werden. Dafür muss jedes Fragment die für jede Position spezifische Sequenz erhalten. Basierend auf den Prinzipien von OE-PCR (Horton *et al.*, 1989) und *DNA-Shuffling* (Stemmer *et al.*, 1994) können dann innerhalb einer PCR-Reaktion alle Abschnitte miteinander rekombinieren.

Gegen die Fusion der Endolysin-Domänen mittels PCR spricht, dass nicht nur die identischen terminalen Abschnitte der Fragmente *annealen* können, sondern auch die Domänen mit sich selbst. Daher kann es zur unvorhergesehenen Aneinanderreihung von Domänen kommen.

Zusätzlich können sich auch Deletionen aufgrund homologer Linkersequenzen ereignen. So wurden während einer Amplifikation von *ply511* über PCR auch Produkte amplifiziert, bei denen die erste Subdomäne der CBD deletiert war. Dies begründet sich darin, dass der Linker zwischen EAD und CBD mit dem Linker zwischen den beiden Subdomänen der CBD Ähnlichkeiten aufweist (Daten Hyglos GmbH, nicht veröffentlicht). Bei Einsatz von mehreren Domänen mit identischem synthetischen Linker würde dieses Problem zudem verstärkt. Das Design und die Klonierung von individuellen synthetischen Linkern hingegen wäre äußerst aufwendig.

Aus diesen Gründen sollte die hier verwendete Methode nicht auf Rekombination mittels PCR beruhen, sondern über Ligation geschehen. Insbesondere sollte dabei die zufällige Aneinanderreihung der Domänenfragmente nicht über *blunt-end* Ligation erfolgen, dies würde zwar eine schnelle Vorbereitung der Fragmente ermöglichen, jedoch zu völlig

unkontrollierten Reaktionen und zu einem hohen Prozentsatz unproduktiver Ligationen führen.

Im Allgemeinen können definierte, fusionierbare Enden beispielsweise durch Restriktionsenzyme, Uracil-Excision (Nisson *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1993) sowie diverse Exonukleasen wie die Lambda Exonuklease, deren Aktivität von Phosphorothiolaten in der Sequenz gestoppt wird (Liu und Liu, 2010), oder Vaccina Topoisomerase I (Shuman *et al.*, 1994) gebildet werden. Des Weiteren kann Inkorporation von zu Basen alternativen Resten wie 1,3-Propandiol (Gade *et al.*, 1993; Kaluz und Flint, 1994) oder RNA-DNA-Hybridmoleküle in Kombination mit Enzymen, die jeweils nur eine dieser Nukleinsäuren als Substrat erkennen (Coljee *et al.*, 2000; Donahue *et al.*, 2002, Li und Gao, 2007), zu überhängenden Enden führen.

Ein gemeinsames Prinzip dieser Methoden ist, dass die zu kombinierenden DNA Fragmente für die Ligation vorbereitet werden müssen, indem Schnittstellen bzw. Erkennungssequenzen sowie positionsspezifische, homologe Nukleotidbereiche für eine orientierte Fusion angefügt werden. Diese können über PCR-Primer, Ligation oder auch mit Hilfe von Gensynthese an die zu kombinierenden Fragmente angehängt werden.

Ein Schwerpunkt der in dieser Arbeit entwickelten Methode stellt die Möglichkeit dar, die *gescreenten* Moleküle nachträglich zu modifizieren. Deshalb sollten die aneinandergereihten Gene als eigenständige Blöcke erhalten bleiben. Dazu bietet sich die Verwendung positionsspezifischer Restriktionsschnittstellen an. Es wurden Restriktionsschnittstellen für Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, welche in großer Vielfalt kommerziell erhältlich sind.

Alle zu kombinierenden Domänen liegen in Plasmiden vor, die als Matrizen für die Amplifikation positionsspezifischer Fragmente über PCR dienen. Hierbei wird für jede Position lediglich ein Primerpaar benötigt, um die entsprechenden Restriktionsschnittstellen einzuführen. Die sequentielle Ligation und Restriktion an der Festphase beseitigen das Problem ungerichteter Ligationen und ermöglichen zudem eine einfache Entfernung unerwünschter Nebenprodukte und Pufferkomponenten.

Andere Möglichkeiten für die Umsetzung der zufälligen Kombination von Domänen oder Genabschnitten mit Hilfe von Ligation wurden mit den Methoden *Y-Ligation-based block shuffling* (YLBS; z. B. 8 Blöcke, die untereinander *geschuffelt* wurden, Kitamura *et al.*, 2002), *Sequence Independent Site-Directed Chimeragenesis* (SISDC; 8 Positionen zu je 2 Fragmenten, Hiraga und Arnold, 2003), *Uracil-Specific Excision Reagent* (USER) *friendly DNA recombination* (USERec; 10 Positionen zu je 2 Fragmenten, Villiers *et al.*, 2010) und *Golden Gate Shuffling* (9 Positionen zu je 3 Fragmenten, Engler *et al.*, 2009) beschrieben.

Bei der Methode YLBS liegen zu kombinierende Fragmente linear und einzelsträngig vor. Über *Annealing* an homologen Randsequenzen werden Fragmente für verschiedene Positionen in räumliche Nähe zueinander gebracht und miteinander ligiert. PCR mit Primern, die an den homologen Randbereichen *annealen*, amplifiziert die Fusionsprodukte und gezielter Verdau mit Restriktionsenzym Typ IIs entfernt die homologen Randbereiche auf einer Seite. Restriktionsenzyme vom Typ IIs sind Endonukleasen, die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden. Anschließende Separation der dsDNA zu ssDNA führt zu neuen einzelsträngigen DNA-Fragmenten mit jeweils zwei Fragmenten, welche in eine neue Runde eingesetzt werden können (Kitamura *et al.*, 2002). YLBS wurde bisher mit Fragmentgrößen zwischen 30 und 160 Nukleotiden durchgeführt. Nach Kitamura und Mitarbeitern kann diese Technik jedoch auf Neukombination von größeren Fragmenten ausgedehnt werden, die für 100 oder mehr Aminosäuren codieren, und damit könnten Proteine mit bis zu 300 Aminosäuren gebildet werden. Somit wäre YLBS auf Endolysin-Domänen anwendbar. Durch die schrittweise Ligation ist es ausreichend, dass die Fragmente für alle Positionen mit den gleichen homologen Sequenzen kloniert werden, was einen großen Vorteil in der Vorbereitung bedeutet. Allerdings ist zu erwähnen, dass umso geringere Ausbeuten erzielt werden, je länger die kombinierten Fragmente sind und je höher der Unterschied zwischen den Fragmentgrößen ist. Zudem ist die Durchführung von YLBS sehr aufwändig. So sind zwischen den einzelnen Fusions-Schritten Analysen, Reinigungen mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese und Schritte für Separation der DNA-Einzelstränge sowie gegebenenfalls auch DNA-Amplifikationen nötig. Auch besteht die Möglichkeit, dass z. B. identische Linkersequenzen innerhalb verschiedener Fragmente sowie das Vorhandensein derselben Domänensequenz an verschiedenen Positionen dazu führen, dass präferiert identische Domänen aneinander gereiht werden. Dies könnte auch aus den dargestellten Ergebnissen von Kitamura *et al.* (2002) abgeleitet werden.

SISDC wurde zur Rekombination von Bereichen innerhalb von Genen entwickelt. An die zu kombinierenden Fragmente werden Sequenzabschnitte mit Erkennungssequenzen eines Restriktionsenzym vom Typ IIs eingeführt. Durch beidseitigen Verdau werden diese Sequenzabschnitte entfernt und Fragmente können rekombinieren (Hiraga und Arnold, 2003; Farrow *et al.*, 2010).

USERec ist eine *Shuffling*-Methode, die sich der Strategie der *Uracil-Excision* bedient. (Nisson *et al.*, 1991; Rashtchian *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1993; Booth *et al.*, 1994). Dabei wird 7-12 nt vom 5'-Terminus über PCR ein Uracil eingeführt und die Base im Anschluss von Uracil-DNA Glykosidase (UDG) entfernt. Nach Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats der DNA an dieser Stelle mit Glykosylase-Lyase Endo VIII entstehen einzelsträngige Überhänge (Nour-Eldin *et al.*, 2006; Bitinaite *et al.*, 2007; Geu-Flores *et al.*, 2007).

Die Methode des *Golden Gate Shufflings* (Engler *et al.*, 2008 und 2009; Engler und Marillonnet, 2011) wurde während dieser Arbeit veröffentlicht und zeigt eine elegante Weiterführung der Klonierungsstrategie des *DNA Splicing by directed ligation* (SDL; Lebedenko *et al.*, 1991; Berlin, 1999). Jedes zu kombinierende DNA-Fragment liegt in einem Donorplasmid vor. An den Vektorgrenzen der Donorplasmide sind Erkennungssequenzen eines Restriktionsenzym Typ IIs. Gleichzeitige Inkubation von Akzeptor- und Donorplasmiden mit Ligase und Restriktionsenzym in einer Reaktion führt zu positionsspezifischem *Shuffling*.

Die Methoden SISDC, USERec und *Golden Gate Shuffling* wären durchaus auf die Problematik der Neukombination von Endolysin-Domänen übertragbar, besonders attraktiv erscheint dabei die geringe Dauer des *Shufflings* der Genfragmente. Für das *Golden Gate Shuffling* werden dafür beispielsweise je nach Komplexität einer Genbank 70 min bis 4,5 h benötigt (Engler und Marillonnet, 2011).

Für die Praktikabilität einer Methode der zufälligen Kombination von Domänen ist es jedoch nicht nur entscheidend, dass der eigentliche Schritt der Neukombination schnell erfolgen kann. Ein äußerst bedeutsamer und zeitaufwendiger Schritt ist die damit verbundene Probenvorbereitung. So wird beispielsweise für ein Protokoll folgend der Strategie von SISDC angegeben, dass der eigentliche *Shuffling*-Schritt innerhalb eines Tages erledigt werden kann, die vollständige Durchführung jedoch vier bis acht Wochen erfordern kann (Farrow *et al.*, 2010), was sich mit dem hohen Klonierungsaufwand zur Erstellung der Ausgangskonstrukte begründen lässt. Denn sowohl bei SISDC als auch bei den oben genannten Methoden USERec und *Golden Gate Shuffling* muss für jede Position einer jeden Domäne ein Amplifikat mit verschiedenen Enden hergestellt werden. Somit wären bei einer Kombination von 19 Domänen an beispielsweise drei Positionen 114 Primer in 57 verschiedenen PCR-Ansätzen nötig. Die Ligation in einen Vektor, der diese Randbereiche einbringt, wie es auch für die Vorgehensweise des *Golden Gate Shufflings* beschrieben wurde (Engler und Marillonnet, 2011), würde 57 Klonierungen und Transformationen mit anschließender Auffindung korrekter Klone erfordern.

Bezüglich der Probenvorbereitung weist die hier erstellte Methode einen wesentlichen Vorteil auf. Hier wird jede Domäne einmal als Matrize in ein Plasmid kloniert und anschließend über PCR für jede Position amplifiziert. Dazu wird für jede Domänenposition nur ein Primerpaar verwendet, welches auf dem angrenzenden Plasmid *annealt* und die Sequenzen für die benötigten Schnittstellen enthält.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Einführung der Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen vom Typ II zu keiner großen Veränderung der Linkerregion führt, es verbleiben lediglich sechs Basenpaare. Dies ist bei allen Methoden zur gerichteten Assemblierung von DNA-

Fragmenten, die lange einzelsträngige Überhänge verwenden wie z. B. In-Fusion™ (Benoit *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007; Sleight *et al.*, 2010), *Sequence and Ligation-Independent Cloning* (SLIC; Li und Elledge, 2007), Isothermale Assemblierung (Gibson *et al.*, 2009) und *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC; Quan und Tian, 2009 und 2011) nicht möglich. Hier werden je nach Methode bis zu 14 Aminosäuren durch die Überhänge eingeführt, wodurch die proteineigenen Linker nicht oder nur reduziert beibehalten werden können.

Ein interessanter Ansatz wäre die Synthese der Probenvorbereitung, wie sie in dieser Arbeit entwickelt wurde mit der parallelen, kontrollierten Fusionsstrategie des *Golden Gate Shufflings*. Eingesetzt würden dann keine Donorplasmide, sondern Donor-PCR-Produkte mit Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme Typ IIs. Anders als in dieser Arbeit würden die Restriktionsschnittstellen jedoch nicht beibehalten werden und wären für spätere Modifikationen nicht verwendbar.

5.1.2 Auswertung von Initial- und Spezifitäts-Screening

Bei der Auswertung des Initial-Screenings fiel auf, dass Lysehöfe bei 2-Domänen Proteinen größer erschienen, als bei den 3-Domänen Proteinen. Dies lag vermutlich daran, dass kleinere Proteine im Agar besser diffundieren können, daher lässt die Beobachtung keine Aussage über ihre Aktivität zu. Auch bei C-terminaler Verkürzung des Endolysins Ply511 war festzustellen, dass das verkürzte Enzym größere Lysehöfe bildete (Gaeng *et al.*, 2000), obwohl es geringere spezifische Aktivität aufwies (Profos AG, Daten nicht veröffentlicht). Im Initial-Screening wurde daher zwar die Größe der Lysehöfe dokumentiert, da jedoch auch andere Faktoren, wie Höhe der Expression und Löslichkeit, die Lysehofgrößen beeinflussten, wurden sie nicht als Ausschlusskriterium von Kandidaten herangezogen.

Im Fokus des Initial-Screenings stand zunächst, möglichst viele der aktiven Varianten aufzufinden. Im verwendeten Testsystem ist dabei problematisch, dass nur von aktiven und löslichen Enzymen auf den Screening-Platten Lysehöfe gebildet werden können und die Vielzahl der Konstrukte bei verschiedenen Temperaturen vermutlich unterschiedlich gut löslich exprimiert wird. Damit trotzdem möglichst viele aktiven Kandidaten löslich exprimiert wurden, wurden die Platten im Screening nach Induktion zunächst bei 30°C und danach bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss bei 4°C gelagert. Während der Lagerung bei 4°C sterben mehrere *E. coli* Zellen der Kolonien ab und setzen die exprimierten Proteine aus den Zellen frei. Somit können auch aktive Enzyme detektiert werden, die nur gering exprimiert werden.

Durch beschriebene Vorgehensweise wurden vermutlich auch Varianten erfasst, die keine CBD hatten oder eine CBD mit der für den im Initial-Screening verwendeten Stamm falschen

Serovarspezifität. Denn solche Varianten konnten sich bei gut löslicher Expression über den Beobachtungszeitraum immer mehr anhäufen und dadurch Lysehöfe bilden. An dieser Stelle ist zudem darauf hinzuweisen, dass im Spezifitäts-*Screening* alle Varianten akzeptiert wurden, die auf mindestens 3 der 4 getesteten Listerien Lysehöfe bildeten. Die zugestandene Lücke trat hauptsächlich bei *Listeria innocua* S1147 mit sv 6a auf, einem nicht-pathogenen Listerienstamm. Die Lyse von nicht-pathogenen Listerien ist einerseits wünschenswert, da Listerien im Lebensmittel erst nach Serotypisierung in „pathogen“ und „nicht-pathogen“ klassifiziert werden können und außerdem die Auffindung eines nicht-pathogenen Stammes angesichts seiner häufigen Vergesellschaftung mit dem krankheitsverursachenden Keim *Listeria monocytogenes* weitere Kontrollen nach sich zieht (Krämer, 2007). Trotzdem wäre für eine Anwendung auch ein Enzym geeignet, welches allein gegen *Listeria monocytogenes* gute Effektivität besäße. Würden die Stringenz erhöht und nur Kandidaten weiter verwendet, bei denen auch Lyse von sv 6a zu beobachten ist, würden 17 von 28 Varianten mit serotypischer bzw. ohne CBD und 20 von 129 Varianten mit theoretisch breit bindender CBD aussortiert werden.

Allerdings wurden entsprechende Varianten ohnehin in den folgenden *Screening*-Schritten mit hitzeinaktivierten Zellen in Flüssiglysetests bis auf 3 Kandidaten mit breit bindender CBD (EcoFB1c, EcoFP1, EcoAA3e) und 4 Kandidaten mit serovarspezifischer CBD (EcoGA7, EcoGY10, EcoGB9, EcoGP8) entfernt. Die verbleibenden Kombinationen mit serovarspezifischer CBD lieferten überraschend gute Ergebnisse gegen lebende Listerien, so dass eines davon, nämlich EcoGP8, zur näheren Charakterisierung gereinigt wurde.

Vorkommen der eingesetzten Domänen

Insgesamt wurden in den beiden Genbanken mit 2- und 3-Domänen Proteinen alle eingesetzten Domänen gefunden, jedoch nicht jede Domäne an jeder Position. Für eine repräsentative, statistische Auswertung hätten die Genbanken auf Platten ohne Selektionsdruck plattiert und zufällig ausgewählte Klone sequenziert werden müssen. Für einen möglichst großen Kenntnissgewinn über die aktiven Kandidaten sollten jedoch auf jeden Fall alle positiven Varianten aus dem Spezifitäts-*Screening* sequenziert werden. Auch aus Kostengründen wurden nicht-positive Klone deshalb nur im Rahmen der 2 Domänen Genbank sequenziert und ausgewertet (4.2.1.5). Dies ergab dennoch einen guten Hinweis darauf, dass die Klonierungsstrategie nicht zu einer Häufung bestimmter Domänen an bestimmten Positionen führte.

Unter Einbezug der Proteine mit alleiniger serovarspezifischer CBD wurde bis auf CBD025 jede CBD an jeder Position gefunden. Bei den häufig gefundenen, breit bindenden Zellbindedomänen fiel auf, dass die CBDP40-Varianten kaum am N-Terminus zu finden

waren. Dieses Verhalten war unabhängig von dem Vorhandensein des C-terminalen Linkers, da es auch auf CBDP40nls zutraf. Es scheint, dass die CBDP40-Varianten am N-Terminus zu nicht funktionsfähigen Proteinen führten. Ob dies an fehlender Bindefähigkeit oder negativen strukturellen Einflüssen lag, kann nicht gesagt werden. Ein weiterer Hinweis für die nicht vorhandene oder geringe Aktivität der CBDP40-Varianten am N-Terminus ist, dass im Falle von N-terminaler Positionierung der CBDP40-Varianten in allen drei Fällen eine zweite CBD vorhanden war: zweimal CBD511 (EcoGO5, EcoK8) und einmal CDBP35 (EcoAA3e). Obwohl keine natürlichen Phagen-Endolysine gegen grampositive Bakterien mit N-terminaler CBD und C-terminaler EAD beschrieben sind (Fischetti, 2010), konnte hier kein Unterschied in der Fähigkeit zur Lysehofbildung in den ersten *Screening*-Schritten beobachtet werden. Auch in den späteren *Screening*-Schritten auf gewünschte Eigenschaften waren Kandidaten mit N-terminalen oder mittig gelegenen CBDs und C-terminalen EADs dabei. Selbst das am Ende ausgewählte EcoGU3 weist in der mittigen Position eine CBD auf.

