

Biologie

Molekulare Charakterisierung der
SasC-vermittelten Biofilmbildung in
Staphylococcus aureus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Luise Britz
aus Dresden

- 2020 -

Dekanin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Fetzner

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Heilmann

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Eva Liebau

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2020

Tag der Promotion:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei allen bedanken, die mich während der gesamten Zeit meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Heilmann für die Möglichkeit an einer interessanten und abwechslungsreichen Fragestellung mitarbeiten zu dürfen und für ihre fachliche Unterstützung und Anleitung sowie eine hilfsbereite Zusammenarbeit bei wissenschaftlichen Fragen und Problemstellungen. Auch meinen Kollegen und Kolleginnen aus der AG Heilmann möchte ich für eine wunderbare Arbeitsatmosphäre, ihre Freundschaft und regen fachlichen Austausch danken.

Bei Frau Prof. Liebau bedanke ich mich für die externe Betreuung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt dem leider verstorbenen Prof. Georg Peters für optimale Promotionsbedingungen am Institut für Medizinische Mikrobiologie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Alexander Schmidt und Waltraud Schmidt bedanken, den Organisatoren und Leitern der Graduiertenschule GRK1409 "Molecular Interactions of Pathogens with Biotic and Abiotic Surfaces". Für Ihre Betreuung und Unterstützung sowie die Möglichkeit der fachlichen Weiterbildung im Rahmen dieses Kollegs.

Prof. Dr. Victor Shahin und Dr. Gonzalo Rosso (Institut für Physiologie II, Universität Münster) gilt mein Dank für die Möglichkeit AFM-Untersuchungen meiner Arbeit hinzufügen zu können.

Ein großes Dankeschön gilt auch allen Kollegen der Instituts für Medizinische Mikrobiologie für ein großartiges Arbeitsklima und eine schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Meiner Familie und alten und neuen Freunden möchte ich ebenfalls danken, welche mich die ganzen Jahre begleitet und unterstützt haben. Und besonders möchte ich meinem Großvater danken, der diese Arbeit mühevoll grammatikalisch überprüft hat und als Ingenieur biologische Sekundärliteratur wälzte, um diese Arbeit auf innerliche Konsistenz zu prüfen.

Zuletzt möchte ich besonders meinem Mann Stefan danken, der sicherlich die Hauptlast aller Höhen und Tiefen bis zum Abschluss meiner Dissertation zu tragen hatte und mit mir zusammen durchgehalten hat.

Razupaltuff!

Das K.

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	vii
II	Tabellenverzeichnis	ix
III	Abkürzungsverzeichnis	xi
Zusammenfassung		xv
1	Einleitung	1
1.1	Staphylokokken	1
1.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
1.1.3	Weitere Staphylokokkenstämme	3
1.2	Zellwandaufbau Gram-positiver Bakterien	4
1.3	Biofilmbildung	5
1.4	Kovalent gebundene Oberflächenmoleküle von Staphylokokken	7
1.4.1	MSCRAMM-Proteinfamilie	8
1.4.2	G5-E-Repeat-Proteinfamilie	13
1.4.3	Three-helical bundle Proteinfamilie - Protein A	16
1.4.4	NEAT-Motiv-Proteinfamilie der Eisentransporterproteine	16
1.4.5	Strukturell uncharakterisierte, zellwandgebundene Proteine	17
1.5	Nicht-kovalent gebundene Oberflächen-assoziierte Moleküle	22
1.5.1	Sekretierte Proteine - SERAMs	22
1.5.2	Membrandurchspannende Proteine - Ebh und EbpS	24
1.6	Nicht-proteinogene Adhäsionsmoleküle	24
1.7	Regulation der Biofilmbildung	26
Zielstellung		29
2	Material	31
2.1	Verbrauchsmaterialien	31
2.2	Antikörper	35
2.3	Bakterienstämme	36
2.4	Primer und Primersequenzen	41
3	Methoden	45
3.1	Anzucht und Kultivierung von Bakterien	45
3.2	Arbeiten mit DNA	45
3.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Staphylokokken	46
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA	46

3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	47
3.2.4	Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren	48
3.2.5	Reinigung von Nukleinsäuren	48
3.2.6	Polymerasekettenreaktion	48
3.2.7	Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten	50
3.2.8	Klassische Klonierungsstrategie	50
3.3	Genetische Manipulation von Bakterien	50
3.3.1	Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i>	50
3.3.2	Transformation elektro-kompetenter <i>E. coli</i>	51
3.3.3	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i>	51
3.3.4	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i>	51
3.4	Arbeiten mit Proteinen	52
3.4.1	Herstellung von Zellysaten für Proteinexpressionstests	52
3.4.2	Präparative Reinigung von SasC-His-Fusionsproteinen	52
3.4.3	Konzentrationsbestimmung und Entsalzung von Proteinen	53
3.4.4	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	53
3.4.5	Western Blot	55
3.5	Protein-Protein-Interaktionsstudien	55
3.5.1	Biotinylierung von Proteinen und Western Liganden-Blot	55
3.5.2	<i>In vitro-crosslinking</i> mit Bis-Sulfosuccinimidylsuberat	57
3.5.3	<i>In vivo-crosslinking</i> mittels Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid	57
3.5.4	Surface Plasmon Resonance mittels BIAcore	64
3.5.5	Rasterkraftmikroskopische Analysen	65
3.5.6	MicroScale Thermophorese	66
3.6	Herstellung von Lysostaphinlysaten	69
3.7	Aggregationsassays	70
3.7.1	Kompetitiver Aggregationsassay	70
3.8	Untersuchungen zur Biofilmbildung	71
3.8.1	Semi-quantitativer Biofilm-Assay	71
3.8.2	Biofilm-Kompetitionsassay	72
3.9	Statistische Auswertemethoden	72
3.10	Computer- und Software-gestützte Analysen	72
4	Ergebnisse	73
4.1	<i>Staphylococcal surface protein C</i> - SasC	73
4.1.1	Bioinformatische Strukturanalyse von SasC	73
4.1.2	SasC-His-Fusionsproteine zur heterologen Expression	73
4.1.3	Optimierung der Reinigung von SasC-His-Fusionsproteinen	75
4.1.4	Klonierung von nicht-überlappenden N-terminalen SasC-Subdomänen	80
4.1.5	Expression von SasC-(His-)F1, -F2, -F3, -F4 und -F5	81
4.2	Interaktionsstudien zur Identifizierung der funktionsvermittelnden SasC-Domänen	82
4.2.1	SasC-His-Proteine zeigen Interaktionen im Western Liganden-Blot	82

4.2.2	<i>In vitro-crosslinking</i> führt zu Dimer- und Multimerbildung von SasC-His-Proteinen	86
4.2.3	<i>In vivo-crosslinking</i> führt zu keiner Interaktion der SasC-His-Proteine . . .	90
4.3	Multimere von SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 in rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen	102
4.4	Interaktionsstudien mittels Surface Plasmon Resonance	108
4.4.1	Bestimmung der Molekulargewichte der SasC-His-Proteine mittels Größenausschlusschromatographie	108
4.4.2	SasC-His-1 und SasC-His-NT zeigen starke Interaktion mit immobilisierten Proteinen unter schwach ionischen Bedingungen	111
4.4.3	Erhöhung der Ionenstärke führt zu schwächerer Bindung von SasC-His-1 und SasC-His-NT an die immobilisierten Proteine	116
4.5	K_D -Bestimmung homo- und heterotypischer SasC-His-Interaktionen mittels MicroScale Thermophoresis	120
4.6	Phänotypische Analyse <i>sasC</i> - und <i>sasC</i> -Subklon exprimierender Staphylokokkenstämme	125
4.6.1	Expression von <i>sasC</i> und <i>sasC</i> -Subklonen in <i>S. carnosus</i> TM300, <i>S. aureus</i> 4074 und <i>S. aureus</i> SH1000	126
4.6.2	Phänotypische Analysen der Biofilmbildung	138
5	Diskussion	147
6	Schlussfolgerungen und Ausblick	161
7	Literatur	163
	ANHANG	183
	LEBENS LAUF	207

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zellwandaufbau Gram-positiver Bakterien	5
1.2	Stadien der Biofilmbildung	6
1.3	Klassifizierung zellwandgebundener Proteine	9
1.4	„ <i>dock-lock-latch</i> “-Mechanismus	10
1.5	Modell der SasG-Dimerisierung	15
1.6	Schematische Darstellung der SasC-Subklone	19
3.1	Funktionsprinzip BACTH	58
3.2	Schema der T18-SasC-Genfusion	59
3.3	Schema der T25-SasC-Genfusion	60
3.4	Experimenteller Ablauf des Two-Hybrid Systems	62
3.5	Gradientenagar	63
3.6	Prinzip der SPR-Messung	65
3.7	Prinzip der MST-Messung	67
4.1	Schematische Darstellung SasC	74
4.2	Schematische Darstellung der SasC-His-Fusionsproteine	74
4.3	Schematische Darstellung des SasC-His-DUF1542-Fusionsproteins	74
4.5	Reinigung von SasC-His-1	77
4.4	Reinigung von SasC-His-NT	77
4.6	Reinigung von SasC-His-2	78
4.7	Reinigung von SasC-His-3	78
4.8	Reinigung von SasC-His-4	79
4.9	Reinigung von SasC-His-5	79
4.10	Reinigung von SasC-His-DUF1542	80
4.11	Schematische Darstellung nicht-überlappender SasC-Subdomänen	81
4.12	Agarosegele der PCR-Produkte zur Konstruktion der N-terminalen Fragmente.	82
4.13	Biotinylierungstest	83
4.14	Western Liganden-Blot	84
4.15	Homotypisches <i>crosslinking</i> von SasC-His-Proteinen mit BS ³	88
4.16	Heterotypisches <i>crosslinking</i> von SasC-His-Proteinen mit BS ³	89
4.17	Expression der T18- und T25-SasC Fusionsproteine in <i>E. coli</i> XL-1 Blue	91
4.18	Co-Transformation von <i>E. coli</i> DHM1 mit (pUT18C-SasC)- und (pKT25-SasC)-Konstrukten 93	
4.19	Co-Transformation von <i>E. coli</i> BTH101 mit (pUT18C-SasC)- und (pKT25-SasC)- Konstrukten	93
4.20	Co-Transformation von <i>E. coli</i> BTH101 mit (pUT18C-SasC-F1) und (pKT25-SasC-F1)	94
4.21	Expressionstest von T18- und T25-SasC-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> BTH101	96

4.22	Einfluss von bivalenten Kationen auf das Wachstum von <i>E. coli</i> DHM1	98
4.23	Einfluss von bivalenten Kationen auf die Protein-Protein-Interaktion in <i>E. coli</i> DHM1	99
4.24	Aktivität der β -Galaktosidase	101
4.25	Co-Expressionstest von T18- und T25-SasC-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> DHM1	102
4.26	AFM-Aufnahme von SasC-His-NT und SasC-His-1	103
4.27	AFM-Aufnahme von SasC-His-3 und SasC-His-DUF1542	104
4.28	3D-Projektion von SasC-His-NT	105
4.29	3D-Projektion von SasC-His-4	106
4.30	3D-Projektion von SasC-His-DUF1542	107
4.31	Elutionsdiagramme der Größenausschlusschromatographie	110
4.32	SPR-Messung von SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-3 bei niedriger Ionenstärke	114
4.33	SPR-Messung von SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 bei niedriger Ionenstärke	115
4.34	SPR-Messung von SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-3 bei erhöhter Ionenstärke	118
4.35	SPR-Messung von SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 bei erhöhter Ionenstärke	119
4.36	K_d -Wert homotypische SasC-His-NT/SasC-His-NT-Interaktion	121
4.37	K_d -Wert homotypische SasC-His-1/SasC-His-1-Interaktion	121
4.38	K_d -Wert homotypische SasC-His-DUF1542/SasC-His-DUF1542-Interaktion	122
4.39	K_d -Wert heterotypischer SasC-His-1/SasC-His-NT-Interaktion	123
4.40	K_d -Wert heterotypischer SasC-His-1/SasC-His-3-Interaktion.	123
4.41	Hill-Koeffizient heterotypischer SasC-His-1/SasC-His-4-Interaktion	124
4.42	Schematische Darstellung der SasC-Subklone	125
4.43	Lysostaphinlysate aus <i>S. carnosus</i> TM300	127
4.44	Lysostaphinlysate aus <i>S. aureus</i> 4074	128
4.45	Lysostaphinlysate von <i>S. aureus</i> 4074 (pSub1)	129
4.46	Lysostaphinlysate aus <i>S. aureus</i> SH1000	130
4.47	Aggregation von <i>sasC</i> -exprimierenden <i>S. carnosus</i> TM300 und <i>S. aureus</i> SH1000	132
4.48	Kompetitiver Aggregationsassay von <i>S. carnosus</i> TM300	134
4.49	Kompetitiver Aggregationsassay von <i>S. aureus</i> SH1000	135
4.50	Kompetitiver Aggregationsassay von <i>S. carnosus</i> TM300 nach Wachstum auf Antiseren	136
4.51	Kompetitiver Aggregationsassay von <i>S. aureus</i> SH1000 nach Wachstum auf Antiseren	137
4.52	SasC-vermittelte Biofilmbildung in <i>S. aureus</i> SH1000	139
4.53	Aggregation von <i>S. aureus</i> SH1000 (pSasC)	140
4.54	SasC-vermittelte Biofilmbildung in <i>S. aureus</i> SH1000 auf Fibrinogen und Poly-L-Lysin	141
4.55	Biofilm-Kompetitionsassay von <i>S. aureus</i> SH1000 mit anti-SasC-NT-Antiserum	143
4.56	Grafische Auswertung der Biofilm-Kompetitionsassays mit anti-SasC-NT-Antiserum	144
4.57	Biofilm-Kompetitionsassays von <i>S. aureus</i> SH1000 mit rekombinanten Proteinen	146
5.1	Hypothetisches Modell der SasC-vermittelten Biofilmbildung	159