Die 2-Domänen Proteine enthielten bis auf die Autolysin-Domäne MurA-Var2 nur EADs aus Endolysinen. Nicht gefunden wurden EADgp29, Cellosyl, IspC und Sle1.

Die Analyse der 3-Domänen Proteine zeigte, dass in Konstrukten mit nur einer EAD dieselben EADs vertreten waren wie in den *gescreenten* 2-Domänen Proteinen, eine Ausnahme bildete ein Konstrukt mit Cellosyl und zwei CBDs. Alle anderen EADs (Sle1, EADgp29, IspC, MurA) waren nur in Kombination mit einer zweiten EAD zu finden, die auch als alleinige EAD vorkam. Da die einzelnen EADs zuvor als aktiv getestet wurden (4.1.2.3), spricht dieser Aspekt für nicht vorhandene Funktionalität dieser EADs, wenn sie mit einer der CBDs fusioniert wurden.

In den Wildtyp-Endolysinen kommen die verwendeten EADs am N-Terminus vor, somit war die Betrachtung interessant, ob es Häufungen der einzelnen EADs an bestimmten Positionen gab. Zwar wurden einzelne Konstrukte häufiger gefunden als andere, aber das Vorkommen der Endolysin-EADs innerhalb der Konstrukte mit breit bindender CBD zeigte keine eindeutigen Präferenzen für eine der beiden Domänenpositionen und alle Endolysin-EADs außer EADB054 wurden in den 2-Domänen Proteinen sowohl N- als auch C-terminal gefunden. Auffällig war lediglich eine deutliche Häufung der EADP40 an der N-terminalen Position. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass die CBDP40-Varianten hauptsächlich C-terminal gefunden wurden. Hierfür wäre eine Interaktion von EADP40 und CDBP40 im Wildtyp-Endolysin eine Erklärung, was hieße, dass die Domänen nur dann gemeinsam agieren können, wenn sie in einer gerichteten Reihenfolge und Anordnung zueinander auftreten. Die Ursache könnte strukturell bedingt sein, so zeigt beispielsweise die gelöste Struktur des Endolysins Cpl-1 aus einem Streptococcen-Phagen, dass die EAD und

CBD durch hydrophobe Wechselwirkungen und Salzbrücken miteinander in Wechselwirkung stehen, wodurch die Domänen ideal zueinander orientiert werden (Hermoso *et al.*, 2003).

Cellosyl ist homolog zur EADP40, im Gegensatz zur EADP40 ist Cellosyl allerdings schlecht löslich exprimiert, was vermutlich die geringe Häufigkeit des Auftretens beeinflusst hat. Es könnte zudem sein, dass die verwendete Cellosyl-Domäne nicht die vollständige Aktivität besaß, denn zum einen wurde der synthetische Linker angehängt und zum anderen ist in der Struktur eine Disulfidbrücke zu sehen (Rau *et al.*, 2001), so dass Cellosyl unter den gewählten Expressionsbedingungen unter Umständen teilweise nicht korrekt gefaltet war.

Die einzige enzymatisch aktive Domäne, die nicht aus einem Phagen-Endolysin stammt und in 2- und 3-Domänen Proteinen vorkam, war MurA-Var2. MurA-Var2 stammt aus dem Autolysin MurA, somit sind EADs aus Autolysinen für die Erstellung zukünftiger Genbanken grundsätzlich geeignet.

Die anderen verwendeten Autolysin-EADs IspC und Sle1 und die Domäne aus dem Phagenschwanzprotein EADgp29 traten innerhalb der *gescreenten* Proteine nur in Kombination mit anderen EADs in den 3-Domänen Proteinen auf. Alle drei waren statistisch gesehen stark unterrepräsentiert, was vermutlich bei Sle1 durch die schlechte Löslichkeit und bei IspC durch die nicht erkennbare Expression und Löslichkeit (trotz optimierter DNA-Sequenz) beeinflusst wurde. Dies kann nicht für EADgp29 gelten, welche deutlich und sehr gut exprimiert wurde.

Es ist durchaus möglich, dass die derart klonierten Domänen in den Kombinationen nicht funktionsfähig waren. Es gibt allerdings Beispiele für funktionelle Chimären zwischen Endolysinen und Autolysinen, wie die Chimären des Endolysins Cpl-1 mit dem Autolysin LytA (Diaz *et al.*, 1990) oder dem Autolysin LYC (Croux *et al.*, 1993) sowie des Endolysins Cpl-7 mit dem Autolysin LytA (Diaz *et al.*, 1991) zeigten. Zudem wurden aktive Konstrukte aus dem Bakteriozin Lysostaphin mit dem Endolysin B30 (Donovan *et al.*, 2006) und von Endolysinen mit Phagenschwanzproteinen beschrieben (Patent: WO/2007/130655).

Domänenkombinationen

Der Einsatz von serovarspezifischen CBDs sollte zeigen, ob Kombinationen von diesen zu breit lysierenden Proteinen führen. In den 129 3-Domänen Proteinen wurden jedoch nur 2 Konstrukte gefunden, EcoV3 und EcoFR10, die eine Kombination von CBDs mit sich ergänzenden Bindespektren hatten.

EcoFR10 enthielt dabei die von Schmelcher (2007) untersuchte Kombination aus CBD500 und CBDP35, die bis auf wenige Ausnahmen an all jene Listerien band, welche auch von den einzelnen Domänen erkannt wurden. EcoV3 hatte die Kombination aus CBD006 und CBD500 und war theoretisch ebenfalls dazu in der Lage, an fast alle Listerien-Serovare zu binden.

Dass nur zwei Konstrukte mit einer derartigen Doppel-CBD gefunden wurden, die zu einem erweiterten Bindespektrum führt, könnte daran liegen, dass nicht alle Zellbindedomänen in CBD-Kombinationen ihre Funktionalität beibehalten (Schmelcher, 2007). So wurde beispielsweise beschrieben, dass die CBD aus dem Phagen A118 (CBD118 bindet an sv 1/2, 3) durch die Fusion mit CBD500 fast zur Gänze inaktiviert wurde, unabhängig davon, ob zur Verbindung der CBDs der kurze Linker aus PlyPSA oder die komplette Sequenz von GFP (*green fluorescent protein*) verwendet wurde und CBD500 besaß in diesen Kombinationen nur bei C-terminaler Anordnung die vollständige Bindeaktivität.

Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Kombination bestimmter CBDs zu strukturellen Problemen führt, welche eine Zellbindung oder Lyse verhindern.

Die häufigste gefundene Kombination unter den enzymatischen Domänen war EAD500, eine L-Ala-D-Glu-Peptidase, mit EADP40, einem putativen Lysozym. Diese Kombination fand sich auch in EcoGU3, dem letztlich besten der 5 charakterisierten Kandidaten. Die spätere Untersuchung der Proteinstabilitäten zeigte, dass diese Kombination nicht aufgrund struktureller Vorteile häufig auftrat, da sie sich in dieser Hinsicht nicht von den anderen unterschied. Tatsächlich könnte es sich um eine besonders effiziente Kombination von zwei enzymatischen Aktivitäten handeln. Die putative L-Ala-D-Glu-Peptidase EADP35 wurde gegenüber EAD500 deutlich seltener gefunden, dennoch befand sich auch EADP35 in einer der 5 charakterisierten Varianten, nämlich in EcoGQ6.

Eine Übertragung der Hypothese auf die zweite eingesetzte Lysozym-Domäne Cellosyl ist nicht möglich, da diese EAD vermutlich aufgrund der geringen Löslichkeit nur selten vorkam und auch in späteren *Screening*-Schritten nicht selektiert wurde.

Einfluss der N- und C-terminalen Linkerregionen

Für die Klonierungsstrategie mussten die Grenzen jeder Domäne mit einem (gegebenenfalls synthetischen) C-terminalen Linker festgelegt werden. In den Wildtyp-Endolysinen dient der Linker nicht nur der Verbindung der enzymatischen und zellbindenden Domänen, sondern vermutlich auch der benötigten Ausrichtung der hydrolysierenden und bindenden Zentren innerhalb dieser Domänen in einem geeigneten Abstand (Hermoso *et al.*, 2003). In Strukturen kristallisierter Endolysine mit mehreren Domänen finden sich Linker mit unterschiedlichen Längen, so liegen in Cpl-1 10 Aminosäuren zwischen den Domänen (Hermoso *et al.*, 2003), 7 in PlyPSA (Korndörfer *et al.*, 2006) und 13 im gramnegativen Endolysin Φ KZ (Fokine *et al.*, 2008). Es ist anzunehmen, dass sich idealer Abstand und Orientierung für jede individuelle Domänenkombination unterscheiden und daher kein universell geeigneter Linker existiert. Von natürlich N-terminal vorkommenden Domänen wurden die (putativen) Linkersequenzen beibehalten, um gegebenenfalls vorhandene

Interaktionen zwischen Linkern und Domänen nicht zu zerstören. Die Sequenz des synthetischen Linkers umfasste 15 Aminosäuren zuzüglich der Reste für Restriktionschnittstellen und da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass durch den synthetischen Linker alle Domänen optimal zueinander orientiert werden würden, sollte dies durch eine Aminosäurezusammensetzung, die hohe Flexibilität erlauben sollte, ausgeglichen werden.

Die Analyse der Funktionsfähigkeit der einzelnen EADs und CBDs (4.1.2.3, 4.1.2.4) konnte die Aktivität aller EADs sowie von CBD511, CBD500, CBDP35 und CBDB025 bestätigen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Aktivitäten durch die vorgenommenen Verkürzungen hier nicht zerstört wurden und der angefügte C-terminale synthetische Linker die Funktion nicht verhindert.

Im Gegensatz dazu konnte im Zellbindetest bei CBD006 und den 3 verschiedenen CBDP40-Varianten keine Zellbindung nachgewiesen werden (4.1.2.4).

Möglicherweise wirkte in diesen Testungen bei CBD006 der C-terminal angefügte His-tag oder die Immobilisierung am C-Terminus hinderlich, denn Ligation der klonierten CBD006 hinter EADP35, EAD511, EADP40 und EADPSA führte zu funktionsfähigen Enzymen mit den erwarteten Lysespektren (Konstrukte I, P, M, O der Prinzipientestung, 4.1.4.4).

Anders verhielt es sich bei CBDP40, der N-terminal kurzen Variante mit C-terminalem synthetischem Linker. Selbst die Kombination mit der eigenen EADP40 zeigte in der Prinzipientestung keine Aktivität (4.1.4.4). In den späteren Genbanken wurden die N-terminal verlängerten Varianten CBDP40L und CBDP40nls eingesetzt und auch beide als funktional *gescreent*, allerdings nur selten in direkter Kombination mit EADP40 im Gegensatz zu der direkten Kombination der Domänen EAD511 und CBD511 des Wildtyp-Endolysins Ply511, welche sowohl unter den Kandidaten mit 2 als auch vielfach mit 3 Domänen zu finden waren. Es gilt wohl, dass die Funktion der Domänen sterisch durch den duplizierten Sequenzbereich S192-K225 behindert wurde. Anscheinend wurde dadurch eine dritte Domäne zum Erhalt der Aktivität des Gesamtmoleküls nötig, die die fehlende Aktivität einer dieser beiden Domänen ersetzte oder sozusagen als Puffer zwischen EADP40 und den CBDP40-Varianten fungierte.

Der Einfluss des Linkers wurde des weiteren bei der Domäne MurA deutlich. Da der Beginn der Domäne nicht eindeutig war und der Sequenzabschnitt direkt hinter der Signalsequenz zu einem saurem isoelektrischen Punkt (pI) der gesamten Domäne führte, wurden zwei verschiedene Konstrukte erstellt: MurA mit einem theoretischen pI von 5,2 und MurA-Var2 mit einem basischen pI von 9,2, wie er auch bei allen anderen verwendeten EADs und CBDs (zwischen 9 und 10,5) berechnet wurde.

Die N-terminal längere Variante MurA war in den 2-Domänen Proteinen nicht vorhanden und bei Proteinen aus 3 Domänen deutlich unterrepräsentiert. Das Vorkommen von MurA-Var2

entsprach hingegen der statistisch erwarteten Häufigkeit. MurA-Var2 kam in den 3-Domänen Konstrukten an allen Positionen vor. Die unterschiedliche Häufigkeit der beiden Domänen begründet sich nicht in der Löslichkeit, denn beide MurA-Varianten wurden im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Autolysin-Domänen sehr gut löslich exprimiert. Es könnte sein, dass der zusätzliche N-terminale Bereich bei MurA ungünstig für die Proteinfaltung war oder der Gehalt an sauren Aminosäuren in blockierende Wechselwirkung mit den anderen, basischen Domänen trat. Eventuell war auch die Interaktion mit der Zellhülle durch das Kontinuum an negativer Ladung von Teichon- und Lipoteichonsäuren beeinträchtigt. Allerdings gibt es auch gut funktionierende Endolysine mit saurem pI (Cheng *et al.*, 2005).

Schlussfolgerungen

Die Strategie, jede Domäne an jeder Position zuzulassen, bedeutet bei steigender Domänenzahl eine schnelle Zunahme an zu *screenenden* Klonen. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die meisten Domänen, welche in den Konstrukten Aktivität besaßen, in der Lage waren, ihre Funktion an jeder Position im Protein zu erfüllen, auch wenn diese Anordnung in der Natur bisher nicht gefunden wurde.

Folglich kann für zukünftige Genbanken diese Strategie beibehalten werden, da besonders bei neu entdeckten Endolysinen und anderen EADs, die natürlicherweise keine CBD haben, keine Voraussage über die optimale Position getroffen werden kann.

Als wichtiges Kriterium hat sich die Wahl der Linkerregionen herausgestellt. Auch wenn eine vorausgehende Testung der einzelnen Domänen auf Funktionalität und Löslichkeit keine eindeutige Aussage über die Eigenschaften innerhalb der später entstehenden Zufalls-kombinationen zulässt, ist dieser Schritt sinnvoll, um inaktive Domänen auszuschließen und die Zahl der möglichen Kombinationen nicht unnötig zu erhöhen.

Der hier gewählte synthetische Linker stellte sich prinzipiell als geeignet heraus, da er die Funktionalität der einzelnen Domänen und auch der Domänen innerhalb der Kombinationen nicht grundsätzlich verhinderte.

5.1.3 Screening auf gewünschte Eigenschaften

Aufgrund der Verwendung von induziertem *E. coli* Zellaufschluss-Überstand in diesen Testungen waren die eingesetzten Enzymmengen nicht steuerbar und die Analyse der getesteten Überstände mittels SDS-Gelen zur Einschätzung der vorhandenen Proteinnmengen wäre bei der Anzahl an getesteten Varianten zu aufwendig. Aus diesem Grund führte die absolute Aktivität der einzelnen Varianten nicht zum Ausschluss von Kandidaten. Sie führte jedoch bei guten Ergebnissen dazu, dass die betreffenden Kandidaten für spätere *Screening*-Schritte auch dann weiterverwendet wurden, wenn diese nur 10 bzw. 50 mM anstelle von 150 mM EDTA tolerierten. Für spätere Genbanken könnte die Durchführung

solcher Lysetestungen dahingehend verbessert werden, dass mit höherer Wahrscheinlichkeit ähnliche Proteinmengen auch ohne Proteinreinigung und Konzentrationsbestimmung von den verschiedenen Kandidaten im Test vorhanden sind, selbst wenn manche davon schlecht exprimiert werden.

Eine Möglichkeit hierfür wäre, die Konstrukte bei der Ligation in den Vektor mit einem Protein-tag, bestenfalls ein tag, der in vielen Fällen auch zu erhöhter Löslichkeit führt (beispielsweise der JS-tag), zu markieren. Mit Hilfe von Streptavidin beschichteten 96-Well Platten könnten die Proteine in kurzer Zeit aus den induzierten Zellaufschluss-Überständen separiert werden. Da die Bindekapazität der einzelnen Vertiefungen beschränkt ist, sollten bei Aufschluss einer ausreichenden Masse von induzierten *E. coli*-Zellen bei löslicher Proteinexpression vergleichbare Mengen der Kandidaten vorliegen. Durch Elution oder Abtrennen der Proteine über Proteolyse an einer eingeführten Proteaseschnittstelle zwischen tag und Enzymsequenzen könnten die Kandidaten für das *Screening* verwendet werden. Ähnliche Hochdurchsatz-Methoden zur Analyse großer Mengen an Proteinvarianten sind gut etabliert (*Strep*-Well HT Purification System, IBA GmbH, Göttingen).

Screening auf Aktivität bei saurem pH

Unter den 22 Positiven des *Screenings* bei pH 4,5 war nur 1 Protein mit 2 Domänen (K1) und unter den 21 3-Domänen Proteinen waren 13 mit einer Doppel-CBD. Bis auf EcoFR10, befanden sich unter den Doppel-CBDs nur Kombinationen von CBD511, CBDP40-Varianten, CBDP35 und CBD006, welche schon alleine den Teststamm S1095 sv 1/2a binden könnten. Mit Hilfe der Doppel-CBD CBD500-CBD500 wurde gezeigt, dass sich durch zwei Zellbindedomänen die Affinität des Fusionsproduktes zur Zelle durch geringere K_{off} -Werte erhöht, so besaß die duplizierte CBD500 eine um den Faktor 50 höhere Affinität als die CBD500 allein (Schmelcher, 2007). Die Selektion auf zwei bindende Zellbindedomänen spricht also dafür, dass bei niedrigem pH erhöhte Bindeaffinitäten für die Zelllyse günstig sind. Die Bindung der CBDs an die Listerienzellen wird vermutlich durch ionische Wechselwirkungen verursacht (Loessner, 2002), die bei saurem pH in Gegenwart der erhöhten H^+ -Konzentrationen vermutlich beeinflusst und durch zwei CBDs stabilisiert werden.

Gescreente Domänen-Kombinationen mit nur einer CBD enthielten CBD511, CBD006 oder CBDP35, nicht jedoch eine alleinige CBDP40-Variante. Dies ist insofern überraschend, als dass zumindest bei pH 7,4 die von Schmelcher (2007) getestete CBDP40 eine höhere Affinität zeigte als CBD511, doch möglicherweise ergibt sich bei pH 4,5/5 ein anderes Verhältnis der Affinitäten dieser CBDs. Außerdem zeigte das Wildtyp-Endolysin PlyP40, welches ja CBDP40 enthält, durchaus bei saurem pH gute Restaktivität. Das deutet an, dass diese CBD ohne die optimale Fusion an EADP40 für ein Konstrukt ungünstige Eigenschaften besaß.