Tabellenverzeichnis

1.1	Klassifizierung der Zellwand-gebundenen Proteine von <i>S. aureus</i>	21
2.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	31
2.2	Chemikalien	32
2.3	Verwendete Kits	34
2.4	Verwendete Enzyme	34
2.5	Verwendete Antibiotika	35
2.6	Übersicht der verwendete Antiseren und Antikörper	35
2.7	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	36
2.8	Übersicht über die verwendeten Vektoren und Plasmide	39
2.9	Übersicht über die verwendeten Primer	41
3.1	Zusammensetzung der verwendeten Medien und Nährböden	45
3.2	Zusammensetzung TE-Puffer	46
3.3	Zusammensetzung TAE-Puffer und Probenpuffer	47
3.4	Analytischer Restriktionsansatz	48
3.5	Programme für Standard- und Colony-PCR	49
3.6	Programm für Gradienten-PCR	49
3.7	Zusammensetzung Wasch- und Elutionspuffer für native Proteinreinigung	53
3.8	Zusammensetzung Puffer und Lösungen für SDS-PAGE	54
3.9	Zusammensetzung Transfer-Puffer	55
3.10	Zusammensetzung Konjugations- und Quenching-Puffer	57
3.11	Zusammensetzung Puffer Z	64
3.12	Zusammensetzung Karbonatpuffer	71
4.1	Reinigungsschritte für SasC-His-Proteine	76
4.2	Eigenschaften der SasC-His-Proteine	80
4.3	Theoretische Eigenschaften der nicht-überlappenden SasC-Domänen	82
4.4	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Western Liganden-Blots	86
4.5	Proteinkomplexbildung mit BS ³	87
4.6	Größen der T18- und T25-SasC-Fusionsproteine	92
4.7	Messwerte der Größenausschlusschromatographie	109
4.8	Messwerte der SPR-Analyse bei niedriger Ionenstärke	112
4.9	Messwerte der SPR-Analyse bei erhöhter Ionenstärke	117
4.10	Größe der SasC-Subklone	126
5.1	Ergebnisse der Interaktionsstudien	158

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid	Cm^r	Chloramphenicol-resistent
Aaa	N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase; Autolysin/Adhäsion aus <i>S. aureus</i>	Cn	Chloramphenicol
Aap	<i>Accumulation-associated protein</i>	Cna	<i>Collagen adhesin</i>
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)	Coa	Staphylokoagulase
Agr	<i>Accessory gene regulator</i>	comEB	<i>competence gene EB</i>
Amp^r	Ampicillin-resistent	CoNS	Koagulase-negative Staphylokokken
AP	Alkalische Phosphatase	CoPS	Koagulase-positive Staphylokokken
APS	Ammoniumpersulfat	C-terminal	carboxyterminal
ATCC	Amerikanische Stammkollektion (<i>american type culture collection</i>)	C-Terminus	Carboxylterminus
AtIA	<i>S. aureus</i> Autolysin	CWA	zellwandgebundene Proteine (<i>cell wall anchored</i>)
AtIE	<i>S. epidermidis</i> Autolysin	CyaA	cyclische Adenylatcyclase
ATP	Adenosintriphosphat	Da	Dalton
Bap	<i>Biofilm-associated protein</i>	dest.	destilliert
Bbp	<i>Bone sialoprotein-binding protein</i>	d. h.	das heißt
BCA	Bicinchoninsäure	DMSO	Dimethylsulfoxid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3- Indolylphosphat	DHFR	Dihydrofolatreduktase
Bhp	<i>Bap homologue protein</i>	DLL	„dock-lock-latch“, Ligandenbindemechanismus für Oberflächenproteine
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	DNA	Desoxiribonukleinsäure
bp	Basenpaare	DNase I	DNA degradierendes Enzym
BS³	Bis-Sulfosuccinimidylsuberat	dNTP	Desoxyribonukleosid-5'- triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)	DspB	Dispersin B
bzw.	beziehungsweise	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CAP	<i>Catabolite activator protein</i>	Eap	<i>Extracellular adherence protein</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	Ebh	<i>Extracellular matrix-binding protein homologue</i>
CA-MRSA	Community-Acquired Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>	EbpS	<i>Elastin-binding protein</i>
CifA/B	<i>Clumping-factor A/B</i>	ECM	extrazelluläre Matrix
		eDNA	extrazelluläre DNA
		EDTA	Ethylendiamintetraacetat
		Embp	<i>Extracellular matrix binding protein</i>
		ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
		et al.	und andere (<i>et alii</i>)