Zudem wurde durch die Lysetestung bei acidem pH eindeutig auf die Eigenschaften der EADs *gescreent*, denn bis auf 3 Proteine (EcoL4, EcoFR10 und EcoGS17) besaßen alle positiven Kandidaten EADP40 allein oder mit einer weiteren EAD kombiniert. Dieses Ergebnis ließ sich im Rahmen der späteren Charakterisierung der gereinigten Proteine erklären, wo sich herausstellte, dass PlyP40 als einziges der getesteten Wildtyp-Endolysine das Lyseoptimum bei saurem pH hatte (4.3.2.2). Die EADP40 schien diese Eigenschaft auch in Kombination mit anderen Domänen beizubehalten und auf das Gesamtprotein zu übertragen. Die Arbeit von Schmelcher (2007) konnte zeigen, dass bei NHis-PlyP35 maximal 5 % und bei NHis-Ply500 lediglich 10 % Restaktivität bei pH 4,5-5 zu erkennen war. Dies könnte erklären, warum auch Enzyme, die nur EAD500 oder EADP35 als alleinige enzymatische Domänen hatten, nicht in diesem *Screening* gefunden wurden. Sowohl Ply511 als auch Y1 (EAD511-CBD511) waren nicht unter den positiven Kandidaten zu finden, was mit der geringen Restaktivität von Ply511 bei saurem pH ebenfalls übereinstimmt (4.3.2.2).

Es überrascht nicht weiter, dass die Fähigkeit zur Zellwandhydrolyse bei saurem pH grundsätzlich von der enzymatischen Aktivität der EAD bei diesem pH abhängig war. In Orientierung an diesem Ergebnis könnten in zukünftige Genbanken für Chimären zur Anwendung im Lebensmittel vor allem EADs aus Endolysinen mit saurem pH-Optimum eingesetzt werden, falls deren Spezifitäten für den Zielorganismus geeignet sind. Saure pH-Optima wurden beispielsweise für die Endolysine aus den Streptococcen-Phagen Cp-1, B30 und NCTC11261 (Loeffler *et al.*, 2003; Pritchard *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005), PlyV12 gegen *Enterococcus* (Yoong *et al.*, 2004) und Mur gegen *Lactobacillus* (Vasala *et al.*, 1995) beschrieben.

Ebenfalls bedeutend ist die Erkenntnis, dass zwei CBDs in einem Konstrukt die Aktivität bei saurem pH deutlich verbesserten. In dieser Hinsicht hat sich die Strategie, auch mehrere CBDs in der Bank zuzulassen, als positiv herausgestellt.

Screening auf Aktivität in Gegenwart von EDTA

Im *Screening* dieser Arbeit wurde mit weit höheren Konzentrationen von EDTA getestet, als im Lebensmittel vorhanden sind. Dies verhalf zum einen zur stringenteren Selektion, zum anderen reichte so eine einstündige Inkubation mit EDTA aus. Bei längerer Inkubation wären bereits niedrigere EDTA-Mengen ausreichend gewesen, um die Aktivitäten mancher Enzyme zu zerstören, wie während der Reinigung von PlyP825 zu sehen war. Dieses Endolysin war zwar in einem Vortest nach einstündiger Inkubation mit 25 mM EDTA noch zu ca. 70 % aktiv, während der Reinigung in Gegenwart von 10 mM EDTA über mehrere Stunden verlor es jedoch sämtliche Aktivität (4.3.2.4, 4.3.1.3).

Tatsächlich zeigten später alle gereinigten Proteine geringere EDTA-Toleranzen als im *Screening*-Schritt mit EDTA. Dies liegt möglicherweise an Ionen und Enzymen mit ionischen Cofaktoren, die im *E. coli*-Zellaufschluss vorhanden waren, wodurch die komplexierende Wirkung nicht allein gegen die Zellwand-Hydrolasen gerichtet war.

Hinzu kommt, dass, falls die Ansätze für das *Screening* länger, aber dafür mit geringeren EDTA-Konzentrationen, inkubiert werden würden, die Messergebnisse nicht nur durch die Wirkung von EDTA auf die Enzyme beeinflusst würden, sondern auch von den Stabilitäten der jeweiligen Proteine gegen die im Zellaufschluss vorhandenen *E. coli*-Proteasen, von denen wiederum selbst welche durch EDTA inhibiert werden können. Somit wäre der proteolytische Effekt mancher Proteasen in Ansätzen mit geringer EDTA-Konzentration größer als bei hoher EDTA-Konzentration und bei jedem Molekül je nach Protease-Sensitivität unterschiedlich, wodurch die Resultate nur schwer zu interpretieren wären.

Bei der Gruppierung der Kandidaten mit EDTA-Toleranz in Proteine, die in Gegenwart von maximal 150, 50 bzw. 10 mM EDTA aktiv waren, fiel auf, dass diese mit der jeweils vorhandenen EAD korrelierten. So fanden sich unter den 15 Kandidaten mit 150 mM EDTA bis auf EcoFR10 mit Cellosyl nur Kandidaten mit EADP40 alleine oder in Kombination. Bei 50 mM EDTA waren es 23 von 27 Kandidaten. Diese hatten entweder nur EADP40 oder EADP40 in Kombination mit einer weiteren EAD, meist handelte es sich hierbei um EAD500, MurA-Var2 und auch EADP35.

Bei 10 mM EDTA war keine extreme Selektion mehr zu erkennen, außer dass keine Kombinationen mit einer oder zwei EADs mit (putativer) Amidase-Spezifität (EAD511, EADPSA, EADB054, Sle1) gefunden wurden, wobei hiervon 35 im Test waren. Im Fall von EAD511 und dem Wildtyp-Endolysin Ply511 passt dies zum Ergebnis, dass das gereinigte Ply511 durch die Inkubation mit 1 mM EDTA bereits nahezu vollständig inaktiviert wird (4.3.2.4).

Der Sachverhalt, dass bei Kombinationen, die die höchste getestete EDTA-Konzentrationen tolerierten, keine Enzyme mit EADPSA (putative Amidase) und EAD500 (Peptidase) als alleinige EAD zu finden waren, lässt sich damit erklären, dass diese Domänen im aktiven Zentrum ein zweiwertiges Ion (Zn^{2+}) benötigen (Korndörfer *et al.*, 2006 und 2008). Dies ist vermutlich übertragbar auf EADB054 (putative Amidase) mit Sequenzhomologie zu EADPSA, auf EADP35 (putative Peptidase) mit Sequenzhomologie zu EAD500 sowie EAD511 (putative Amidase) mit Homologie zur EAD von PlyL, welches vermutlich ebenfalls ein Zink-Ion im aktiven Zentrum besitzt (Low *et al.*, 2005).

Hohe Konzentrationen des Komplexbildners schienen allerdings nicht nur einen Einfluss auf gefundene EADs zu besitzen, sondern auch auf die CBDs. Denn, wie beim *Screening* bei

niedrigem pH, besaßen viele der Proteine mit Toleranz von 150 mM EDTA zwei CBDs und es wurde bei dieser Bedingung kein einziges 2-Domänen Protein gefunden, allerdings zeigte das Wildtyp-Endolysin PlyP40 hier gute Aktivität, deren CBD eine hohe Bindeaffinität besitzt (Schmelcher, 2007).

Dies sind erneut Hinweise darauf, dass eine höhere Bindeaffinität für die Zelllyse auch in Gegenwart von EDTA von Vorteil ist. Die benötigte höhere Bindeaffinität scheint jedoch erst bei hohen EDTA-Konzentrationen einen Selektionsdruck auszuüben, denn innerhalb der Gruppe mit 10 mM EDTA fanden sich sogar 4 Varianten, die keine CBD hatten. Dieser Umstand scheint gegen die Bedeutung der CBD-Funktion im Flüssiglysetest zu sprechen. Für eine genauere Aussage müssten jedoch die tatsächlichen Mengen der Proteine im Überstand herangezogen werden. Eventuell wurde die fehlende Affinität durch die erhöhte Aktivität von 3 enzymatisch aktiven Domänen ausgeglichen.

Ein möglicher Grund für den beobachteten Selektions-Vorteil durch erhöhte Bindeaffinität bei 150 mM EDTA ist, dass durch EDTA auch die zweiwertigen Ionen an der Zellhülle komplexiert werden, was deren Ladungsverhältnisse und deren räumliche Struktur (vor allem der Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren) beeinflussen würde. Veränderte Ladungsverhältnisse in der Zellhülle könnten damit die Affinitäten der CBDs zu den Bindestellen oder die Zugänglichkeit der Bindestellen herabsetzen.

Die Tatsache, dass die meisten, jedoch nicht alle Proteine, die eine EADP40 enthielten, Aktivität in Gegenwart von EDTA zeigten (49 von 59) und zudem ähnliche Domänenkombinationen Unterschiede bezüglich der maximal tolerierten EDTA-Konzentration aufwiesen, bestätigt, dass nicht allein die Domänenzusammensetzung sondern auch deren Reihenfolge ausschlaggebend waren. Denn dadurch wurden nicht nur die Löslichkeiten der verschiedenen Kandidaten beeinflusst, sondern auch deren Faltung und die Orientierung der einzelnen Domänen zur bakteriellen Zellhülle. Ein besonderes Beispiel sind EcoW1 und EcoFP1. Beide Proteine unterschieden sich nur im Vorhandensein des synthetischen Linkers, das Enzym ohne den Linker zeigte Aktivität in Gegenwart von 150 mM EDTA, das Enzym mit Linker tolerierte nur 10 mM EDTA.

Da sich die anderen Proteine, die sich bis auf den synthetischen Linker an CBDP40 glichen (EcoFQ6/EcoAS11, EcoGW8/EcoFS16, EcoAS7/EcoGE10, EcoFR8/EcoGQ12, EcoGC6/EcoHA4) hinsichtlich der EDTA-Testung identisch verhielten, ist dies jedoch kein überzeugender Hinweis darauf, dass CBDP40nls besser funktionierte als CBDP40L.

Screening auf Fähigkeit zur Inhibition von Listerienwachstum

Ein zentrales Kriterium für den späteren Einsatz als Lebensmittel ist die Fähigkeit, das Wachstum von Listerien zu unterdrücken. Aus diesem Grund wurden die besten Kandidaten der bisherigen Testungen beim folgenden *Screening*-Schritt an diesem Kriterium gemessen.

Da ein Ergebnis der positiven oder negativen Wachstumsinhibition prinzipiell auch allein mit der eingesetzten Proteinmenge korrelieren könnte, musste für die Auswertung die Proteinmenge im Zellaufschluss-Überstand mit in Betracht gezogen werden. Dazu wurden die Mengen an löslichem Protein im Überstand mit 0 bis 4 bewertet, wobei 4 einer vergleichsweise hohen Menge entspricht.

Allerdings war beispielsweise EcoGU3 mit der niedrigen Bewertung von 1 unter den in dieser Testung besten Kandidaten und EcoAS4 mit der Bewertung 4 nicht. Dagegen war bei sehr geringen Anteilen von Zielprotein keine Aktivität im Test zu sehen, wie bei EcoFB1c mit der Bewertung 0-1, wobei wahrscheinlich durch die Domäne IspC die Expression des Proteins herabgesetzt wurde.

Ähnlich gute Ergebnisse wie die Wildtyp-Endolysine zeigten nur vier Kandidaten aus 3 Domänen (EcoGQ6, EcoGU3, EcoGA7 und EcoGP8) mit jeweils EADP40 als einer Domäne. Die Varianten EcoGU3, EcoGQ6 und EcoGA7 besaßen dabei jeweils eine EAD, die vermutlich im Glykanstrang schneidet (EADP40), und eine weitere EAD, die vermutlich eine Bindung im quervernetzenden Peptid hydrolysiert, nämlich EAD500 bzw. EADP35 mit der (putativen) Spezifität einer L-Ala-D-Glu-Peptidase in EcoGU3 und EcoGQ6 sowie EADPSA, eine putative Amidase in EcoGA7. Die gleichzeitige Schwächung der Peptidoglykan-Struktur sowohl im Rückgrat als auch in der Quervernetzung könnte zu mechanisch höherem Stress in der Zellhülle und damit zu einer schneller eintretenden Zelldisruption führen und daher synergistische Effekte der EADs bewirken, obwohl die Abstände und Ausrichtungen der Domänen zueinander in den Kandidaten noch nicht optimal abgestimmt sind. Synergistische Effekte von Zellwand-Hydrolasen wurden beispielsweise beobachtet bei gleichzeitiger Verwendung von dem Lysozym Cpl-1 und der Amidase Pal gegen *S. pneumoniae* (Loeffler und Fischetti, 2003) sowie von LysK und Lysostaphin gegen *S. aureus*. LysK besitzt dabei EADs, die im Stammpeptid hydrolysieren (CHAP und Amidase), und Lysostaphin schneidet in der Interpeptidbrücke (Becker *et al.*, 2008).

Bei der Kombination von EAD118 (L-Ala-D-Glu-Peptidase) und EADPSA (putative Amidase), welche beide eine Bindung im Stammpeptid hydrolysieren, konnte in einem chimären Endolysin gegen *Listeria* hingegen kein Synergismus festgestellt werden (Schmelcher, 2007).

Somit könnten die hier *gescreenten* Moleküle einen Vorteil gehabt haben. Es ist auch interessant, hier erneut darauf hinzuweisen, dass die Kombination von EADP40 und EAD500 bei der Auswertung des Spezifitäts-Screenings am häufigsten vertreten war.

Ein sehr überraschendes Ergebnis war das Auftreten von EcoGA7 und EcoGP8 unter den besten 4 Proteinen, da beide eine bzw. zwei CBDs besaßen, die den Serovar 4b nach Wissensstand nicht binden können (Schmelcher *et al.*, 2010). Dieser Effekt konnte nicht auf äußerst hohe Mengen der betreffenden Kandidaten im verwendeten Zellaufschluss beruhen, denn EcoGP8, EcoGA7 wie auch EcoGB9 hatten diesbezüglich nur die Wertung 2. Sollte diese Proteinmenge bereits zu einem derartigen Überschuss an Endolysin führen, dass auch ohne Zellbindung das Wachstum unterdrückt werden würde, müsste dies in fast allen Ansätzen zu beobachten sein, die Wertungen mit 2, 3 und 4 hatten.

Abgesehen von diesen Enzymen mit serovarspezifischer CBD wären theoretisch alle getesteten Kandidaten dazu in der Lage, beide Stämme zu lysieren. Fehlende Inhibition ist vermutlich auf strukturelle Ursachen oder geringe Aktivitäten der Proteine zurückzuführen.

Der Einfluss der Domänenreihenfolge auf die Proteinaktivität und auch auf die Stabilität wurde beim Vergleich von Kandidaten deutlich, welche dieselben Domänen beinhalteten wie EcoGU3. So bewirkten EcoGP4 und EcoGH1 wesentlich schwächere Wachstumsinhibition und EcoGP4 wurde sogar bereits im Zellaufschluss-Überstand abgebaut. Zudem zeigten beide schon in den vorherigen Flüssiglysetestungen schlechtere Resultate als EcoGU3. Bei näherer Betrachtung der in wirksamen Konstellationen gefundenen Zellbindedomänen war zu erkennen, dass sich dieselbe EAD-Konstellation wie in EcoGU3 zusammen mit CBDP40nls in EcoGM2 befand. Dieses Protein konnte allerdings beide Stämme nur 24 h lang im Wachstum unterdrücken.

Ein weiteres Beispiel stellen EcoGT3 und EcoFS6 dar, die aus denselben Einheiten bestehen. EcoGT3 war hier jedoch trotz Löslichkeitsbewertung von 4 nicht unter den Treffern.

Die einzigen 2-Domänen Proteine die in diesem Test Listerien-Inhibition zeigten, waren K1 und M1. Sie konnten das Wachstum beider Stämme lediglich für 24 Stunden unterdrücken. K1 stellt dabei eine Kombination aus den Wildtyp-Endolysinen PlyP511 und PlyP40 dar. Das im Vergleich zu den Wildtyp-Endolysinen schlechtere Ergebnis der Wachstumsinhibition von K1 liefert demnach erneut einen Hinweis auf die Bedeutsamkeit der optimalen Verknüpfung der Domänen. Da K1 den ersten beiden Domänen von EcoGU3 und EcoGQ6 entspricht, könnte dieses Ergebnis bedeuten, dass die negative Auswirkung der suboptimalen Verknüpfung der Domänen in K1 durch das Vorhandensein einer zweiten EAD in EcoGU3 und EcoGQ6 bezüglich der inhibitorischen Wirkung wieder kompensiert wird.

Um der Beantwortung der Frage näher zu kommen, inwiefern die jeweils zweiten EADs in den effektiven 3-Domänen Proteinen zu den Gesamtaktivitäten beitrugen, sollten neben den

besten Kandidaten EcoGU3 und EcoGQ6 auch die 2-Domänenproteine K1 und M1 näher charakterisiert werden. Dies könnte zudem in späteren Arbeiten über gezielte Inaktivierung einzelner EADs durch Punktmutagenese im aktiven Zentrum analysiert werden.

EcoGP8 wurde als Vertreter der Varianten mit serovarspezifischen CBDs ausgewählt, welche überraschende Ergebnisse im diesem *Screening*-Schritt gezeigt hatten, und außerdem sollte anhand von EcoGP8 das Verhalten eines 3-Domänenproteins mit 2 CBDs untersucht werden.

5.2 Charakterisierung der 5 ausgewählten Kandidaten

5.2.1 Aktivität der gereinigten Proteine in Flüssiglysetests

Zunächst wurden neben den Aktivitäten bei saurem pH und in Anwesenheit von EDTA, auf die das *Screening* ausgelegt war, die spezifische Aktivität bei pH 6 und die Aktivität bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen betrachtet. Alle Parameter spielen eine bedeutende Rolle in der Lebensmittelherstellung und -konservierung.

Das Wildtyp-Endolysin Ply511 war bereits hinsichtlich Aktivität und Stabilität in vorangegangenen Arbeiten untersucht (Pieper, 2005; Schmelcher, 2007), weshalb im Mittelpunkt der folgende Diskussion vor allem die *gescreenten* Domänenkombinationen und die Endolysine PlyP40 und PlyP825 stehen.

Ein Vergleich der Variante M1 (EAD500-CBD511) mit PlyP825 liegt dabei nahe, da diese Proteine hohe Anteile homologer Aminosäuren sowohl in der EAD als auch in der CBD aufweisen. Allerdings ist im Gegensatz zu M1 in PlyP825 der Linker vermutlich bezüglich Länge, Ladung, Beweglichkeit und Torsion evolutiv auf die beiden Domänen abgestimmt. Eine Interpretation der Ergebnisse in Hinsicht auf einen Einfluss der optimalen Domänenverknüpfung ist jedoch nicht möglich, da die enthaltenen Domänen nicht völlig identisch sind und Unterschiede auch auf unterschiedlicher Primärstruktur beruhen können, doch kann auf die Domänen und ihre Eigenschaften an sich Bezug genommen werden.