EtOH	Ethanol	Mb	Megabasen
for	forward	min	Minuten
Fbe	<i>Fibrinogen-binding protein</i> , (SdrG)	MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
Fg	Fibrinogen	Mrp	<i>Multidrug Resistance-related Protein</i>
FIVAR	<i>Found In Various Architectures</i> , Strukturmotiv	MS	Massenspektrometrie
Fn	Fibronektin	MSCRAMMs	Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules
FnBPA	<i>Fibronectin-binding protein A</i>	MSSA	Methicillin-sensitiver <i>S. aureus</i>
FnBPB	<i>Fibronectin-binding protein B</i>	MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
g	Gramm	NEAT	<i>Near Iron Transporter</i>
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin	n	nano 10 ⁻⁹
h	Stunde(n)	NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
HA-MRSA	Hospital-Acquired Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>	NCBI	National Center for Biotechnology Information
HexNAc	<i>N</i> -acetyliertes Galaktosamin- bzw. Glucosamin-Monosaccharid-Einheit	nm	Nanometer
hla, hlb, hld	Gene, die für α -, β - und δ -Hämolysin kodieren	nM	nanomolar, ($\frac{\text{nmol}}{\text{L}}$)
IcaADBC	<i>Intercellular adhesion operon</i> , kodiert für Proteine der PIA-Synthese	N-terminal	aminoterminal
IcaR	<i>Intercellular adhesion locus Regulator</i> , Protein der PIA-Synthese	N-Terminus	Aminoterminus
IgG	Immunglobulin G	OD	optische Dichte
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
Isd	<i>Iron-regulated surface determinant protein</i>	ORF	Open reading frame
Kan^r	Kanamycin-resistent	p.a.	zur Analyse (per analysis)
kb	Kilobasenpaar(e)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
kDa	Kilo-Dalton	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
LB	Luria-Bertani	PBS	Phosphatgepufferte Saline
LPXGT	Sortase A Erkennungsstelle (Leucin-Prolin-Variabel-Threonin-Glycin)	PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
LR	Large Repeat	pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
LTA	Lipoteichonsäure	PIA	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesion</i>
m	milli 10 ⁻³	Pls	<i>Plasmin-sensitives Surface protein</i>
M	molar ($\frac{\text{mol}}{\text{L}}$)	PNAG	Poly- <i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>	PSM	Phenollösliche Moduline
		QS	quorum sensing
		rev	revers
		r	Radius (cm)
		RNA	Ribonukleinsäure

RNase I	RNA degradierendes Enzyme	SrtA	<i>Sortase A</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>	SrtB	<i>Sortase B</i>
RT	Raumtemperatur	s. u.	siehe unten
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	TAE	Tris-/Natriumacetat/EDTA
<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>	TBS	Tris-gepufferte Saline
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TE	Tris-EDTA
SERAM	Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules	TEMED	N,N,N'-Tetramethylethylen-diamin
SaeRS	Zweikomponenten-System	Tn	Transposon
Sar	<i>Staphylococcal accessory regulator</i>	TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
SasA/SraP	<i>S. aureus surface protein A, Serin-rich surface protein</i>	TSB	Tryptisch verdautes Soja-Medium (<i>tryptic soy broth</i>)
SasA-K	<i>S. aureus surface proteins A-K</i>	TSS	Toxic Shock Syndrom
SasC	<i>S. aureus surface protein C</i>	TSST-1	Toxic Shock Syndrom Toxin 1
SasE/IsdA	<i>S. aureus surface protein E; Iron-regulated surface determinant protein A</i>	U	Enzymeinheit (unit(s)); μmol umgesetztes Substrat pro min
SasI/IsdH	<i>S. aureus surface protein I; Iron-regulated surface determinant protein H</i>	u. a.	unter anderem
SasJ/IsdB	<i>S. aureus surface protein J; Iron-regulated surface determinant protein B</i>	ü. N.	über Nacht
SCCmec	Staphylococcal chromosome cassette <i>mec</i>	ÜNK	Übernachtkultur
SD	Serin-Aspartat	V	Volt
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Poly- acrylamidgelelektrophorese	v/v	Volumen/Volumen
Sdr	<i>Serine-aspartate repeat-containing protein</i>	Vn	Vitronektin
SDS	Natriumdodecylsulfat	vWF	Von Willebrand-Faktor
s	Sekunde	w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
SEC	Größenausschlusschromatogra- phie (<i>size exclusion chromatography</i>)	WTA	Teichonsäuren der Zellwand (<i>wall teichoic acids</i>)
SP	Signalsequenz	x	mal
SpA	<i>S. aureus Protein A</i>	YSIRK	Signalsequenz (Tyrosin-Serin- Isoleucin-Arginin-Lysin)
SPR	Surface plasmon resonance	z. B.	zum Beispiel
SR	Small Repeat	z. T.	zum Teil
		σ	Sigma
		$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
		μM	Mikromolar
		μm	Mikrometer
		Δ	Delta, ausgeschaltetes Gen
		3D	drei-dimensional

Zusammenfassung

Die Fähigkeit verschiedener Staphylokokkenspezies zur Bildung eines widerstandsfähigen Biofilms stellt eine enorme Herausforderung bei der Behandlung von Biofilm-assoziierten Infektionen dar. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Biofilmbildung ist deshalb eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention und Therapie. Das *Staphylococcus aureus surface protein C* (SasC) ist eines von vielen Oberflächenproteinen von *S. aureus* und vermittelt Aggregation und Biofilmbildung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das molekulare Funktionsprinzip von SasC genauer charakterisiert werden und homotypische und heterotypische Interaktionen der SasC-Subdomänen untersucht werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die funktionelle Domäne im N-Terminus lokalisiert ist. Dort finden sich neben einem LPXTG-Motiv, drei kleine (SR) und zwei große Repeats (LR) sowie eine FIVAR-Domäne.

Die SR konnten als vielversprechende Kandidaten für eine homotypische Interaktion identifiziert werden. *In vitro*-Interaktionsstudien mit gereinigten SasC-His-Fusionsproteinen der N-terminalen Subdomänen weisen darauf hin, dass SasC-His-1, in welchem zwei der drei SR exprimiert werden, eine stabile Interaktion mit sich selbst eingeht. Die Ergebnisse lassen aber ebenfalls darauf schließen, dass neben den SR ebenfalls die LR und möglicherweise auch die FIVAR-Domäne an der Vermittlung der SasC-abhängigen Interaktion beteiligt sind, da die rekombinant exprimierten LR Interaktionsverhalten zeigen. Dies bestätigten *in vivo*-Versuche mit *sasC*-Subklonen, bei welchen die Stärke der Biofilmbildung stark davon abhängig ist, welche Subdomänen exprimiert werden. Subklon 5, welcher nur die SR exprimiert, zeigt stark verringerten Biofilm, wohingegen Subklone, denen die SR komplett fehlen, noch einen starken Biofilm bilden. Dies könnte zudem darauf hinweisen, dass die strukturelle Orientierung von SasC an der Zelloberfläche eine wichtige Rolle bei der Interaktion spielt.