Wie die Testung des Lysespektrums gezeigt hatte, war das neu entdeckte Enzym PlyP825 dazu in der Lage, sämtliche Listerien zu lysieren. Dies entspricht den Erwartungen an M1, da dessen CBD511 alle Listerien binden kann und auch, weil M1 im Spezifitäts-*Screening* Aktivität auf allen 4 Listerien-Serovaren gezeigt hat. Beide Enzyme verhielten sich bezüglich der pH-Optima und der optimalen Salzkonzentration sehr ähnlich, denn beide besaßen die höchste Aktivität in neutralem bis leicht basischem pH und zwischen 150 bis 250 mM NaCl. Unterschiede zeigten sich darin, dass die ermittelte spezifische Aktivität bei pH 6 von M1 etwas niedriger lag als die von PlyP825 und bezüglich der Toleranz von EDTA. Bereits die Inaktivierung von PlyP825 durch den Einsatz von EDTA während der Reinigung hatte

bewiesen, dass PlyP825 wie EAD500 ein zweiwertiges Ion im aktiven Zentrum besitzt. Im Test tolerierte das gereinigte Protein PlyP825 höhere Konzentrationen an EDTA als M1, was ein Hinweis auf eine festere Bindung des Ions bzw. eine festere Lage im Inneren der Proteinstruktur sein könnte.

Insgesamt korrelieren diese Eigenschaften von M1 mit den Ergebnissen aus dem *Screening* auf gewünschte Eigenschaften, nämlich geringer, jedoch vorhandener EDTA-Toleranz sowie niedrige Restaktivität bei saurem pH von 10 % zum Vergleichswert bei pH 6 mit 50 %.

Die Variante K1 ist eine Chimäre aus der EAD des PlyP40 und der CBD des Ply511, so dass hier der Einfluss der einzelnen Domänen auf bestimmte Eigenschaften des Gesamtproteins abgeleitet werden kann. Dies muss jedoch im Bewusstsein erfolgen, dass in K1 die Domänen möglicherweise nicht optimal verknüpft oder zueinander orientiert sind.

Wie bereits das *Screening* bei saurem pH impliziert hatte, übt die enzymatisch aktive Domäne großen Einfluss auf das pH-Optimum eines Enzyms aus und wie im *Screening* zeigten die beiden Proteine mit EADP40 optimale Aktivität bei pH 4,5-5, wohingegen das Optimum für Ply511 zwischen pH 7,5 bis 8,5 lag, was mit dem bekannten Werten übereinstimmt (Pieper, 2005). Bei der Betrachtung der spezifischen Aktivität dieser drei Proteine bei pH 6 lagen die Werte für K1 zwischen denen für PlyP40 und Ply511, wobei PlyP40 und Ply511 bei pH 6 in etwa 50 % Restaktivität besaßen und K1 lediglich 25 %. Daraus könnte für die Proteine die maximale spezifische Aktivität beim pH-Optimum extrapoliert werden, was ohne Berücksichtigung von weiteren Parametern, wie beispielsweise der optimalen Salzkonzentration, geschieht und ist daher lediglich eine Annäherung. Es ergäben sich für PlyP40 damit Werte von ca. 7 U/μg, für Ply511 ca. 15 U/μg und für K1 ca. 23 U/μg. Für Ply511 stimmt dies mit bekannten Größen überein (Profos AG, heute Hyglos GmbH, Daten nicht veröffentlicht).

Die höhere spezifische Aktivität der Kombination der EADP40 mit CBD511 im Vergleich zu PlyP40 weist auf einen Einfluss der CBD hin. Gemäß Schmelcher (2007) besitzt die CBDP40 eine 20fach höhere Bindeaffinität als CBD511 und es wurde beschrieben, dass bei Konstrukten mit erhöhten Bindeaffinitäten geringere spezifische Aktivitäten vorhanden sind. So besaß ein Fusionsprodukt der EAD500 mit der Doppel-CBD CBD500-CBD500, die eine 50fach höhere Bindeaffinität im Vergleich zu einer einzelnen CBD500 besaß, nur 1/6 der lytischen Aktivität im Vergleich zu EAD500-CBD500 (Schmelcher, 2007). Ähnliches konnte bei einem chimären Enterococcen-Endolysin mit zwei bindenden CBDs beobachtet werden (Bretfeld, 2009). Vermutlich führt auch eine alleinige CBD mit hoher Affinität der Bindung zu einer niedrigeren Gesamtaktivität, was die hier gemachten Beobachtungen bestätigen würde. Die gleiche Ursache könnte erklären, weshalb K1 ein merklich geringeres Optimum der NaCl-Konzentration aufwies als PlyP40, denn die Bindung der CBD an die Zelle beruht

auf ionischen Wechselwirkungen (Loessner *et al.*, 2002), die durch hohe Salzstärke beeinträchtigt werden, so dass bei hohen Affinitäten höhere ionische Stärken toleriert werden, was auch für das Konstrukt EAD500-CBD500-CBD500 beschrieben wurde. In PlyP40 würden sich somit die Salz-Optima der EAD und CBD unterscheiden, was auch für die Domänen der Endolysine Ply118 und Ply500 diskutiert wurde, da das Optimum von NHis-Ply118 und NHis-Ply500 zwischen 200-300 mM NaCl lag und die der korrespondierenden CBDs bei 100 mM (Loessner *et al.*, 2002; Schmelcher, 2007). Die EDTA-Toleranz ist vermutlich hauptsächlich auf die Eigenschaften der EAD zurückzuführen. Hier zeigte K1 zwar zusammen mit EcoGP8 die höchste EDTA-Toleranz von allen Kombinationen, jedoch deutlich geringer als PlyP40. Da in diesen Proteinen dieselbe enzymatische Domäne vorliegt, muss dieser Effekt auf der Verknüpfung und räumlichen Anordnung der Domänen basieren.

Eine Gegenüberstellung von Ply511 mit K1 gibt Aufschluss darüber, dass die untersuchten Aktivitätsparameter hauptsächlich von der enzymatisch aktiven Domäne abhängen, so unterscheiden sich die beiden Proteine in der EAD und auch im pH- und Salz-Optimum, der spezifischen Aktivität sowie der EDTA-Toleranz.

Das 2-Domänen Protein K1 kann wiederum herangezogen werden, um anhand von EcoGU3 (EADP40-CBD511-EAD500) und EcoGQ6 (EADP40-CBD511-EADP35) den Einfluss einer zweiten EAD zu analysieren. Das Optimum dieser 3 Proteine lag bei acidem pH, wodurch sich das Ergebnis des *Screenings* erklären ließ. Allerdings fielen bei EcoGU3 und EcoGQ6 die Kurven zum neutralen pH hin weniger steil ab als bei den Proteinen mit alleiniger EADP40. Dies liegt vermutlich an den Aktivitäten von EAD500 und EADP35, denn Messungen mit den Proteinen NHis-Ply500 und NHis-PlyP35 lassen auch bezüglich der enthaltenen EADs ein Optimum im neutralen oder leicht alkalischen Bereich vermuten (Schmelcher, 2007). NHis-PlyP35 lysierte dabei optimal bei pH 8 und NHis-Ply500 sogar bei pH 9,5. Für EcoGU3 und EcoGQ6 ist das somit ein Hinweis, dass beide EADs in diesen 3-Domänen Proteinen aktiv sind und die Erweiterung des pH-Spektrums durch zwei EADs ermöglicht zudem die Anwendung derartiger 3-Domänen Proteine über einen breiteren pH-Bereich.

Bei Betrachtung der spezifischen Aktivitäten bei pH 6 waren die Werte von EcoGU3 und K1 mit 5,7 U/ μ g gleich, der von EcoGQ6 mit 2,8 U/ μ g lag niedriger. Somit schienen EAD500 und EADP35 zwar vergleichsweise höhere Aktivitäten bei neutralem und basischen pH zu bewirken, absolut gesehen waren diese EADs jedoch anscheinend weniger aktiv und wohl auch störend für das Gesamtprotein. Messungen mit den His-markierten Endolysinen Ply500 und PlyP35 lassen auf ca. 20 % Restaktivität bei pH 6 gegenüber dem basischen Optimum und somit vorhandener, jedoch geringer Aktivität der EADs schließen (Schmelcher, 2007).

Der störende Einfluss der EADP35 und auch der EAD500 verstärkt sich anscheinend bei pH 4,5, da eine grobe Abschätzung der spezifischen Aktivität für EcoGU3 in etwa 6,5 U/ μ g, für EcoGQ6 ca. 3,1 U/ μ g und für K1 23 U/ μ g ergibt. Die Störung könnte auf sterische Inhibition zurückzuführen sein und ist in EcoGQ6 deutlicher ausgeprägt als in EcoGU3. Letzteres könnte auch mit der geringeren katalytischen Aktivität der EADP35 zusammenhängen, denn NHis-Ply500 zeigte bei pH 8 unter optimierten Bedingungen (NHis-Ply500: 150 mM NaCl; NHis-PlyP35: 300 mM NaCl) eine spezifische Aktivität von ca. 25 U/ μ g und NHis-PlyP35 von ca. 2,0 U/ μ g.

Ein weiterer unterschiedlicher Einfluss der EAD500 und EADP35 machte sich bei der Inkubation mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen bemerkbar, so dass EcoGQ6 etwas höhere Restaktivität in Gegenwart von EDTA zeigte als EcoGU3.

Bei einem Vergleich der Restaktivitäten von K1, welches auch bei 100 mM EDTA noch volle Aktivität zeigte, wird ebenfalls deutlich, dass die C-terminale EAD einen Einfluss auf das gesamte Protein ausübt. Hier fällt auf, dass im Gegensatz zu dieser Testung die Resultate im *Screening* auf Aktivität in Gegenwart von EDTA von EcoGQ6 mit K1 vergleichbar waren. Möglicherweise war beim *Screening* von EcoGQ6 mehr Protein vorhanden oder aber die gemessene Aktivität stammte von löslich exprimierten Abbaubanden im Zellaufschluss, die K1 entsprachen und damit ebensolche EDTA-Resistenz zeigten, wodurch das *Screening*-Resultat verfälscht wurde.

Im Vergleich zu K1 besaßen diese beiden 3-Domänen Proteine höhere NaCl-Optima, was womöglich mit den höheren Optima der EAD500 und EADP35 zusammenhängt, die bei den His-markierten Wildtyp-Endolysinen Ply500 und PlyP35 bei ca. 300 mM NaCl zu liegen scheinen (Schmelcher, 2007).

Eine interessante Variante stellt EcoGP8 (CBD006-EADP40-CBDP35) mit zwei CBDs und EADP40 dar. Wie in allen untersuchten Proteinen korrelierte auch in EcoGP8 das pH-Optimum bei saurem pH mit der Eigenschaft der EADP40, wodurch sich auch das Ergebnis des *Screenings* bestätigte. Die Auswirkung von zwei bindenden CBDs zeigte sich hingegen bei den Ergebnissen der spezifischen Aktivität und bei verschiedenen Salz-Konzentrationen. Dabei stimmen von EcoGP8 sowohl die Ergebnisse der spezifischen Aktivität bei pH 6 als auch die Abschätzung der Restaktivität bei pH 6 im Vergleich zum pH-Optimum bei pH 4,5-5 mit den Werten von PlyP40 fast überein und wie bereits für PlyP40 diskutiert wurde, kann die geringe spezifische Aktivität durch die erhöhte Bindeaffinität durch zwei CBDs erklärt werden. Eine Gegenüberstellung der Bindeaffinitäten dieser CBDs zeigt, dass für die CBDP40 eine 20fach höhere Binde-Affinität im Vergleich zu CBD511, für CBD006 ein zehntel der Affinität von CBD511 und für CBDP35 das 10fache im Vergleich zu CBD511 gemessen wurde (Schmelcher, 2007). Die Affinitäten steigern sich vermutlich durch die

Kombination von CBD006 und CBDP35 nicht rein additiv, wie das Beispiel von CBD500 mit einer 3fach höheren Affinität als CBD511 und der Duplikation von CBD500 mit einer 150fach höhere Affinität als CBD511 deutlich macht (Schmelcher, 2007). Ein Vergleich der EADP40 mit alleiniger CBD006 oder CBDP35 wäre hierbei interessant. Die tatsächliche Affinität von CBD006 in Kombination mit CBDP35 an den verwendeten Teststamm S1095 sv 1/2a liegt jedoch vermutlich höher als die von CBDP40, da das Optimum der Salz-Konzentration von EcoGP8 bei 250 mM höher als das von PlyP40 bei 150 mM war.

5.2.2 Testung mit lebenden Zellen

Im Anschluss an die Analyse der Aktivität im Hinblick auf verschiedene physikalische Parameter wurde die Wirksamkeit der gereinigten Proteine auf lebenden Zellen getestet. Hierzu wurden die minimale inhibitorische Konzentration, die minimale bakterizide Konzentration sowie die bakterizide Wirkung in Milch bestimmt.

Sowohl in der Bestimmung der MIC als auch der MBC trat das Phänomen auf, dass bei den meisten Enzymen höhere Konzentrationen geringere Effektivitäten besaßen als niedrigere Konzentrationen. Dieser Effekt war bei PlyP40, PlyP825, M1, K1, EcoGQ6 und auch bei EcoGP8 zu beobachten. Dieses Phänomen war somit unabhängig von der Anzahl und der Art der jeweilig enthaltenen Domänen und auch unabhängig von pH- und NaCl-Optima sowie den spezifischen Aktivitäten.

Möglicherweise würde dieses Phänomen bei jedem Protein ab einer bestimmten Konzentration auftreten und von Ply511 und EcoGU3 wurden nicht ausreichend hohe Mengen getestet. Ein möglicher Hinweis dafür ist, dass bei Ply511 bei 20 µg/ml bei der Testung von S1095 sv 1/2a und S776 sv 4b etwas weniger Zellen zerstört wurden als bei 4 µg/ml.

Interessanterweise wurde ein ähnlicher Effekt bei β -Lactam-Antibiotika beschrieben, die die Synthese der bakteriellen Zellwand inhibieren, und welcher nach der Erstbeschreibung von Eagle und Musselman (1948) als das „Eagle Phänomen“ bezeichnet wurde. Demgemäß korreliert bei β -Lactam-Antibiotika die Abtötung der Bakterien mit der Antibiotika-Konzentration, so dass beispielsweise Penicillin bei geringen Konzentrationen zunächst nur bakteriostatisch wirken kann und erst bei höheren Konzentrationen eine bakterizide Wirkung einsetzt, welche mit steigender Konzentration ebenfalls zunimmt. Ab einer bestimmten Konzentration ist die maximale Abtötung erreicht und bleibt bei den meisten getesteten Bakterien-Stämmen auch bei höheren Antibiotika-Dosen unverändert. Allerdings kommt es bei manchen Stämmen einiger Bakterien-Arten, wie beispielsweise auch bei *Staphylococcus aureus*, zu dem Phänomen, dass bei gesteigerten Konzentrationen der abtötende Effekt wieder abnimmt und mehr Bakterienzellen überleben. Es wurden verschiedene mögliche

Erklärungen für das „Eagle Phänomen“ diskutiert, wie beispielsweise phänotypische Effekte in Abhängigkeit des Zellwachstums oder die Inhibition von Penicillin-Bindeproteinen und Autolysinen, doch ist die eigentliche Ursache bis heute unklar (French, 2006).

Bei den Zellwand-Hydrolasen könnte ein anderer Mechanismus verantwortlich sein, nämlich der, dass ab einer gewissen Konzentration zu viele CBDs an die Zellen binden und sich dadurch die Proteine gegenseitig bei der Hydrolyse der Zellwand inhibieren.

In der MBC-Testung blieben somit Zellen während der einen Stunde der Inkubation im Puffer erhalten und konnten nach Plattierung zu Kolonien heranwachsen, in der MIC-Testung dauerte die Inkubation zwar 24 h, doch die Enzyme wurden vermutlich nach einiger Zeit von Proteasen aus lysierten *Listerien* abgebaut, wodurch manche Zellen überleben und hochwachsen konnten.

Das Vorhandensein von zwei verschiedenen enzymatischen Spezifitäten könnte dabei zu einem Vorteil führen, denn in EcoGQ6 war in der MBC-Testung diese konzentrationsabhängige Hemmung geringer ausgeprägt als in den betroffenen Proteinen mit nur einer EAD und in EcoGU3 ist sie überhaupt nicht sichtbar. Dieser Unterschied von EcoGU3 und EcoGQ6 ergibt sich möglicherweise daraus, dass, wie bereits diskutiert, EAD500 in EcoGU3 eine höhere Aktivität zu besitzen scheint als EADP35 in EcoGQ6 oder EADP35 einen größeren störenden Einfluss ausübt.

Sowohl die MIC-Werte als auch die erreichten Zellzahlreduktionen in der MBC-Testung zeigten Abhängigkeit von den jeweilig verwendeten *Listerien*stämmen, eine auffällige Korrelation der MBC-Werte zu bestimmten Stämmen wurde jedoch nicht beobachtet. Die stammabhängige Zellzahlreduktion war dabei auch aus frischen *Listerien*-Kulturen reproduzierbar und hängt daher nicht mit einer zufälligen, einmaligen Kulturbedingung am Versuchstag zusammen (nicht dargestellt). Eine mögliche Ursache für die stammabhängigen Ergebnisse könnte darin liegen, dass beispielsweise bei verschiedenen Stämmen die Bindestellen der CBDs in unterschiedlicher Anzahl vorhanden sind oder diese unterschiedlich zugänglich sind. So wurde für die CBD eines Autolysins von *Lactococcus lactis* gezeigt, dass diese nur an den Zellpolen am Peptidoglykan binden kann, da an der restlichen Zelloberfläche Komponenten der Zellhülle, möglicherweise Lipoteichonsäuren, die Bindung verhindern (Steen *et al.*, 2003). Ähnliches könnte auch für CBD006, CBDP40 und CBD511 gelten, da diese beiden Domänen ebenfalls an den Zellpolen und -septen binden, wohingegen CBDP35 über die gesamte Zelloberfläche verteilt bindet (Schmelcher, 2007) und die Verteilung der CBD-Rezeptoren könnte unter den Stämmen leicht variieren.

Bei den meisten Proteinen wurden für die Inhibition von S1147 sv 6a die höchsten MIC-Werte verzeichnet, wohingegen bei der Bestimmung der MBC zu beobachten war, dass vor allem von S1135 sv 3a weniger Zellen abgetötet wurden. Hier liegt möglicherweise ein

zusätzlicher Effekt der umgebenden Matrix zu Grunde, denn die Testung der MIC erfolgte in TB-Medium und die MBC wurde in Niedrigsalzpuffer ermittelt. So wurde zum Beispiel in der Literatur beschrieben, dass die räumliche Anordnung der Teichonsäuren stark von der Salzkonzentration abhängt (Neuhaus und Baddiley, 2003). Diese unterschied sich allerdings vom verwendeten TB-Medium mit 85,6 mM NaCl zum MBC-Puffer mit 50 mM NaCl nur geringfügig. Jedoch könnte auch der Zusatz von 0,1 % Tween 20 im MBC-Puffer die Zugänglichkeit der Bindestellen verändert haben.

Diesbezüglich ist zu erwähnen, dass eine Begründung der unterschiedlichen Zellzahlreduktion nicht allein durch die ungleiche Zugänglichkeit der CBD-Bindestellen gegeben werden kann, denn alle Enzyme außer EcoGP8, PlyP825 und PlyP40 besaßen die CBD511. Besonders auffällig war die geringere Zellreduktion von S1135 sv 3a bei Ply511, PlyP40 und M1 und in diesen drei Proteinen finden sich zwei verschiedene Zellbindedomänen verbunden mit unterschiedlichen enzymatisch aktiven Domänen und damit verbundene Spezifitäten. Besonders bei der Gegenüberstellung von PlyP825 mit M1 fällt auf, dass es nicht allein durch die Bindestellen und lysierten Bindungen im Peptidoglykan erklärt werden kann, warum ein Enzym manche Stämme weniger gut lysierte. Die Ursache kann auch nicht in evolutiv optimierter Orientierung und Verbindung der Domänen liegen, denn beim Wildtyp-Endolysin Ply511 war die mögliche Zellzahlreduktion stark abhängig vom verwendeten Teststamm, bei den zwei *gescreenten* Domänenkombinationen EcoGU3 und EcoGP8 hingegen nicht. Demzufolge kann dieser Effekt zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht hinreichend erklärt werden.

Minimale inhibitorische Konzentration

Im Vergleich zum *Screening*-Schritt mit Testung auf Wachstumsinhibition waren bei der Verwendung von gereinigtem Protein in der Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration sowohl bei M1 als auch bei EcoGQ6 deutlich schlechtere Ergebnisse zu verzeichnen. Im *Screening* konnte EcoGQ6 (EADP40-CBD511-EADP35) sowohl *Listeria monocytogenes* S1095 sv 1/2a als auch S776 sv 4b 72 h lang im Wachstum unterdrücken und M1 (EAD500-CBD511) inhibierte beide Stämme 24 h lang. Beide Kandidaten zeigten bei der Bestimmung der MIC überhaupt keine Wirkung. Dies kann nicht auf zu geringe Proteinmengen zurückgeführt werden, da von beiden Proteinen im Ansatz mit der höchsten Konzentration 62,5 µg/ml verwendet wurde, und diese Menge mit dem verwendeten Volumen des Zellaufschlusses im *Screening* vermutlich nicht erreicht wurde.

Da die Kombination aus EADP40 und CBD511 sowohl in K1 als auch in EcoGU3 zusammen mit der EAD500 in der MIC-Testung sehr gut funktionierte, muss bei EcoGQ6 ein negativer struktureller Einfluss der EADP35 eine Rolle spielen. Dies wurde, wie bereits diskutiert, auch

bei Betrachtung der spezifischen Aktivität beobachtet. Wäre nämlich die EADP35 lediglich nicht-funktional, würde man eine vergleichbare Aktivität zu K1 erwarten.

Im *Screening* wurde induzierter *E. coli* Aufschluss-Überstand verwendet, weshalb es sehr wahrscheinlich ist, dass bereits während der Expression von EcoGQ6 lösliche und aktive Abbaufragmente von EcoGQ6 entstanden sind, wie es auch bei der Proteinreinigung beobachtet wurde. Diese könnten je nach Abbau Aktivitäten wie K1 und/oder T1 (CBD511-EAD500) besessen haben und zusammen mit dem vorhandenen Volllängenprotein EcoGQ6 synergistisch gewirkt und die Listerien lysiert haben.

Die Domänen-Zusammensetzung von M1 ist der des Wildtyp-Endolysins PlyP825 ähnlich (EADs: 75 % identische bzw. 86 % homologe Reste, CBDs: 62 % identische bzw. 73 % homologe Reste). M1 zeigte jedoch schon bezüglich der spezifischen Aktivität und der EDTA-Toleranz schlechtere Resultate als PlyP825, die auf unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung oder auf nicht optimaler Wechselwirkung der Domänen beruhen könnten. Die Wirkungslosigkeit von M1 in der MIC-Testung hatte vermutlich noch eine weitere Ursache, denn der Verdau mit Trypsin hatte gezeigt, dass M1 anders als PlyP825 proteolytisch äußerst instabil war. So könnte es sein, dass dieses Protein durch freigesetzte Proteasen lysierter Listerien-Zellen abgebaut wurde. In der Testung mit Zellaufschluss-Überständen hingegen wäre M1 durch die Anwesenheit zahlreicher Proteine aus dem *E. coli* Aufschluss vor Proteolyse geschützt und durch die Verwendung des proteasedefizienten *E. coli*-Stammes NEB Express IQ wurden weniger Proteasen aus *E. coli* durch den Zellaufschluss eingebracht.

Da proteolytischer Abbau generell ein Problem darstellt, wäre, wie oben diskutiert, die Hochdurchsatz-Reinigung über beschichtete Platten eine Möglichkeit, schon im *Screening* sauberes Protein einzusetzen bzw. Abbau zu dokumentieren.

EcoGP8, die gereinigte Variante mit den beiden serovarspezifisch bindenden CBDs, zeigte im *Screening* auf Inhibition von Listerienwachstum überraschenderweise Aktivität auf dem Listerienstamm S776 mit Serovar 4b. Im Gegensatz dazu besaß das gereinigte Protein in der MIC-Testung, wie zu erwarten, nur die Fähigkeit zur Inhibition derjenigen Serovare, an welche die Zellbindedomänen CBD006 und CBDP35 binden können. In diesem Fall waren dies Serovar 1/2a und 3a, hingegen konnte bei sv 4b und 6a keine Wirkung beobachtet werden.

Die Ursache für das Ergebnis im *Screening* ist nicht klar, allerdings wurde auch für Ply118, ein Listerien-Endolysin, dessen CBD an die Serovare 1, 2 und 3 bindet, beschrieben, dass in photometrischen Lysetestungen die Lyse an Serovar 4b beobachtet wurde und als Begründung dafür wurde die alleinige Aktivität der EAD118 diskutiert (Schmelcher, 2007). In dieser Arbeit kann dies nicht zutreffen, da sonst alle Proteine mit den EADs EADP40 und

EADPSA, die beispielsweise in EcoGA7 und EcoGP8 vorhanden sind, Inhibition hätten zeigen müssen.

Es fällt zusätzlich auf, dass von EcoGP8 auch bei den Stämmen 1/2a und 3a, die von den Zellbindedomänen CBD006 und CBDP35 gebunden werden, weitaus höhere Konzentrationen zur Inhibition benötigt wurden als von PlyP825, EcoGU3, PlyP40, K1 und Ply511. Dies könnte in der höheren Bindeaffinität zu den Zellen begründet sein, so dass sich das Protein auch von bereits getöteten Zellen schlechter ablöste, um das Peptidoglykan noch lebender Zellen zu lysieren.

Minimale bakterizide Konzentration und Wirkung in Milch

Die minimalen bakteriziden Konzentrationen der gereinigten Proteine wurden in Puffer bestimmt und anschließend die bakterizide Wirkung in pasteurisierter, homogenisierter Milch mit 1,5 % Fett getestet.

Der Vergleich der Resultate der MBC-Bestimmung in Puffer bei pH 6 und 50 mM NaCl von M1 und PlyP825, deren Domänen jeweils hohe Anteile homologer Aminosäuren aufwiesen, zeigte, dass M1 von S1135 sv 3a und von S1147 sv 6a lediglich geringere Zellzahlen reduzieren konnte als PlyP825. Möglicherweise lag die Ursache der unterschiedlichen Effektivitäten von M1 und PlyP825 darin, dass M1 wesentlich geringere proteolytische Stabilität besaß als PlyP825 und daher anders als PlyP825 durch die aus den Listerien-Zellen freigesetzten Proteasen während der Inkubation bei 30°C abgebaut wurde. Dies könnte experimentell nachgewiesen werden, indem M1 mit über Ultraschall aufgeschlossenen Listerien-Zellen inkubiert wird und in einer zeitlichen Reihe Proben mittels SDS-Gelen auf Abbau von M1 analysiert werden.

Bei den 3-Domänen Proteinen mit zwei EADs fiel auf, dass zwischen den Zellzahlreduktionen von EcoGQ6 und EcoGU3 große Unterschiede bestanden. EcoGQ6 lysierte maximal 1,5-4 log Zellen und EcoGU3 konnte bei jedem Teststamm alle 10^5 Zellen abtöten. Die hier vorhandene Differenz ist wahrscheinlich auf die vermutete geringere Aktivität sowie den diskutierten, intensiver störenden Effekt von EADP35 als von EAD500 zurückzuführen. Insgesamt zeigt sich in dieser Testung, dass durch die zweite EAD in EcoGU3 im Vergleich zu K1 ein großer Gewinn der bakteriziden Wirkung erzielt wurde, auf EcoGQ6 ist dies allerdings nicht übertragbar.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei den 3-Domänen Proteinen ist, dass auch EcoGP8 mit den serovarspezifischen Zellbindedomänen CBD006 und CBDP35, die nur an die beiden Teststämme mit sv 1/2a und 3a binden können, bei allen verwendeten Listerien mindestens 4 log Zellen lysierte, also auch von Listerien mit sv 4b und 6a. Damit wiederholte sich das

Ergebnis des *Screening*-Schrittes der Wachstumsinhibition, welches wiederum in der Bestimmung der MIC nicht bestätigt werden konnte.

Dieser Umstand macht zwar einerseits klar, dass das Ergebnis des *Screening*-Schrittes nicht durch einen Durchführungsfehler verursacht wurde, da sich bei der MBC-Testung dasselbe Resultat zeigte. Andererseits konnte die gemeinsame Ursache für diesen Effekt, die es sowohl im *Screening*-Test als auch in der Bestimmung der MBC, jedoch nicht in der Bestimmung der MIC geben sollte, zum momentanen Zeitpunkt nicht identifiziert werden.

Bei der Testung der bakteriziden Wirkung in Milch mit 1,5 % Fett waren die in Puffer ermittelten MBC-Werte für eine Zellzahlreduktion nicht ausreichend, was sehr wahrscheinlich auf die Komplexität der Matrix der Milch zurückzuführen ist. Die Tatsache, dass zumindest bei einer höheren Konzentration von 20 µg/ml mit den Wildtyp-Endolysinen in Milch mindestens die selben Zellzahl-Reduktionen wie in Puffer erfolgten, weist jedoch darauf hin, dass die Zelllyse von Listerien durch Destabilisierung des Peptidoglykans in Milch prinzipiell funktioniert und die Zellen nicht osmotisch stabilisiert werden.

Auch für andere Endolysine wurde beschrieben, dass die in Puffer bestimmte bakterizide Konzentration für eine Anwendung in Milch nicht ausreichend war. Die Versuchsdurchführungen waren dabei je nach Publikation leicht unterschiedlich, die Gesamtaussagen können jedoch durchaus übertragen werden. So konnten zwar in Puffer mit physiologischem Salzgehalt von *Clostridium tyrobutyricum* 4 Zehnerpotenzen mit 333 µg/ml mit dem Endolysin Ctp1I abgetötet werden, bei der Durchführung in gelöstem Milchpulver wurden mit der selben Konzentration jedoch nur 0,5 log lysiert (Mayer *et al.*, 2010). Das Endolysin Ply700 zeigte mit 50 µg/ml im Gegensatz zur Lyse im Puffer in Kuhmilch ebenfalls nur 0,3 Zehnerpotenzen Reduktion von *Streptococcus uberis* (Celia *et al.*, 2007). Ob in diesen Beispielen mit höheren Konzentrationen Zellreduktion in Milch erreichbar wäre, ist aus den Daten nicht ableitbar, allerdings liegen diese Beispiele bereits über den in der Milch benötigten Konzentrationen von Ply511, PlyP40 und PlyP825.

Als Ursache für die Inaktivierung von Ply700 in Milch wurde ein Einfluss der zweiwertigen Ionen diskutiert, denn in Vortests hatte Ply700 von Ca^{2+} abhängige Lyseaktivität gezeigt mit einem Optimum bei 10 mM CaCl_2 . In Milch liegen insgesamt ca. 30 mM Calcium-Ionen in Form von Calciumcitrat, Calciumphosphat und an Kasein gebunden vor, sind jedoch möglicherweise für Ply700 nicht in genügend hohen Mengen zugänglich, oder aber das Enzym wird dadurch bereits wieder inhibiert (Celia *et al.*, 2007). Für eine Neutralisierung von basischen Enzymen, wie den in dieser Arbeit verwendeten Zellwand-Hydrolasen, würden ionische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Milch-Bestandteilen wie Kasein oder Sialoglykokonjugaten in Frage kommen (Chockalingam *et al.*, 2007).

Es wurden in Milch durchaus auch erfolgreiche Zellreduktionen durch Zellwand-Hydrolasen beschrieben, allerdings liegen hier keine unmittelbaren Vergleichswerte der MBC in Puffer vor. Beispielsweise konnten mit dem Endolysin LysH5 bei Verwendung von 10^6 cfu/ml alle Zellen von *Staphylococcus aureus* mit 88 µg/ml lysiert werden, bei Einsatz von 10^3 cfu/ml waren geringere Proteinmengen von 25 µg/ml nötig (Obeso *et al.*, 2008). Deutlich geringere Konzentrationen wurden hingegen von Lysostaphin, dem Bakteriozin gegen *Staphylococcus aureus*, mit 0,25 bis 2,0 µg/ml benötigt, die alle eingesetzten 10^4 Zellen abtöteten (Oldham, 1991).

Interessanterweise hatten im Gegensatz zu den Wildtyp-Endolysinen die Domänenkombinationen M1, K1, EcoGQ6, EcoGU3 und EcoGP8 in Milch auch mit 20 µg/ml nur sehr geringe Wirkung. Somit trat bei den *gescreenten* Proteinen nicht nur eine Verschiebung der Wirkkonzentration, sondern eine zusätzliche Inhibition auf, die möglicherweise die jeweiligen enthaltenen Domänen betreffen könnte. Die gezeigte Wirkung der Wildtyp-Endolysine gegen *Listeria* in Milch wies darauf hin, dass zumindest EAD511, CBD511 und EADP40, welche in den *gescreenten* Domänen-Kombinationen vorhanden waren, von den in der Milch enthaltenen Komponenten nicht inhibiert wurden. Das einzige *gescreente* Protein, welches nur diese Domänen beinhaltet, war K1 mit EADP40-CBD511. Hier ist jedoch ein konkreter Vergleich der erhaltenen Zellreduktionen in Puffer und in Milch schwierig, da bei K1 in der MBC in Puffer der zum „Eagle Phänomen“ vergleichbare Effekt auftrat. Daher entsprach die Zellzahlreduktion mit 20 µg/ml K1 genau der in Milch gemessenen Reduktion. Allerdings ist in Milch vermutlich nicht nur die minimale bakterizide Konzentration zu höheren Werten hin verschoben, sondern auch die Konzentrationen, bei denen der „Eagle Effekt“ in Erscheinung trat, wie die Beispiele von PlyP40 und PlyP825 zeigten, die im Puffer bei 20 µg/ml geringe bis fast gar keine Wirkung hatten. Zur Bestätigung dieser Vermutung sollten zukünftig zusätzlich Konzentrationen zwischen 0,8 und 20 µg/ml und auch mehr als 20 µg/ml von K1 in Milch getestet werden.

Mindestens von K1 wäre demnach allein aufgrund der kombinierten Domänen in Milch eine Wirkung wie in Puffer möglich. Besonders auffällig war die Differenz zwischen den Aktivitäten in Puffer und in Milch bei EcoGU3, zumal bei diesem Protein zuvor keine konzentrationsabhängige Hemmung beobachtet wurde. Um jedoch die selbe Aussage für EcoGU3 und auch EcoGQ6 sowie EcoGP8 treffen zu können, müssten die Wildtyp-Proteine Ply500, PlyP35 und Ply006 in Milch und in Puffer getestet werden.

Es ist jedoch auffällig, dass EcoGU3 aus EADP40-CBD511-EAD500 in Milch dieselbe Wirkung besaß wie K1 (EADP40-CBD511) und EcoGQ6 mit EADP35 statt EAD500 fast keine Zellreduktion erreichte. Dies bedeutet, dass durch die EAD an der dritten Position kein Funktionsgewinn erzielt wurde, sondern zumindest bei EcoGQ6 vielmehr starke

inhibitorische Wirkung damit verbunden war, was möglicherweise durch eine Interaktion mit der Milch-Matrix verstärkt bzw. verursacht wurde.

Interessant ist hierzu auch der Vergleich der Ergebnisse von M1 mit PlyP825, denn beide Proteine besaßen Domänen mit hohen Anteilen homologer Aminosäuren und zeigten in Puffer gegen den in der Milch verwendeten Teststamm dieselbe MBC und Zellzahlreduktion. Diese Gegenüberstellung legt nahe, dass die Ursache für die geringen Wirkungen der *gescreenten* Proteine nicht in den Domänen selbst, sondern in der Verbindung der Domänen lag. So befanden sich zwischen den Domänen geladene Aminosäurereste, die möglicherweise nicht mit den Domänen, sondern mit Bestandteilen der umgebenden Matrix in Wechselwirkung traten. Die Linkersequenzen wurden anhand ihrer Eigenschaft vorhergesagt und dahingehend ausgewählt, dass sie geladene Reste wie Lysin enthielten und auch der synthetische Linker wurde mit drei Lysinen entworfen, die beispielsweise mit dem negativ geladenen Bestandteilen der Milch interagieren und somit neutralisiert werden könnten. Die Assoziation von Milchkomponenten an der Linkerregion könnte auch dazu führen, dass die Beweglichkeit des Linkers herabgesetzt war und damit die Domänen nicht mehr derart rotieren konnten, dass für beide Domänen die Binde- bzw. Lysestellen im Peptidoglykan zugänglich waren. In den Wildtyp-Endolysinen hingegen war die Orientierung und damit das Zusammenwirken der Domänen vermutlich durch ionische Wechselwirkungen von den Domänen zueinander und zum Linker stabilisiert, so dass diese Proteine bei der eingesetzten Konzentration auch in Milch funktionierten.

Zunächst sollte daher die Komponente der Milch identifiziert werden, die auf die chimären Proteine inhibierend wirkte. So wäre es eine Möglichkeit, die Lyseaktivität in Gegenwart von verschiedenen Calcium- und auch Magnesium-Konzentrationen, Kasein oder, da dieses sehr schlecht löslich ist, Kaseinhydrolysat, Sialoglykokonjugaten, Laktose und Molke zu bestimmen. Um eine Aussage über das MilCHFett treffen zu können, wäre die Verwendung von Milch mit 0,1 % Fett eine Option.

Im Anschluss an die Eingrenzung der störenden Substanzen könnte diese dann verwendet werden um nach verbesserten Molekülen zu *screenen*. Der Optimierungsansatz könnte mit der Variation der Längen und Aminosäuren der Linker in den Konstrukten beginnen. Dadurch würden zum einen die Domänen bestmöglich aufeinander abgestimmt und zum anderen ungünstige Ladungen und Längen der Linker entfernt.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Klonierungsmethode entwickelt, um Domänen aus Zellwand-Hydrolasen zufällig miteinander zu kombinieren. Über angeschlossene *Screening-*

Schritte werden die erstellten Varianten je nach gewählten Bedingungen eingegrenzt. Diese Strategie ist schneller und zielführender als die bisherige Vorgehensweise des rationalen Ansatzes und soll nun auf weitere Zielorganismen übertragen werden. Für diese Genbanken ist zwar eine Analyse der Eigenschaften der eingesetzten Domänen sinnvoll, um die Größe der Genbank und den damit verbundenen *Screening*-Aufwand nicht unnötig zu erhöhen. Es können jedoch auch uncharakterisierte und möglicherweise inaktive Domänen eingesetzt werden, da unproduktive Konstrukte über das *Screening* entfernt werden.