1 Einleitung

Staphylokokken wurden erstmalig 1884 von Rosenbach isoliert und beschrieben. Innerhalb der Gram-positiven Bakterien gehören sie zur Familie der *Staphylococcaceae* in der Ordnung der *Bacillales* [1]. Ihre kokkenförmigen Einzelzellen haben einen Durchmesser von ca. 0,8 µm und treten in Zellclustern, -paaren und -ketten auf. Sie wachsen fakultativ anaerob und sind Katalase-positiv. Staphylokokken bilden keine Sporen und weisen einen geringen GC-Gehalt in der chromosomalen DNA auf [2]. Bis 2014 wurden 47 Spezies und 23 Subspezies beschrieben [3]. Innerhalb der Gattung werden zwei wesentliche Spezies unterschieden: Koagulase-positive Staphylokokken (CoPS), wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und Koagulase-negative Staphylokokken (CoNS) wie *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). Staphylokokken besiedeln Haut und Schleimhäute und sind die häufigste Ursache für nosokomiale Infektionen und Infektionen assoziiert mit medizinischen Implantaten [4]. Etwa 65 % dieser Infektionen sind mit Biofilmbildung assoziiert [5].

1.1 Staphylokokken

1.1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus besitzt eine charakteristische gelb-goldene Pigmentierung (*aureus*, lat.: golden), welche von dem Carotinoid Staphyloxanthin hervorgerufen wird [6]. Das Genom von *S. aureus* ssp. *aureus* ist 2,9 Mbp groß, hat einen GC-Gehalt von 32 % und kodiert für 2550 Gene, von welchen 44 für Antibiotikaresistenzen annotieren und 13 speziell für Methicillinresistenz [7]. *S. aureus* ist ubiquitär verbreitet [8] und kolonisiert bei ca. 20 % der gesunden Erwachsenen permanent und bei bis zu 50 % der Gesamtbevölkerung zumindest vorübergehend die Schleimhäute des Nasen-Rachenraums [4, 9]. *S. aureus* exprimiert eine Vielzahl von Faktoren, wie Adhäsine, extrazelluläre Enzyme und Toxine. Diese bilden die Grundlage der Pathogenität und machen *S. aureus* virulenter als Koagulase-negative Staphylokokkenstämme, was in einer hohen Morbidität und Mortalitätsrate resultiert [10]. So besitzt *S. aureus* 20 Gene für Oberflächen-verankerte Adhäsine, wohingegen beispielsweise für *S. epidermidis* RP62A nur 12 solcher Gene bekannt sind [11]. Bei Infektionen reicht das Spektrum von leichten oberflächlichen Hautinfektionen bis hin zu lebensgefährlicher Endokarditis, Osteomyelitis, Lungenentzündung und Sepsis [12, 13].

Oft sind nosokomiale Staphylokokken-assoziierte Infektionen auf Methicillin-resistente *S. aureus*

(MRSA) zurückzuführen. Im Jahr 2015 waren 10-12% der getesteten invasiven Staphylokokkenstämme Methicillin-resistent [14]. Definitionsgemäß sind diese Stämme resistent gegenüber allen Antibiotika, welche eine β -Lactam-Struktur besitzen.

Zu diesen gehören die Penicilline, Carbapeneme, Cephalosporine und Monobaktame [15]. MRSA-Stämme sind durch den Besitz einer SCC_{mec}-Kassette (*Staphylococcal Chromosome Cassette* Typ I-III), welche die Multiresistenzen vermittelt, charakterisiert und können in CA-MRSA (*Community-acquired-MRSA*) und HA-MRSA (*Hospital-acquired-MRSA*) unterschieden werden, die sich genotypisch unterscheiden und unterschiedliche Erkrankungen auslösen [16]. Zudem scheint die steigende Anzahl von CA-MRSA-Infektionen von ursprünglich HA-MRSA-Klonen verursacht zu werden [14]. In Deutschland waren 2015 11,2% der getesteten *S. aureus*-Isolate methicillinresistent [17]. Mittlerweile sind viele Isolate multiresistent gegenüber den meisten Antibiotikaklassen (Tetrazykline, Chinolone, Makrolide, Aminoglykoside und Sulfonamide). Vancomycin, ein Antibiotikum der *third line* aus der Gruppe der Glykopeptide ist häufig das einzig wirksame Therapeutikum. Allerdings konnten bereits Vancomycin-resistente *S. aureus* isoliert werden [18]. Solche spezifischen Resistenzen werden durch chromosomale oder plasmidkodierte Mechanismen vermittelt.

Zusätzlich besitzen Staphylokokken oft nicht-spezifische Resistenzmechanismen wie die Fähigkeit zur Biofilmbildung [4]. Die Widerstandsfähigkeit eines Biofilms gegenüber Antibiotika-Therapien führt oft zur Ausbreitung der Bakterien im Körper und ist eine der Hauptursachen, weswegen Implantate häufig wieder aus dem Körper entfernt werden müssen [4, 18].

S. aureus sekretiert zudem eine Vielzahl von Toxinen. Das *Toxic Shock-Syndrom* (TSS) wird von einem Superantigen, dem *Toxic shock syndrome toxin* (TSST) ausgelöst, indem es die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-2 und TNF- α stimuliert [10]. Weiterhin gehören zu den von *S. aureus* sekretierten Toxinen die Hämolyse (Hla), wie das porenbildende Membranschädigende α -Toxin [19] und Leukotoxine, welche weiße Blutkörperchen schädigen (Neutrophilenlyse) [20]. Die Freisetzung von α -Toxin führt zur Entstehung eines sog. Hämolysehofes um die Kolonien, wenn *S. aureus* auf bluthaltigem Nährboden angezogen wird. Andere Faktoren inhibieren das angeborene Komplementsystem (C3-Faktor) und dadurch die Erkennung durch das Immunsystem [10]. *S. aureus* produziert zwei Koagulasen (Koagulase-positiv): die Staphylokoagulase und das von Willebrand-Faktor-Bindeprotein. Nach Bindung an Prothrombin des Wirts konvertiert der aktive Komplex Fibrinogen zu Fibrin und es entstehen Fibrinklumpen auf der Zelloberfläche von *S. aureus*. Die Verklumpung verhindert die Phagozytose und begünstigt die Anheftung an abiotische Oberflächen [21–23]. Alle diese Mechanismen schützen die Bakterien vor der Wirkung von Antibiotika und dem Immunsystem des Wirtes [24], wodurch sich akute zu persistierenden Infektionen entwickeln können [25].