Die entworfene Klonierungsmethode ist konkurrenzfähig zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren, ein großer Vorteil liegt außerdem in der vereinfachten Probenvorbereitung zur Erstellung positionsspezifischer DNA-Fragmente. In zukünftigen Arbeiten soll die Effizienz der Klonierung der generierten Konstrukte in den Expressionsvektor und damit die Transformationsrate optimiert werden, möglicherweise ist dies bereits durch die Wahl anderer Restriktionsschnittstellen an den Termini erreichbar. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit liegt in der Verwendung eines Expressionsvektors, mit dem Klone, die lediglich ungeschnittenen Vektor enthalten, einfach identifiziert werden können, beispielsweise durch Blaufärbung der Kolonie aufgrund von β -Galaktosidase-Aktivität.

Die verwendeten *Screening*-Schritte dieser Arbeit zielten auf die Anwendung im Lebensmittel ab, weshalb acider pH und die Gegenwart von EDTA einbezogen wurden. Diese Parameter können in zukünftigen Genbanken je nach gewünschten Eigenschaften und Anwendungen modifiziert werden, beispielsweise auf Proteasestabilität, hohe Salzkonzentrationen, verschiedene Anwendungstemperaturen oder auch viskose Matrices.

Die durch das *Screening* gefundenen Varianten zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Endolysinen verringerte Stabilität gegenüber Trypsin und sollten daher vor einer Anwendung im Lebensmittel dahingehend optimiert werden, beispielsweise durch Zufallsmutagenese. Ein weiterer Optimierungsbedarf besteht an den Linkerregionen zwischen den Domänen, da das Experiment in Milch vermuten lässt, dass diese in den *gescreenten* Konstrukten die Ursache für die beobachtete Neutralisierung durch Milchbestandteile darstellen. Vor allem für den Kandidaten EcoGU3 ist dies interessant, zumal dieses Protein in Puffer im Gegensatz zu allen anderen Proteinen und Wildtyp-Endolysinen von allen vier Teststämmen fünf Zehnerpotenzen abtöten konnte. In diesem Zusammenhang sollen Aminosäurezusammensetzung und Länge der Linker variiert werden. Letzteres könnte auch über eine synthetische Genbank oder über schrittweise enzymatische Verkürzung der Linkersequenz (*incremental truncation*) erfolgen. Es wäre auch denkbar, in einer zweiten Generation eine Genbank ausschließlich mit den Domänen des zu optimierenden Kandidaten anzulegen,

wobei für jede Domäne verschiedene Termini eingesetzt werden. Hierfür müsste jedoch noch ein geeignetes und stringentes *Screening*-System entworfen werden.

Das in dieser Arbeit erstmals untersuchte Endolysin PlyP825 zeigte die beste Effektivität in Milch und ist somit ein äußerst vielversprechendes Enzym für die Anwendung eines antilisteriellen Zusatzes im Lebensmittel. Hierfür müssen noch weitere Experimente in Lebensmittel durchgeführt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Andrews** J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:5-16.
- Becker** S. C., Foster-Frey J. and Donovan D. M. (2008). The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. *FEMS Microbiol. Lett.* 287:185-91.
- Benoit** R. M., Wilhelm R. N., Scherer-Becker D. and Ostermeier C. (2006). An improved method for fast, robust, and seamless integration of DNA fragments into multiple plasmids. *Protein Expr. Purif.* 45:66-71.
- Berlin** Y. A. (1999). DNA splicing by directed ligation (SDL). *Curr Issues Mol Biol.* 1:21-30.
- Bernhardt** T., Wang I.-N., Struck D. K. and Young R. (2002). Breaking free: "Protein antibiotics" and phage lysis. *Res. Microbiol.* 153:493-501.
- Beveridge** T. J. and Graham L. L. (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* 55: 684-705.
- Bielmann** R. (2009). Specific receptor recognition and cell wall hydrolysis by bacteriophage structural proteins. Dissertation ETH Zürich. ETH No 18255.
- Bierne** H. and Cossart P. (2007). *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:377-397.
- Bitinaite** J., Rubino M., Varma K. H., Schildkraut I., Vaisvillia R. and Vaiskunaite R. (2007). USERTM friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. *Nucleic Acids Res.* 35:1992-2002.
- Boneca** I. G., Dussurget O., Cabanes D., Nahori M. A., Sousa S., Lecuit M., Psyllinakis E., Bouriotis V., Hugot J. P., Giovannini M., Coyle A., Bertin J., Namane A., Rousselle J. C., Cayet N., Prévost M. C., Balloy V., Chignard M., Philpott D. J., Cossart P. and Girardin S. E. (2007). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:997-1002.
- Booth** P. M., Buchman G. W. and Rashtchian A. (1994). Assembly and cloning of coding sequences for neurotrophic factors directly from genomic DNA using polymerase chain reaction and uracil DNA glycosylase. *Gene.* 146:303-308.
- Bortolussi** R. (2008). Listeriosis: a primer. *CMAJ.* 179:795-797.
- Borucki** M., K., Peppin J. D., White D., Loge F. and Douglas R. C. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7336-7342.
- Borysowski** J., Weber-Dabrowska B. and Górski A. (2006). Bacteriophage endolysins as novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 231:366-377.
- Bretfeld** F. (2009). Isolierung und Charakterisierung von Endolysinen aus Bakteriophagen gegen *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. Dissertation Universität Regensburg.
- Briers** Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C. W., Hertveldt K. and Lavigne R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ΦKZ and EL. *Mol. Microbiol.* 65:1334-1344.
- Buist** G., Steen A., Kok J. and Kuipers O. P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol. Microbiol.* 68:838-847.
- Callewaert** L., Walmagh M., Michiels C. W. and Lavigne R. (2010). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:1-8.

- Callewaert** L. and Michiels C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* 35:127-160.
- Carlton** R. M., Noordmann W. H., Biswas B., de Meester E. D. and Loessner M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 43:301-312.
- Carroll** S. A., Hain T., Technow U., Darji A., Pashalidis P., Joseph S. W. and Chakraborty T. (2003). Identification and characterization of a peptidoglycan hydrolase, MurA, of *Listeria monocytogenes*, a muramidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.* 185:6801-6808.
- Celia** L. K., Nelson D. and Kerr D. E. (2008). Characterization of bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*. *Vet. Microbiol.* 130:107-117.
- Cheng** Q., Nelson D., Zhu S. and Fischetti V. A. (2005). Removal of group B Streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:111-117.
- Chockalingam** A., McKinney C. E., Rinaldi D. S. Z. and Bannerman D. D. (2007). A peptide derived from human bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) exerts bactericidal activity against gram-negative bacterial isolates obtained from clinical cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 125:80-90.
- Cibik** R., Tailliez P., Langella P. and Chapot-Chartier M. P. (2001). Identification of Mur, an atypical peptidoglycan hydrolase derived from *Leuconostoc citreum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:858-864.
- Cohen** D. N., Sham Y. Y., Haugstad G. D., Xiang Y., Rossmann M. G., Anderson D. L. and Popham D. L. (2009). Shared catalysis in virus entry and bacterial cell wall depolymerization. *J. Mol. Biol.* 387:607-618.
- Coljee** V. W., Murray H. L., Donahue W. F. and Jarrell K. A. (2000). Seamless gene engineering using RNA- and DNA-overhang cloning. *Nat. Biotechnol.* 18: 789-791.
- Cossart** P. and Toledo-Arana A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.* 10: 1041-1050.
- Cost** G. J. (2007). Enzymatic ligation assisted by nucleases: simultaneous ligation and digestion promote the ordered assembly of DNA. *Nat Protoc.* 2:2198-2202.
- Croux** C., Ronda C., López R. and García J. L. (1993). Interchange of functional domains switches enzyme specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *Mol. Microbiol.* 9:1019-1025.
- Daniel** A., Euler C., Collin M., Chahales P., Gorelick K. J. and Fischetti V. A. (2010). Synergism between a novel chimeric and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1603-1612
- Dehus** O., Pfithenmaier M., Stuebs G., Fischer N., Schwaeble W., Morath S., Hartung T., Geyer A. and Hermann C. (2011). Growth temperature-dependent expression of structural variants of *Listeria monocytogenes* lipoteichoic acid. *Immunobiology.* 216:24-31.
- Diaz** E., López R. and García J. L. (1990). Chimeric phage-bacterial enzymes: A clue to the modular evolution of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:8125-8129.
- Diaz** E., López R. and García J. L. (1991). Chimeric Pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.* 266:5464-5471.
- Donahue** W. F., Turczyk B. M and Jarrell K. A. (2002). Rapid gene cloning using terminator primers and modular vectors. *Nucleic Acids Res.* 30:1-6.

- Donker-Voet J.** (1959). A serological study on some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *Am. J. Vet. Res.* 20:176-179.
- Donovan D. M., Dong S., Garrett W., Rousseau G. M., Moineau S. and Pritchard D. G.** (2006). Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2988–2996.
- Doyle R. J. and Marquis R., E.** (1994). Elastic, flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties. *Trends Microbiol.* 2:57-60.
- Dziarski R. and Gupta D.** (2006): The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 7:232.
- Eagle J. and Musselman A. D.** (1948). The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med.* 8:99–131.
- EFSA** European Food Safety Authority (2006). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to the use of nisin (E 234) as a food additive. *The EFSA Journal* 314:1-16.
- Engler C., Kandzia R. and Marillonnet S.** (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE.* 3(11):e3647.
- Engler C., Gruetzner R., Kandzia R. and Marillonnet S.** (2009). Golden Gate Shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS ONE.* 4:e5553.
- Engler C. and Marillonnet S.** (2011). Generation of families of construct variants using Golden Gate Shuffling. *Methods Mol. Biol.* 729:167-181.
- Fairbanks G., Steck T. L. and Wallach D. F.** (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10:2606-2617.
- Farber J. M. and Peterkin P. I.** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476-511.
- Farrow M. F. and Arnold F. H.** (2010). Combinatorial Recombination of Gene Fragments to Construct a Library of Chimeras. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 26:Unit 26.2.
- Fenton M., Ross P., McAuliffe O., O'Mahony J. and Coffey A.** (2010). Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioeng Bugs.* 1:9-16.
- Fiedler F.** (1988). Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. *Infection* 16:92-97.
- Finn R. D., Tate J., Misty J., Coghill P. C., Sammut S. J., Hotz H.-R., Ceric G., Forslund K., Eddy S. R., Sonnhammer E. L. L. and Bateman A.** (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 36:D281–D288.
- Firczuk M. and Bochtler M.** (2007). Folds and activities of peptidoglycanamidases. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:676–691.
- Fischetti V. A.** (2010). Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:357-62.
- Fliss I., Emond E., Simard R. E. and Pandian S.** (1991). A rapid and efficient method of lysis of *Listeria* and other Gram-positive bacteria using mutanolysin. *BioTechniques.* 11:453-457.
- Folsom J. P., Siragusa G. R. and Frank J. F.** (2006). Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69:826-834.

- Fokine A.**, Miroshnikov K. A., Shneider M. M., Mesyanzhinov V. V. and Rossmann M. G. (2007). Structure of the bacteriophage ϕ KZ Lytic transglycosylase gp144. *J. Biol. Chem.* 283:7242-7250.
- French G. L.** (2006). Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections-the potential role of daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:1107-1117.
- Gade R.**, Kaplan B. E., Swidersk P. M. and Wallace R. B. (1993). Incorporation of nonbase residues into synthetic oligonucleotides and their use in the PCR. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 10:61-65.
- Gaeng S.**, Scherer S., Neve H. and Loessner M. J. (2000). Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2951-8.
- Gandhi M.** and Chikindas (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113:1-15
- García P.**, García J. L., García E., Sanchez-Puelles J.M. and López R. (1990). Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene.* 86:81-88.
- Geu-Flores F.**, Nour-Elding H. H., Nielsen M. T. and Halkier B. A. (2007). USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Res.* 35:1-6.
- Ghuysen J. M.**, Lamotte-Brasseur J., Joris B. and Shockman G. D. (1994). Binding site-shaped repeated sequences of bacterial wall peptidoglycan hydrolases. *FEBS Lett.* 342:23-28.
- Gibson D. G.**, Young L., Chuang R.-Y., Venter J. C., Hutchinson III C. A. and Smith H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods.* 6:343-345.
- Gillor O.**, Etzion A. and Riley M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:591-606.
- Guillet C.**, Join-Lambert O., Le Monnier A., Leclercq A., Mechaï F., Mamzer-Bruneel M. F., Bielecke M. K., Scotti M., Disson O., Berche P., Vazquez-Boland J., Lortholary O. and Lecuit M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infect. Dis.* 16:136-138.
- Hain T.**, Chatterjee S. S., Ghai R., Kuenne C. T., Billion A., Steinweg C., Domann E., Kärst U., Jansch L., Wehland J., Eisenreich W., Bacher A., Joseph Biju, Schär J., Kreft J., Klumpp J., Loessner M. J., Dorscht J., Neuhaus K., Fuchs T. M., Scherer S., Doumith M., Jacquet C., Martin P., Cossart P., Rusniok C., Glaser P., Buchrieser C., Goebel W. and Chakraborty T. (2007). Pathogenomics of *Listeria* spp. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 541-557.
- Hayhurst E. J.**, Kailas L., Hobbs J. K. and Foster S. J. (2008). Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:14603-14608.
- Hermoso J. A.**, Monterroso B., Albert A., Galan B., Ahrazem O., Garcia P., Martinez-Ripoll M., Garcia J. L. and Menendez M. (2003). Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure.* 11:1239-1249.
- Hermoso J. A.**, García J. L. and García P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:1-12.
- Hiraga K.** and Arnold F. H. (2003). General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis. *J. Mol. Biol.* 330:287-296.
- Ho S. N.**, Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K. and Pease L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* 77:51-59.

- Hodgson** D. A. (2000). Generalized transduction of serotype 1/2 and serotype 4b strains of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35:312-323.
- Höltje** J. V. and Tomasz A. (1975). Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:1690-1694.
- Höltje** J.-V., Mirelman D., Sharon N. and Schwarz U. (1975). Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124:1067-1076.
- Hof** H., Nichterlein T. and Kretschmar M. (1997). Management of Listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:345-357.
- Horton** R., Hunt H., Ho S., Pullen J. and Pease L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. 77:61-68.
- Humann** J. and Lenz L. (2009). Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *J. Innate Immun.* 1:88-97.
- Inoue** H., Nojima H. and Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96:23-28.
- Jones** D. (1988). The place of *Listeria* among gram-positive bacteria. *Infection*. 16 Suppl 2:85-88.
- Jonquières** R., Bierre H., Fiedler F., Gounon P. and Cossart P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 34:902-914.
- Joris** B., Englebert S., Chu C. P., Kariyama R., Daneo-Moore L., Shockman G. D and Ghuysen J. M. (1992). Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* 70:257-264.
- Kajimura** J., Fujiwara T., Yamada S., Suzawa Y., Nishida T., Oyamada Y., Hayashi I., Yamagishi J., Komatsuzawa H. and Sugai M. (2005). Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 58:1087-1101.
- Kakikawa** M., Yokoi K. J., Kimoto H., Nakano M., Kawasaki K., Taketo A. and Kodaira K. (2002). Molecular analysis of the lysis protein Lys encoded by *Lactobacillus plantarum* phage phi1e. *Gene*. 299:227-234.
- Kaluz** S. and Flint A. P. F. (1994). Ligation-independent cloning of PCR products with primers containing nonbase residues. *Nucleic Acids Res.* 22:4845.
- Kaya** S., Araki Y and Ito E. (1985). Characterization of a novel linkage unit between ribitol teichoic acid and peptidoglycan in *Listeria monocytogenes* cell walls. *Eur. J. Biochem.* 146:517-522.
- Kenny** J. G., McGrath S., Fitzgerald G. F. and van Sinderen D. (2004) Bacteriophage Tuc2009 encodes a tail-associated cell wall-degrading activity. *J. Bacteriol.* 186:3480-3491.
- Khosla** C. and Harbury P. B. (2001). Modular enzymes. *Nature* 409:247-252.
- Kitamura** K., Kinoshita Y., Narasaki S., Nemoto N., Husimi Y. and Nishigaki K. (2002). Construction of block-shuffled libraries of DNA for evolutionary protein engineering: Y-ligation-based block shuffling. *Protein Eng.* 15:843-853.
- Korndörfer** I. P., Danzer J., Schmelcher M., Zimmer M., Skerra A. and Loessner M. J. (2006). The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls. *J. Mol. Biol.* 364:678-689.

- Korndörfer** I. P., Kanitz A., Danzer J., Zimmer M., Loessner M. J. and Skerra A. (2008). Structural analysis of the L-alanyl-D-glutamate endopeptidase domain of *Listeria* bacteriophage endolysin Ply500 reveals a new member of the LAS peptidase family. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 64:644-650.
- Krämer** J. (2007). *Lebensmittel-Mikrobiologie*. Verlag Eugen Ulmer KG, Stuttgart.
- Kumar** J. K. (2008). Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:555-561.
- Kusuma** C. M. and Kokai-Kun J. F. (2005). Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3256–3263.
- Laemmli** U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Layec** S., Decaris B. and Leblond-Bourget N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Res. Microbiol.* 159:507-515.
- Lebedenko** E. N., Birikh K. R., Plutalov O. V. and Berlin Y. A. (1991). Method of artificial DNA splicing by directed ligation (SDL). *Nucleic Acids Res.* 19:6757-6761.
- Li** M. Z. and Elledge S. J. (2007). Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat. Methods*. 4:251-256.
- Li** W. and Gao F. (2007). Creation of DNA overhangs by using modified DNA overhang cloning method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:703-709.
- Lichenstein** H. S., Hastings. A. E., Langley K. E., Mendiaz E. A., Rohde M. F., Elmore R. and Zukowski M. M. (1990). Cloning and nucleotide sequence of the N-acetylmuramidase M1-encoding gene from *Streptomyces globisporus*. *Gene*. 88: 81-86.
- Liu** X. P. and Liu J. H. (2010). The terminal 5' phosphate and proximate phosphorothioate promote ligation-independent cloning. *Protein Sci.* 19:967-973.
- Loeffler** J. M. and Fischetti V. A. (2003). Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:375-377.
- Loeffler** J. M., Djurkovic S. and Fischetti V. A. (2003). Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.* 71: 6199–6204.
- Loessner** M. J., G. Wendlinger and Scherer S. (1995). Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol. Microbiol.* 16:1231-1241.
- Loessner** M. J., Schneider A. and Scherer S. (1996). Modified *Listeria* bacteriophage lysin genes (*ply*) allow efficient overexpression and one-step purification of biochemically active fusion proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3057–3060
- Loessner** M. J., Maier S. K., Daubek-Puza H., Wendlinger G. and Scherer S. (1997). Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different Bacilli. *J. Bacteriol.* 179:2845-2851.
- Loessner** M. J., Kramer K., Ebel F. and Scherer S. (2002). C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 44:335-349.
- Loessner** M. J. (2005). Bacteriophage endolysins – current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:1-8.

- López R.**, García E., García P. and García J. L. (1997). The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? *Microb. Drug Resist.* 3:199–211.
- Lottspeich F.** and Zorbas H. (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin. 42-43.
- Low L.Y.**, Yang C., Perego M., Osterman A. and Liddington R.C. (2005). Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *J. Biol. Chem.* 280:35433–35439.
- Madigan T. M.**, Martinko J. M. and Parker J. (2003). *Brock, Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg. S.80.
- Manoharadas S.**, Witte A. and Blasi U. (2009). Antimicrobial activity of a chimeric enzybiotic towards *Staphylococcus aureus*. *J. Biotechnol.* 139:118–123.
- Mahony J.**, McAuliffe O., Ross P. R. and Sinderen D. van (2010). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:1-7.
- Mayer M. J.**, Narbad A. and Gasson M. J. (2008). Molecular characterization of a *Clostridium difficile* bacteriophage and its cloned biologically active endolysin. *J. Bacteriol.* 190:6734-6740.
- Mayer M. J.**, Payne J., Gasson M. J. and Narbad A. (2010). Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage ΦCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5415-5422.
- Mc Grath S.**, Neve H., Seegers J. F., Eijlander R., Vegge C. S., Brondsted L., Heller K. J., Fitzgerald G. F., Vogensen F. K. and van Sinderen D. (2006). Anatomy of a lactococcal phage tail. *J. Bacteriol.* 188:3972-82.
- Mead P.S.**, Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M. and Tauxe R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect. Dis.* 5:607–625.
- Mikoulinskaia G. V.**, Odinokova I. V., Zimin A. A., Lysanskaya V. Y., Feofanov S. A. and Stepnaya O. A. (2009). Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5. *FEBS J.* 276:7329-7342.
- Moak M.** and Molineux I. J. (2004). Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Mol. Microbiol.* 51:1169-1183.
- Nakimbugwe D.**, Masschalck B., Atanassova M., Zewdie-Bosüner A. and Michiels C. W. (2006). Comparison of bactericidal activity of six lysozymes at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 108:355-363.
- Navarre W. W.** and Schneewind O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:174-229.
- Navarre W. W.**, Ton-That H., Faull K. F. and 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.
- Neuhaus F. C.** and 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.
- Nisson P. E.**, Rashtchian A. and Watkins P. C. (1991). Rapid and efficient cloning of Alu-PCR products using uracil DNA glycosylase. *Genome Res.* 1:120-123.
- Nour-Eldin H. H.**, Hansen B. G., Norholm M. H. H., Jensen J. K. and Halkier B. A. (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* 34:e122.

- Obeso** J. M., Martínez B., Rodríguez A. and García P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage Φ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 128:212-218.
- Oldham** E. R. and Daley M. (1991). Lysostaphin: Use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. *J. Dairy Sci.* 74:4175-4182.
- Pace** C. N., Vajdos F., Lee L., Grimsley G. and Gray T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4:2411-2423.
- Pace** C.N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Meth. Enzymol.* 131:266-280.
- Peel** M., Donachie W. and Shaw A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Microbiol.* 134:2171-2178.
- Peschel** A., Otto M., Jack R. W., Kalbacher H., Jung G. and Götz F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274:8405-8410.
- Pieper** F. (2005). Reinigung, Charakterisierung und „Up Scaling“ des Endolysins Ply511 des *Listeria*-Phagen A511. Diplomarbeit Fachhochschule Weihenstephan.
- Popowska** M. (2004). Analysis of the peptidoglycan hydrolases of *Listeria monocytogenes*: multiple enzymes with multiple functions. *Pol J Microbiol.* 53:29-34.
- Pritchard** D. G., Dong S., Baker J. R. and Engler J. A. (2004). The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 150:2079–2087.
- Quan** J. and Tian J. (2009). Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS ONE*. 4:e6441.
- Quan** J. and Tian J. (2011). Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc.* 6:242-251.
- Rashel** M., Uchiyama J., Takemura I., Hoshiba H., Ujihara T., Takatsuji H., Honke K. and Matsuzaki S. (2008). Tail-associated structural protein gp61 of *Staphylococcus aureus* phage/MR11 has bifunctional lytic activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 284:9-16.
- Rashtchian** A., Buchman G. W., Schuster D. M. and Berninger M. S. (1992). Uracil DNA glycosylase-mediated cloning of polymerase chain reaction-amplified DNA: application to genomic and cDNA cloning. *Anal. Biochem.* 206:91-97.
- Rau** A., Hogg T., Marquardt R. and Hilgenfeld R. (2001): A new lysozyme fold. *J. Biol. Chem.* 276:31994–31999.
- Rebatchouk** D., Daraselia N. and Narita J. O. (1996). NOMAD: A versatile strategy for in vitro DNA manipulation applied to promoter analysis and vector design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:10891-10896.
- Ridgen** D. J., Jedrzejewski M. J. and Galperin M. Y. (2003). Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of γ -D,L-glutamate-specific amidohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* 28:230-234.
- Robert Koch-Institut** (2010). Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland - Listeriose 2001 bis 2009. *Epidemiologisches Bulletin* 34:341-346.
- Rocourt** J. and Buchrieser C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: *Listeria, listeriosis and food safety*. 3rd ed. Ryser E. T. and Marth E. H. (Editor). CRC Press, Taylor & Francis Group Inc., New York:1-20.

- Romero A.**, López R. and P. García. (1990). Sequence of the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage HB-3 amidase reveals high homology with the major host autolysin. J. Bacteriol. 172:5064-5070.
- Royer C. A.**, (1995). Fluorescence spectroscopy. Methods in Molecular Biology. In: Shirley B.A. (Editor). Humana Press Inc., Totowa, NJ. Vol. 40, chapter 3:65-89.
- Rudolph R.** and Lilie H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB J. 10:49-56.
- Sambrook J.**, Fritsch E. E. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanchez-Beato A. R.**, Ronda C. and García J. L. (1995). Tracking the evolution of the bacterial choline-binding domain: Molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 cspA Gene. J. Bacteriol. 177:1098–1103.
- Sánchez-Puelles J.**, Sanz J. M., García J. L. and García E. (1990). Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. Gene. 89:69-75.
- Sanz J. M.**, García P. and García (1996). Construction of a multifunctional pneumococcal murein hydrolase by module assembly. Eur. J. Biochem. 235:601-605.
- Scheurwater E.**, Reid C. W. and Clarke A. J. (2007). Lytic transglycosylases: Bacterial space-making autolysins. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40:586–591.
- Schleifer K. H.** and Kandler O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol Rev. 36:407-477.
- Schmelcher M.** (2007). Engineering of bacteriophage endolysins for detection and control of *Listeria*. Dissertation ETH Zürich. Diss. ETH No. 17721.
- Schmelcher M.**, Shabarova T., Eugster M. R., Eichenseher F., Tchang V. S., Banz M. and Loessner M. J. (2010). Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells using fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. Appl. Environ. Microbiol. 76:5745-5756.
- Schmid F. X.** (1989). Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. Protein structure a practical approach. In: Creighton T.E. (Editor). IRL Press, Oxford, UK. Chapter 11:251-286.
- Schmid F. X.** (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. Proofs for Protein structure: A practical approach. In: Creighton T.E. (Editor). IRL Press, Oxford, UK. Chapter 11:259-295.
- Schuchat A.**, Swaminathan B. and Broome C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 4:169-183.
- Schuppler M.** and Loessner M. J. (2010). The opportunistic pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and interaction with the mucosal immune system. Int J Inflam. 2010:704321-704332.
- Seeliger H. P. R.** (1975). Serovars of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. Proc 6th Int. Symp. Listeriosis in Sutton-Bonington. University of Leicester Press, Leicester, England.
- Sheehan M. M.**, García J. L., López R. and García P. (1996). Analysis of the catalytic domain of the lysin of the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling. FEMS Microbiol. Lett. 140:23–28.

- Shida** T., Hattori H., Ise F. and Sekiguchi J. (2001). Mutational analysis of catalytic sites of the cell wall lytic N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases CwlC and CwlV. *J. Biol. Chem.* 276:28140-28146.
- Shuman** S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 51:32678-32684.
- Silhavy** T. J., Kahne D. and Walker S., (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000414.
- Sleight** S. C., Bartley B. A., Lieviant J. A. and Sauro H. M. (2010). In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Res.* 28:2624-2636.
- Smith** C., Day P. J. R. and Walker M. R. (1993). Generation of cohesive ends on PCR products by UDG-mediated excision of dU, and application for cloning into restriction digest-linearized vectors. *PCR Methods Appl.* 2:328-332.
- Stark** C. J., Boncora R. P., Hoopes J. T. and Nelson D. C. (2010). Bacteriophage lytic enzymes as antimicrobials. In: Sabour P. M. and Griffiths M. W. (Editor): *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*. ASM Press, Washington, DC.
- Steen** A., Buist G., Leenhouts, K. J., El Khattabi, M., Grijpstra F., Zomer A. L., Venema G., Kuipers O. P. and Kok J. (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J. Biol. Chem.* 278:23874-23881.
- Stemmer** W. P. C. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:10747-10751.
- Uchikawa** K., Sekikawa I. and Azuma I. (1986). Structural studies of teichoic acids in cell walls of several serotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Biochem.* 99:315-327.
- Van Regenmortel** M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Carstens E. B., Estes M. K., Lemon S. M., Maniloff J., Mayo M. A., McGeoch D. J., Pringle C. R. and Wickner R. B. (2000). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Academic press. S. 1162.
- Vasala** A., Välikkilä M., Caldentey J. and Alatossava T. (1995). Genetic and biochemical characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4004-4011.
- Vázquez-Boland** J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J. and Kreft J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:584-640.
- Villiers** B. R. M., Stein V. and Hollfelder F. (2010). USER friendly DNA recombination (USERec): a simple and flexible near homology-independent method for gene library construction. *Protein Eng. Des. Sel.* 23:1-8.
- Vollmer** W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:287-306.
- Vollmer** W., Blanot D. and de Pedro M. A. (2008-A). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:149-167.
- Vollmer** W., Joris B., Charlier P. and Foster S. (2008-B). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:259-286.
- Wang** I. N., Smith D. D. and Young R. (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:799-825.

- Wang** L. and Lin M. (2007). Identification of IspC, an 86-Kilodalton protein target of humoral immune response to infection with *Listeria monocytogenes* serotype 4b, as a novel surface autolysin. *J. Bacteriol.* 189:2046–2054.
- Weidenmaier** C. and Peschel A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:276-287.
- Wendlinger** G., Loessner M. J. and Scherer S. (1996). Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 142:985-992.
- Xiang** Y., Morais M. C., Cohen D. N., Bowman V. D., Anderson D. L. and Rossmann M. G. (2008). Crystal and cryoEM structural studies of a cell wall degrading enzyme in the bacteriophage Ø29 tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 150:9552–9557.
- Yoong** P., Schuch R., Nelson D. and Fischetti V. A. (2004). Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.* 186:4808–4812.
- Zhu** B., Cai G., Hall E. O. and Freeman G. J. (2007). In-Fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques*. 43:354-359.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Übersicht der verwendeten Primer und Matrizen zur Domänenklonierung mit und ohne synthetischen Linker. Die Domänengrößen in bp wurde von ATG bis einschließlich *Bam*HI-Schnittstelle berechnet.

Domäne	Primer	Linker	Matrize	Größe bp
CBD511	fw-CBD511-lib rw-CBD511-Spel	synthetisch	Plasmid p1319	498
CBDP40	fw-CBDP40-lib rw-CBDP40-Spel	synthetisch	Plasmid p2507	417
CBDP40L	fw-CBDP40-long rw-CBDP40-Spel	synthetisch	Plasmid p2507	522
CBDP40nls	fw-CBDP40-long rw-CBDP40-Bam	-	Plasmid p2507	471
CBD500	fw-CBD500-lib rw-CBD500-Spel	synthetisch	Plasmid p766	486
CBDB025	fw-CBDB025-lib rw-CBDB025-Spel	synthetisch	Kryptischer Phage in S1803	513
CBDP35	fw-CBDP35-lib rw-CBDP35-Spel	synthetisch	Phage ProCC P814	519
CBD006	fw-CBD006-lib rw-CBD006-lib rw2-Lin_syn-lib	synthetisch, keine Spel- Schnittstelle	Kryptischer Phage in S1577	294
EAD511	fw-EAD511-lib rw-EAD511-lib	proteinogen	Plasmid p1319	591
EAD500	fw-EAD500-lib rw-EAD500-lib	proteinogen	Plasmid p766	468
EADP40	rw-EADP40-lib rw-EADP40-lib	proteinogen	Plasmid p2507	681
EADP35	fw-EADP35-lib rw-EADP35-lib	proteinogen	Phage ProCC P814	456
EADB054	fw-EADB054-lib rw-EADB054-lib	proteinogen	Kryptischer Phage in S1148	588
EADPSA	fw-EADPSA-lib rw-EADPSA-lib	proteinogen	Plasmid p2513	552
EADgp29	fw-EADgp29-lib rw-gp29-Spel	synthetisch	Phage ProCC P721	528
MurA	fw-MurA-lib rw-MurA-lib	proteinogen	ProCC S1095	837
MurA-Var2	fw-MurA-Var2-lib rw-MurA-lib	proteinogen	ProCC S1095	570
Cellosyl	fw-Mutlys-lib rw-Mutlys-Spel	synthetisch	Plasmid p2958	711
Sle1	fw-Sle1-lib rw-Sle1-Spel	synthetisch	ProCC S2297	465
IspC	-	proteinogen	synthetisches Gen	684

Tabelle 7.2: Ergebnisse aus Initial- und Spezifitäts-Screening, Sequenzierung, Screening auf gewünschte Eigenschaften und Inhibition von Listerien-Wachstum der 2- und 3-Domänen Proteine. *Variante stammt aus dem 1095-Ansatz. Angegeben ist jeweils die Anzahl identischer Kandidaten, die zeitliche Bewertung der Lysehofbildung im Initial-Screening (1: Hof nach Induktion bei 3 h 30°C oder bereits vor Induktion; 2: Hof nach Induktion bei 6 h 30°C; 3: Hof nach weiterer Inkubation ÜN bei RT; 4: Hof nach anschließender Lagerung bei 4°C. Bei mehreren Treffern mit selbiger Sequenz wurden die Werte gemittelt) sowie die Lysehofbildung auf verschiedenen Stämmen. Die Anzahl an „+“ gibt dabei die Größe der Lysehöfe an, bei „(+)“ waren nur schwache, bei „((+)“ nur sehr schwache Lysehöfe zu sehen. Screening Flüssiglyse: leere Felder: in diesem Test als negativ bewertet; acider pH (+, ++: Lyseaktivität bis pH 5 bzw. pH 4,5), Toleranz von EDTA (150, 50, 10: Lyseaktivität in Gegenwart von maximal 150, 50 bzw. 10 mM EDTA) und Aktivität bei pH 6 (+: Vergleichbare OD-Abnahme wie bei Ply511-exprimierendem Klon); schraffiert: Kandidat zeigte keine OD-Abnahme in Flüssiglysetestung bei pH 6. Wachstumsinhibition: L.: Bewertung der Proteinmenge im Zellaufschluss-Überstand von 0-4 (0: keine lösliche Fraktion, 1-4: aufsteigende Mengen an löslichem Protein), a: mit Abbaubanden. n.a. Klon nicht gewachsen.

Spezifität EAD (putativ)
Amidase
L-Ala-D-Glu-Peptidase
D-Glu-meso-DAP-Peptidase
Lysozym
Glucosaminidase

Bindung CBD
alle Serovare
bestimmte Serovare

2-Domänen Proteine															
Kandidat	Initial-Screening		Lysehofbildung bei pH 7				Sequenzierung			Screening Flüssiglyse			Wachstums-inhibition		
	Anzahl	Zeitlich	S1095 sv 1/2a	S1135 sv 3a	S776 sv 4b	S1147 sv 6a	Pos. 1	Pos. 2		EDTA	pH 4,5/5	pH 6	L.	S1095 sv 1/2a	S776 sv 4b
Y1	1	2	++++	+++	++++	++++	EAD511	CBD511			+				
N1	1	1	++	+++	++	++	CBD511	EAD511			+				
F	2*	3	+	+	+	+	EADPSA	CBD511							
J1	2	1	+	+	+	+	CBD511	EADPSA							
M2	1	2	(+)	+	(+)	(+)	EAD511	CBD40L							
K1	1	1	++	+++	+	++	EADP40	CBD511	50	++	+	4	24 h	24 h	
Q3	1	4	+	+	(+)	(+)	CBD511	EADP40	50		+	n. a.	n. a.	n. a.	
M1	3	1	+++	+++	++	+++	EAD500	CBD511	10		+	4	24 h	24 h	
T1	3	1	++++	+++	+++	+++	CBD511	EAD500							
J8	5	4	(+)	+	(+)	(+)	EADP35	CBD511							
J10	2	3	++	++	++	++	CBD511	EADP35							
J3	2	2	(+)	(+)	(+)	++	MurAVar2	CBD511	50						
L1b	1	1	+	+	(+)	(+)	CBDB025	EADP40							

3-Domänen Proteine															
Kandidat	Initial-Screening		Lysehofbildung bei pH 6				Sequenzierung			Screening Flüssiglyse			Wachstums-inhibition		
	Anzahl	Zeitlich	S1095 sv 1/2a	S1135 sv 3a	S776 sv 4b	S1147 sv 6a	Pos. 1	Pos. 2	Pos. 3	EDTA	pH 4,5/5	pH 6	L.	S1095 sv 1/2a	S776 sv 4b
CBD511 mit 2 EADs															
EcoU 2	1	2	((+))	+	++	+	Sle1	EAD511	CBD511						
EcoFP 8	1	3	+	+	+	+	Sle1	EADB054	CBD511						
EcoFL 27	1	3	+	((+))	+	+	Sle1	EADPSA	CBD511						
EcoCK 1	3	2	+	+	+	+	EAD511	CBD511	EADB054			+			
EcoGZ 9	1	3	++	++	++	+	CBD511	EADPSA	EAD511						
EcoCB 1	1	1	+	((+))	+	+	CBD511	EAD511	EADB054						
EcoGT 3	1	1	++	(+)	+	+	EADP40	EADP40	CBD511	50	++	+	4	0 h	0 h
EcoFS 6	2	2	++	+	+	+	EADP40	CBD511	EADP40	50	++	+	3	72 h	24 h
EcoAS 9	1	3	+	+	+	(+)	EADP40	CBD511	Cellosyl	50					
EcoFL 5	1	1	((+))	+	+		Cellosyl	CBD511	EADP40	50					
EcoGB 2	2	2	+	+	+++		EAD500	EAD500	CBD511			+			
EcoFN 6	3	3	+	+	+	(+)	EADP35	CBD511	EAD500	50					
EcoAK 2	2	2	++	++	++	++	EAD511	CBD511	EADP40	10		+	1	0 h	0 h
EcoFQ 1	4	2	+	+	+	+	EADP40	CBD511	EAD511	50		+	2	72 h	0 h
EcoGX 3	1	1	++	++	+	+	EAD511	EAD500	CBD511	10		+	4	0 h	0 h
EcoI 3	1	2	++	++	+	++	EAD500	EAD511	CBD511			+			
EcoAD 2	3	2	+++	+++	+++	+++	EAD500	Sle1	CBD511			+			