1.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

Der Koagulase-negative *S. epidermidis* ist das häufigste Isolat aus Implantat-assoziierten Infektionen [25]. Als opportunistisches Pathogen ist *S. epidermidis* Bestandteil der normalen Haut- und Schleimhautflora, kann aber unter bestimmten Bedingungen auch in gesunden Menschen chronische Infektionen hervorrufen und von einer reinen kolonisierenden Lebensweise zu einer Invasiven wechseln [26, 27]. Im Rahmen von Operationen, z. B. bei der Implantierung von medizinischen Geräten wie künstlichen Herzklappen, Venenkathetern oder orthopädischen Implantaten, kann *S. epidermidis* leicht durch die Wunde in den Körper gelangen und dort die abiotischen Oberflächen der Implantate besiedeln [26–28]. Zur Risikogruppe gehören immunsupprimierte Personen, Krebs-, Transplantations- und AIDS-Patienten sowie Neugeborene [4, 25]. *S. epidermidis* besitzt die Fähigkeit zur Biofilmbildung, aber das Pathogenitätspotential ist geringer als jenes von *S. aureus*, da *S. epidermidis* weit weniger Virulenzfaktoren besitzt [26]. Aus diesem Grund wurden CoNS lange Zeit als apathogen angesehen [29], sind heutzutage jedoch eine der Hauptursachen nosokomial erworbener Implantat-assoziiierter Infektionen [26]. Auch von *S. epidermidis* sind bereits Methicillin-, Chinolon- und Glykopeptid-resistente Isolate bekannt [30, 31].

1.1.3 Weitere Staphylokokkenstämme

Neben *S. aureus* und *S. epidermidis* existieren weitere kommensale Staphylokokkenstämme, welche pathogen werden können, sobald die schützende Barriere der Haut oder Schleimhaut verletzt wird oder das Immunsystem des Betroffenen supprimiert ist. Sie kolonisieren verschiedene Bereiche der Haut und Schleimhaut, wobei jede Spezies seine eigene Nische besitzt [32]. Zu diesen gehören u. A. *S. hominis* als zweithäufigster Vertreter der CoNS auf der Haut; *S. haemolyticus*, welcher Katheter-assoziierte Harnwegsinfektionen und Wundinfektionen verursachen kann; *S. lugdenensis*, der schwere Infektionen wie Osteomyelitis und Endokarditis auslöst und *S. saprophyticus*, der Zystitis und Harnwegsinfektionen hervorrufen kann. Biofilm-assoziierte Infektionen treten jedoch viel seltener auf [3, 4].

Ebenfalls zu den CoNS gehört der nicht-pathogene *S. carnosus* TM300, dessen Genom keinerlei mobile Elemente oder Transposons enthält. Er besitzt keine Plasmide und zeichnet sich durch eine hohe Genomstabilität aus. Das Fehlen von typischen Adhäsionsmolekülen, Toxinen und genetischen Faktoren für die Biofilmbildung macht *S. carnosus* TM300 zu einem geeigneten Laborstamm für die Untersuchung dieser Pathogenitätsfaktoren [33].

1.2 Zellwandaufbau Gram-positiver Bakterien

Die Zellwand dient als Verankerungspunkt für Polysaccharide, Proteine und Teichonsäuren [34]. Zellwand-assoziierte Proteine wie die Autolysin/Adhäsine sind an Zellteilung und Antibiotika-induzierter Zellyse beteiligt [35, 36] während Mitglieder der zellwandgebundenen MSCRAMM-Proteinfamilie u.a. Biofilmbildung vermitteln. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien besteht aus einer dicken Peptidoglykanschicht, dem Mureinsacculus, der eine Dicke von 20-100 nm annehmen kann [37]. Der Mureinsacculus schützt die Zelle vor osmotischem Stress, extrazellulären Hydrolasen und anderen membranschädigenden Substanzen [38]. Die Peptidoglykanschicht in Staphylokokken ist ein Polymer aus Zuckerketten, welche zu 95 % über Peptidbindungen miteinander quervernetzt sind und ein drei-dimensionales Netzwerk bilden [39]. Die Glykanstränge entstehen durch Polymerisierung von sich wiederholenden β -1,4-verknüpften Disaccharid-Einheiten aus *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und sind stark modifiziert, was in einem geringen Anteil an freien Carboxylgruppen resultiert [40]. Die Zellwand ist eine dynamische Struktur, die durch spezifische Peptidoglykanhydrolasen einem permanenten Zellwand-*Turnover* (Synthese - Abbau) unterworfen ist [41]. In der Zellwand verankerte Teichonsäuren können ebenfalls als Virulenzfaktoren fungieren, indem sie über physikochemische Wechselwirkungen an Oberfläche binden [42, 43]. Sie verleihen *S. aureus* bei neutralem pH eine negative Nettoladung [44].

Für den Einbau in die Zellwand benötigen Proteine ein LPXTG-(Leu-Pro-X-Thr-Gly)-Motiv, eine C-terminale hydrophobe Domäne und einen geladenen Rest. Durch zellwandgebundene Sortasen erfolgt die kovalente Verankerung des Proteins in der Zellwand [37]. Klinische *S. aureus*-Stämme tragen zwei Sortasegene - SrtA und SrtB. Das LPXTG-Motiv ist Substrat der SrtA, wohingegen die SrtB das NPQTN-Sortiersignal von IsdC-Proteinen erkennt [45]. Bei den LPXTG-Proteinen wird während der Reaktion die Peptidbindung zwischen dem Threonin (T)- und dem Glycinrest (G) des LPXTG-Motivs gespalten, wobei X eine beliebige Aminosäure repräsentiert, mit Ausnahme von Prolin. Die freiwerdende Carboxylgruppe des Threonins wird daraufhin kovalent an die Aminogruppe einer Peptidoglykan-Querverbindung geknüpft [37]. In Abb. 1.1 ist der Zellwandaufbau Gram-positiver Bakterien am Beispiel von *S. aureus* exemplarisch dargestellt.

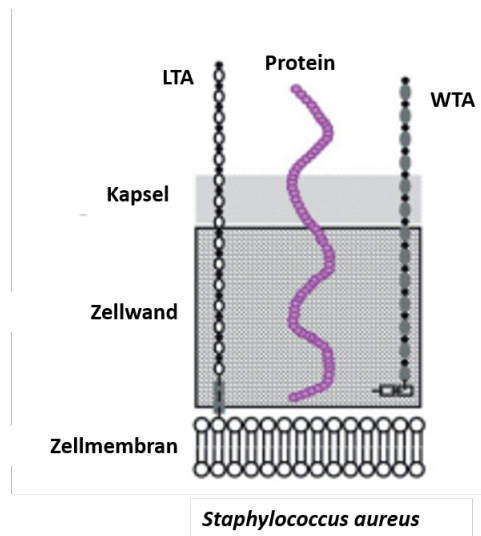


Abb. 1.1: **Zellwandaufbau Gram-positiver Bakterien.** Die Zellwand von *S. aureus* besteht aus einer dicken Peptidoglykanschicht, welche als Verankerungspunkt für Polysaccharide, Teichonsäuren und Proteine dient. Abbildung adaptiert nach [34].

1.3 Biofilmbildung

In einem Biofilm sind die Bakterien in einer drei-dimensionalen Matrix eingebettet, welche aus bakteriellen Polysacchariden, Proteinen, Zellwand-verankerten Teichonsäuren, extrazelluläre DNA (eDNA) und Wirtsproteinen besteht. In dieser Umgebung sind die Bakterien sowohl vor dem Immunsystem des Wirtes als auch vor der Behandlung mit Antibiotika geschützt, da die Matrix eine physikalische Diffusionsbarriere darstellt [24, 46]. Zudem befinden sich die Zellen in einem Biofilm in einem Ruhestadium mit geringem Nährstoffverbrauch und reduzierter Wachstumsrate [47], was die Aufnahme und Wirkung von β -Lactam-Antibiotika beeinträchtigt [48].

Die Biofilmbildung ist ein multifaktorieller Prozess aus einer initialen Anheftungsphase (*attachment*), einer Akkumulationsphase, gefolgt von einer Reifungsphase (*maturation*), in welcher durch interzelluläre Adhäsion und weiterer Aggregation die drei-dimensionale Biofilm-Struktur weiter wächst und einer finalen Ablösungsphase (*detachment*), in welcher die Bakterien wieder freigesetzt werden [49, 50]. In Abbildung 1.2 sind die einzelnen Stadien der Biofilmbildung dargestellt.

Ein kritischer Schritt der Biofilmbildung ist die Besiedelung biotischer oder abiotischer Oberflächen. Die Anheftung planktonischer Zellen wird von einer Vielzahl spezifischer molekularer Faktoren wie proteinogener und nicht-proteinogener adhäsiver Moleküle vermittelt. Diese binden Komponenten der extrazellulären Matrix und Wirts-Plasmaproteine. Adhäsion an abiotische Oberflächen aus Plastik oder Metall, wie sie in medizinischen Implantaten zu finden sind, wird durch die physikochemischen Eigenschaften des Materials (z.B. Ladung) und Oberflächenproteine wie Aap,

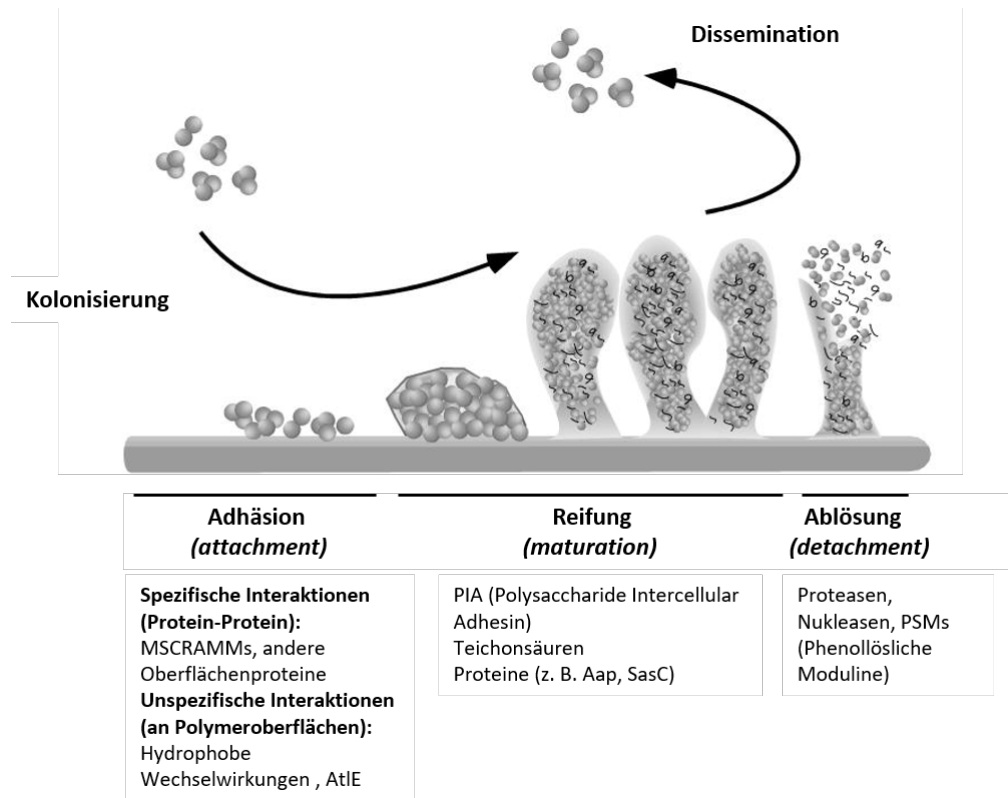


Abb. 1.2: **Stadien der Biofilmbildung.** Biofilme entstehen durch die Besiedelung von biotischen und abiotischen Oberflächen. Die Adhäsion kann spezifisch über Protein-Protein-Interaktionen oder unspezifisch über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen. Nach der Akkumulation in eine mehrschichtige Zellstruktur kommt es während der Reifungsphase zu Aggregation durch adhäsive Polysaccharide und Proteine. Bei der Ablösung werden einzelne Zellen aus dem Biofilm freigesetzt. Abbildung adaptiert nach [4].

AtIA/AtIE oder Teichonsäuren vermittelt [4, 51]. Die Interaktion kann über unspezifische elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte und Oberflächenspannung erfolgen [24, 52, 53]. Polymeroberflächen werden innerhalb kürzester Zeit nach der Implantation von Wirtsproteinen der extrazellulären Matrix (z. B. Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, Kollagen, Elastin) bedeckt, die als spezifische Rezeptoren (biotische Oberfläche) für Oberflächenproteine dienen und für eine erfolgreiche Kolonisierung erforderlich sind [4, 35].