Fortsetzung von Tabelle 7.2

EcoGO 11	2	2	++	++	++	++	EAD500	CBD511	EAD511	10		+	2	0 h	0 h
EcoE 21	1	3	+	+	+	+	EAD500	CBD511	Sle1	10					
EcoO 6	3	4	++	++	++	++	CBD511	EADB054	EAD500						
EcoGW 11	2	1	++	++	++	++	CBD511	EADPSA	EAD500	10					
EcoFZ 5	3	3	++	+	+	+	EAD511	EADgp29	CBD511			+			
EcoGS 12	2	2	+	+	+	+	EAD511	CBD511	EADgp29			+			
EcoGM 14	1	1	+	+	+	+	EAD511	MurA Var2	CBD511						
EcoCM 3	2	3	(+)	(+)	((+))	((+))	MurA-Var2	EADB054	CBD511	10					
EcoCM 1	2	1	+	+	+	+	EAD511	CBD511	IspC						
EcoFA 3	1	2	+++	++	+++	+	MurA-Var2	CBD511	EADPSA	10					
EcoFR 1	2	2	++	++	+	+	CBD511	EAD511	MurA-Var2			+			
EcoGC 10	1	3	++	++	++	++	CBD511	EAD511	IspC						
EcoK 4	3	3	+	(+)	(+)	(+)	CBD511	EADPSA	MurA-Var2						
EcoHB 8	1	1	+	+	(+)	+	CBD511	EADPSA	MurA						
EcoX 2	1	4	+	+	+	+	Cellosyl	EADP35	CBD511						
EcoK 2	4	1	+	++	++	+	EADP40	EAD500	CBD511	10					
EcoGX 15	2	2	+	+	+	(+)	EADP40	EADP35	CBD511	10					
EcoGP 4	3	1	++	++	+	++	EAD500	EADP40	CBD511	10	++	+	1a	24 h	0 h
EcoFN 5	2	3	+	+	+	(+)	EADP35	EADP40	CBD511	50					
EcoGU 3	1	1	++	++	++	++	EADP40	CBD511	EAD500	10	++	+	1	72 h	72 h
EcoGQ 6	1	1	++	+	+	+	EADP40	CBD511	EADP35	50	++	+	2	72 h	72 h
EcoN 6	1	3	++	++	++	++	EAD500	CBD511	Cellosyl	10					
EcoGH 1	2	1	++	++	++	+	EAD500	CBD511	EADP40	50		+	2	72 h	0 h
EcoGC 3	2	2	+	+	+	+	CBD511	EADP40	EAD500	10					
EcoGO 1	1	1	+	(+)	((+))		EADP40	MurA	CBD511	50					
EcoAB 4	1	2	(+)	+		(+)	MurA-Var2	EADP40	CBD511	10					
EcoFB 1c	1	1	((+))	++	(+)		EADP40	CBD511	IspC	150			0-1	0 h	0 h
EcoFR 9	1	3	++	++	++	++	EADP40	CBD511	MurA-Var2	50					
EcoV 1	2	3	+	+	+	+	CBD511	EAD500	EADgp29	10		+	2	0 h	0 h
EcoR 4	1	2	(+)	+	(+)	(+)	MurA-Var2	EAD500	CBD511						
EcoAE 4	3	2	++	++	(+)	++	EAD500	CBD511	MurA	10		+	3	0 h	0 h
EcoAS 4	2	2	++	++	++	++	MurA-Var2	CBD511	EAD500	10		+	4	24 h	0 h
EcoGS 17	2	1	+	+	+	+	MurA-Var2	CBD511	EADP35	50	+		1	72 h	0 h
EcoHA 3	1	1	+	+	+	+	CBD511	EAD500	MurA-Var2						
EcoAL 3	1	2	+	++	+	+	CBD511	MurA-Var2	EAD500						

CBD511 mit 1 EAD und 1 CBD (inklusive CBPD40-Varianten)

EcoGY 26	1	3	+	+	+	+	CBD500	EAD511	CBD511						
EcoAS 14	2	3	(+)	+	+	+	CBPD35	EAD511	CBD511						
EcoGV 10	1	3	++	+	++	+	CBDB025	EAD511	CBD511						
EcoK 8	1	4	+	+	+	+	CBPD40nls	EADPSA	CBD511						
EcoGB 21	1	4	(+)	(+)	(+)	(+)	EADPSA	CBD500	CBD511						
EcoCG 1	1	3	+	+	+	+	EAD511	CBD511	CBDB025						
EcoGE 1	5	3	+	+	+	+	EAD511	CBD511	CBPD40nls			+			
EcoFQ 8	1	3	+	+	+	+	EADPSA	CBD511	CBPD40nls						
EcoL 4	1	2	+	+	+	+	CBD006	CBD511	EAD511		++		3	72 h	0 h
EcoFJ 5	2	3	+	+	+	+	CBD500	CBD511	EAD511						
EcoO 2	1	2	+	+	(+)		CBD500	CBD511	EADPSA						
EcoFQ 9	1	3	+	+	+	+	CBD511	CBD511	EADB054						
EcoGZ 10	1	3	+	+	++	+	CBD511	EAD511	CBD500						
EcoFS 14	1	4	+	+	+	+	EADP40	CBPD40L	CBD511	150	++		3	0 h	0 h
EcoO 5a	1	4	++	++	++	++	CBDB025	EADP40	CBD511	50					
EcoGT 9	2	1	+	+	+	+	EADP40	CBD511	CBDB025	150	++		3	72 h	0 h
EcoAA 1	1	1	(+)	+	+	+	EADP40	CBD511	CBPD40nls	50	++		2	24 h	0 h
EcoGD 16	1	4	+	+	+	+	CBPD35	CBD511	EADP40	150	++		3	0 h	0 h
EcoFQ 7	1	3	+	+	+	+	CBD511	CBPD35	EADP40	150	++		2	24 h	0 h
EcoAL 5	1	2	++	++	+	++	CBDB025	EAD500	CBD511						
EcoAS 10	1	3	+	++	+	(+)	CBPD35	EAD500	CBD511	10					
EcoGN 1	1	1	+	+	+	+	EAD500	CBDA006	CBD511	10					
EcoFL 4	1	1	+	+	+	+	CBPD35	CBD511	EAD500						
EcoA 1	1	3	++	+	++	++	EAD500	CBD511	CBD500	10					
EcoX 1	1	4	(+)	(+)	+	(+)	EAD500	CBD511	CBDB025			+			
EcoGC 17	5	4	+	+	+	+	EADP35	CBD511	CBPD40nls	10					
EcoFJ 4	1	3	+	+	+	(+)	CBD511	CBD500	EAD500	10					
EcoGB 20	3	4	+	(+)	+	(+)	CBD511	CBPD35	EADP35						
EcoGO 5	1	1	+	+	+	+	CBPD40L	CBD511	EAD500	10					
EcoGA 16	1	4	+	(+)	++	+	CBD511	CBPD40nls	EAD500						
EcoGY 22	1	1	(+)	(+)	+	(+)	MurA-Var2	CBD511	CBDB025	10					

CBPD40-Variante mit 2 EADs

EcoFZ 6c	1	3	+	+	(+)		EAD511	EAD511	CBPD40nls						
EcoFQ 6	3	3	+	+	+		EAD511	EADPSA	CBPD40nls						
EcoAS 11	1	3	+	+	((+))		EAD511	EADPSA	CBPD40L						
EcoO 9e	1	4	+	+	+		EADPSA	CBPD40L	EADPSA						
EcoGW 8	1	1	+	+	+	(+)	EADP40	EADP40	CBPD40nls	50					

Fortsetzung von Tabelle 7.2

EcoFS 16	2	3	+	+	+	((+))	EADP40	EADP40	CBDP40L	50		+	2	0 h	0 h
EcoAR 5	1	3	(+)	++	+	(+)	EAD500	EAD500	CBDP40nls	10					
EcoAS 7	2	3	+	++	+	(+)	EADP40	EADB054	CBDP40nls	10					
EcoGE 10	2	4	+	+	+	((+))	EADP40	EADB054	CBDP40L	10					
EcoAI 8	1	2	+	+	+	+	EADP40	EADPSA	CBDP40L	150			1	0 h	0 h
EcoFR 8	1	3	++	+	+	((+))	EADP40	EAD511	CBDP40nls						
EcoGQ 12	1	4	((+))	(+)	(+)	(+)	EADP40	EAD511	CBDP40L						
EcoFN 2	2	2	+	+	+	+	Sle1	EADP40	CBDP40nls	50					
EcoO 3	1	3	((+))	(+)	(+)	((+))	EADPSA	CBDP40L	EADP40	10					
EcoGA 10	1	3	+	+	(+)		EAD500	EADPSA	CBDP40L						
EcoO 8	1	4	+	+	+		EAD511	EADgp29	CBDP40nls						
EcoFL 11	1	2	(+)		(+)	(+)	EADgp29	EADPSA	CBDP40nls	50		+	1	0 h	0 h
EcoGC 7	2	3	+	+	((+))		EAD511	MurA-Var2	CBDP40L			+			
EcoGS 9	1	1	+	+	((+))		MurA-Var2	EAD511	CBDP40nls	10					
EcoGM 3	1	1	+	+	((+))		EAD511	CBDP40nls	MurA-Var2						
EcoGD 4	3	3	+	+	+	(+)	EADP40	EAD500	CBDP40nls	50					
EcoAH 3	1	3	+	+		(+)	EAD500	EADP40	CBDP40nls	50					
EcoGM 2	1	1	+	+	((+))		EADP40	CBDP40nls	EAD500	50		+	3	24 h	24 h
EcoM 6	1	4	+	((+))	+	((+))	EADP40	CBDP40nls	EADgp29						
EcoGC 6	2	2	++	+	+	(+)	EADP40	MurA-Var2	CBDP40nls	50					
EcoHA 4	1	1	+	+	+		EADP40	MurA-Var2	CBDP40L	50					
EcoGS 14	1	1	+	+	+	((+))	MurA-Var2	EADP40	CBDP40nls	150			1	0 h	0 h
EcoAQ 8	1	3	+	+	(+)		MurA-Var2	CBDP40L	EADP40	50					
EcoR 3	1	2	+	+	((+))		MurA	EAD500	CBDP40nls						
EcoI 4	1	4	+	+	+	(+)	EAD500	CBDP40L	MurA-Var2	10					
EcoCE 2	1	3	+	+	+		MurA-Var2	CBDP40nls	EADP35	10					

CBDP40-Variante mit 1 EAD und 1 CBD (ohne CBD511)

EcoGA 8	2	3	+	++	+	((+))	EAD511	CBDP35	CBDP40nls						
EcoGB 13	1	3	+	+	+		EAD511	CBDP40nls	CBDP40nls						
EcoGR 8	1	4	((+))	+	+		CBD006	EADPSA	CBDP40nls						
EcoFM 4	1	3	+	+	+	+	CBD500	EADB054	CBDP40L						
EcoGT 7	1	1	+	+	+	+	CBD500	EAD511	CBDP40nls						
EcoW 1	3	2	+	+	+	((+))	EADP40	CBD006	CBDP40L	10	++		2	24 h	0 h
EcoFP 1	2	1	+	+	(+)		EADP40	CBD006	CBDP40nls	150	++		3	24 h	0 h
EcoGM 12	2	2	+	+	((+))	(+)	EADP40	CBDP40L	CBDP40nls	150	+		2	0 h	0 h
EcoFS 8	2	3	++	+	+	+	EADP40	CBDP40nls	CBD006	150	++		3	72 h	24 h
EcoGF 2	1	4	(+)	(+)	+	(+)	EADP40	CBDP40L	CBD500	50					
EcoAA 3e	1	4	+	+	+		CBDP40nls	CBDP35	EADP40	150	++		3	0 h	0 h
EcoS 8	1	4	+	+	+	+	CBDP35	EAD500	CBDP40nls						
EcoAQ 5	2	3	+	+	(+)		CBD006	EAD500	CBDP40L						

Einander ergänzende serovarspezifische CBDs

EcoV 3	1	4	+	+	+	+	EADPSA	CBD006	CBDP35						
EcoFR 10	1	3	+	+	+	(+)	CBDP500	CBDP35	Cellosyl	150	++		2	24 h	0 h

Serovarspezifische CBD

EcoGU 9	1	4	+	+	+		EADPSA	CBDP35	EADPSA						
EcoAS 15	2	2	+	(+)	((+))		EADP40	MurA-Var2	CBD006						
EcoFN 1	1	3	++	+	(+)		EAD500	CBD006	EAD500			+			
EcoGA 7	4	3	++	++	+		EADP40	EADPSA	CBDP35	150	+		2	72 h	72 h
EcoE 12,1	1	1	+++	+++	+++	+++	MurA	EAD511	CBD006						
EcoGY 10	1	1	+	+	+	+	EADP40	CBD006	EADPSA	150	++	+	4	24 h	0 h
EcoFK 2	1	3	+	+	+	+	CBDP35	EADP40	EAD511						
EcoFN 11	1	3	+	+	+		CBDP500	Cellosyl	Sle1						
EcoAG 5	1	2	++	+	(+)	((+))	EAD500	EAD511	CBD006						
EcoGX 7	1	1	+	+	((+))		EAD511	CBD006	EAD500			+			
EcoGB 16	1	4	(+)	(+)	((+))		MurA-Var2	CBD006	EADPSA	10					
EcoL 5d	1	3	+	+	+		CBD006	EAD511	IspC						
EcoR 6	2	3	+	+	(+)		CBD006	EADPSA	IspC						
EcoGQ 5	1	1	+++	+++	+++	+++	MurA-Var2	EAD500	CBD006	10					
EcoP 5	1	2	++	+	+	(+)	EADP40	EAD500	CBDP35						
EcoZ 22c	1	4	++	++	+		EADP40	MurA-Var2	CBDP35						
EcoN 4	1	1	++	+	+	(+)	EADP40	CBD006	MurA						
EcoGB 9	1	3	++	+	(+)		MurA	CBD006	EAD500	10		+	2	0 h	24 h
EcoAG 3	1	2	+	+	(+)	(+)	CBD006	MurA-Var2	EAD500						
EcoGP 8	1	3	+	(+)	(+)		CBD006	EADP40	CBDP35	150	++		2	48 h	72 h
EcoO 10b	1	4	+	+	(+)		EAD500	CBDP35	CBD006						
EcoGA 11	1	4	++	+	(+)		CBDP35	EAD500	CBD006						
EcoFA 7	1	4	+	+	+		CBDP35	CBDP35	EAD500	10					

3 EADs

EcoFR 3	1	2	+	+	+	(+)	EADP40	Sle1	Sle1						
EcoFL 8	1	2	(+)	+	+	+	MurA-Var2	EADB054	Sle1	10					
EcoFN 14	1	3	++	+	+		MurA	EADPSA	EADPSA	10					
EcoFM 17	1	3	+	+	+	+	Sle1	Cellosyl	EADgp29	10					
EcoGP 5	1	1	++	+++	+++	+++	MurA-Var2	EAD511	EAD500	10					

Patente

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Patenten geschützt:

Patentanmeldung PCT/EP2009/055869. "Modified Endolysin Ply511".

Angemeldet 2008, veröffentlicht 2009.

Erfinder: Scherzinger A., Beißinger M., Grallert H.

Patentanmeldung EP10006360. "Methods of Generating and Screening for Lytic Chimeric Polypeptides".

Angemeldet 2010, noch nicht veröffentlicht.

Erfinder: Scherzinger A., Leopoldseder S., Buchberger B.

Patentanmeldung "Novel *Listeria* bacteriophage P825 and uses thereof".

In Anmeldung 2011, noch nicht veröffentlicht.

Erfinder: Kaps J., Scherzinger A.

Tagungsbeitrag

Poster

Scherzinger A., Leopoldseder S.

"*Listeria* phage endolysin optimization by random domain combination".

First International Congress on Virus of Microbes, Institut Pasteur, Paris, Frankreich.

06/2010.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Hier gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner für die Begleitung meiner Arbeit von Anbeginn und für die interessanten und motivierenden Gespräche, die wertvolle Impulse setzten. Dazu zähle ich auch die Möglichkeit zur Teilnahme am Literaturseminar seines Lehrstuhls.

Bei Herrn Dr. Stefan Miller möchte ich mich für das stimulierende Angebot, bei der Firma Profos AG zu promovieren, bedanken, zumal das Arbeitsgebiet mich sehr interessierte und hier – nicht zuletzt – ein geradezu familiäres Arbeitsklima herrschte.

Zu großem Dank bin ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Ulrich Koszinowski verpflichtet, der mir die Fortsetzung meiner Promotionsarbeit im Max von Pettenkofer-Institut ermöglichte, und den Herren Dr. Wolfgang Mutter und Dr. Bernd Buchberger, die mir dabei behilflich waren.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sonja Leopoldseder, die meine direkte Betreuung übernommen hatte. Insbesondere seien ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre produktiven Anregungen hervorgehoben. Ihre profunden Kenntnisse haben mir bei der Entwicklung der Arbeit stets sehr geholfen. Hier möchte ich auch Frau Dr. Monika Walter für ihre begleitenden Verbesserungsvorschläge und ihren fachlichen Input danken.

Letztlich möchte ich mich bei den Herren Dr. Bernd Buchberger, Dr. Holger Grallert, Thomas Walter und Frau Dr. Julia Kaps für interessante Diskussionen und wertvolle Ratschläge bedanken. Meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen danke ich ebenso sehr herzlich für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit, die auch zu netten Aktivitäten außerhalb der Arbeit geführt hat.

Bei Frau Birgit Handke möchte ich mich für ihre Freundlichkeit und Heiterkeit bedanken, die die gemeinsame Arbeit wesentlich geprägt haben. Recht herzlich möchte ich mich auch bei Monika Ratzinger, Rainer Schmid und Maren Fischer bedanken, mit denen ich während ihrer Praktika arbeiten durfte.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Wirth gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kallbitzer für die Übernahme des Amtes des dritten Prüfers. Bei Herrn Prof. Dr. Michael Thomm bedanke ich mich für die Bereitschaft zum Ersatzprüfer. Herrn Prof. Dr. Christoph Oberprieler danke ich für den Vorsitz des Kolloquiums.

Mein abschließender Dank gilt natürlich meinen Eltern und meinen beiden Schwestern, die mich während dieser Zeit großartig unterstützt haben.