Die Reifungsphase ist charakterisiert durch starke Aggregation der Bakterien innerhalb der Biofilmmatrix, welche durch adhäsive Polysaccharide wie dem *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA/PNAG) und Protein-Protein-Interaktionen vermittelt wird [52, 54]. Die Phase der Ablösung (*detachment*) ist essentiell für die Dissemination der Zellen und kann durch das Ablösen einzelner Zellen oder ganzer Zellcluster, v.A. von den oberflächlichen Regionen des Biofilms, geschehen. Die Biofilmstruktur wird durch mechanische Kräfte, dem Aussetzen der Synthese von Biofilm-bildendem Material oder enzymatischen Abbau durch Proteasen, Nukleasen und sog. phenollösliche Moduline (PSM) geschwächt [4].

Neben den oben beschriebenen Mechanismen von Adhäsion und Akkumulation spielen auch sekretierte hämolytische, d.h. Erythrozyten lysierende Toxine, wie α -Toxin und β -Toxin eine wichtige Rolle bei der interzellulären Interaktion. Das α -Toxin wird vom *hla*-Gen codiert und hauptsächlich vom *sae*-System reguliert [55]. Es führt zu Zellyse, indem es zu einer heptameren Transmembranpore innerhalb der eukaryontische Zellmembran oligomerisiert [56–58]. Die Expression von α -Toxin korreliert mit der Schwere einer *S. aureus*-Infektion, da es ein Überleben der Bakterien in Neutrophilen ermöglicht, die Beseitigung dieser durch Makrophagen (insbesondere durch alveolare Makrophagen der Lunge) verhindert und es *S. aureus* damit erleichtert Gewebe der Lunge zu kolonisieren [55]. β -Toxin hat eine Sphingomyelinase-Aktivität und wird nach der exponentiellen Wachstumsphase vom *agr*-Locus reguliert. In Gegenwart von eDNA kommt es zur Oligomerisierung der β -Toxin-Moleküle, wobei die Verlinkung jedoch nicht durch DNA-Moleküle vermittelt wird. *In vitro* kommt es zur Bildung einer unlöslichen Nukleoproteinmatrix, welche mutmaßlich das Gerüst bildet, in welchem der Biofilm entsteht [55].

1.4 Kovalent gebundene Oberflächenmoleküle von Staphylokokken

Staphylokokken exprimieren eine Vielzahl von Oberflächenproteinen, die als Virulenzfaktoren an diversen Funktionen wie Adhäsion, Internalisierung, Umgehung des Immunsystems und Biofilmbildung beteiligt sind [59]. Einige Proteine werden nur unter Eisen-limitierenden Bedingungen exprimiert [60, 61], andere sind abhängig von der Wachstumsphase und werden beispielsweise nur während der exponentiellen oder der stationären Phase exprimiert [62, 63]. Die Oberflächenmo-

leküle werden anhand ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in kovalent gebundene, d.h. in der Zellwand-verankerte Moleküle und in nicht-kovalent gebundene Moleküle klassifiziert, die über ionische oder hydrophobe Interaktion mit der Oberfläche assoziiert sind [59]. Insgesamt wurden mittlerweile mehrere Oberflächenproteine in Staphylokokken identifiziert, welche Akkumulation *ica*-unabhängig vermitteln [59] und einen PIA-unabhängigen Biofilm bilden [64].

Die in der Peptidoglykanstruktur verankerten Oberflächenproteine (CWA) weisen strukturelle Gemeinsamkeiten auf [59]. Dazu gehören ein N-terminales Sortiersignal, welches den Transport des Vorläufermoleküls über den Sec-Signalweg durch die Peptidoglykanschicht ermöglicht [65], eine exponierte ligandenbindende-Domäne, eine hydrophobe zellwand- und membrandurchspannende Domäne, oft mit einer Repeat-Struktur, ein konserviertes C-terminales LPXTG-(bzw. NPQTN)-Motiv und einen positiv geladener Rest [4, 11, 45, 66]. Die Ligandenbindedomäne im N-terminalen Bereich (auch als A-Region bezeichnet) weist bei vielen dieser Proteine eine domänenartige Organisation aus ca. 500 Aminosäuren auf [67]. Eine daran anschließende Repeat-Struktur kann verschiedene Funktionen vermitteln, wie die korrekte Orientierung des Proteins an der Zelloberfläche (SD-Repeats der Sdr-Proteine [68]) oder Ligandenbindung (D-Repeats von FnBPA/FnBPB [69]).

In Abbildung 1.3 ist die Klassifikation der CWAs aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften schematisch dargestellt. *S. aureus* exprimiert bis zu 24 verschiedene dieser CWAs, wohingegen beispielsweise *S. epidermidis* und *S. lugdenensis* weniger dieser CWAs besitzen [70, 71]. Die Oberflächenproteine können ringförmig über die Zelloberfläche verteilt oder punktförmig lokalisiert sein. Zu ersten Gruppe gehören Oberflächenproteine wie ClfA, SpA, FnBPB, SdrC und SdrD. Diese beinhalten in der Signalsequenz ein YSIRK-G/S-Motiv. Fehlt dieses, wie bei SasA, SasD, SasF und SasK ist die Lokalisierung auf der Oberfläche punktförmig begrenzt [72]. Die in Abb. 1.3 dargestellten Proteinfamilien werden in den nachfolgenden Abschnitten separat genauer erläutert.

1.4.1 MSCRAMM-Proteinfamilie

Die meisten der CWA-Proteine gehören zur Familie der MSCRAMM-Proteine (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) [73]. Foster *et al.* klassifizieren die MSCRAMM-Proteinfamilie über einen gemeinsamen Liganden-Bindemechanismus, der von zwei Subdomänen der A-Region vermittelt wird. Diese N-terminale Liganden-Bindedomäne (A-Region) besteht aus einzelnen Subdomänen, sog. N-Domänen, und weist eine tandem-ähnliche IgG-Struktur (*tandem-like IgG-like fold*) auf [59]. Teilweise folgt der A-Region eine B-Region aus β -Faltblatt-Domänen [74], welche über ihre sterische Struktur für eine Lokalisierung der ligandenbindenden A-Domäne dicht an der Zelloberfläche sorgt [59].

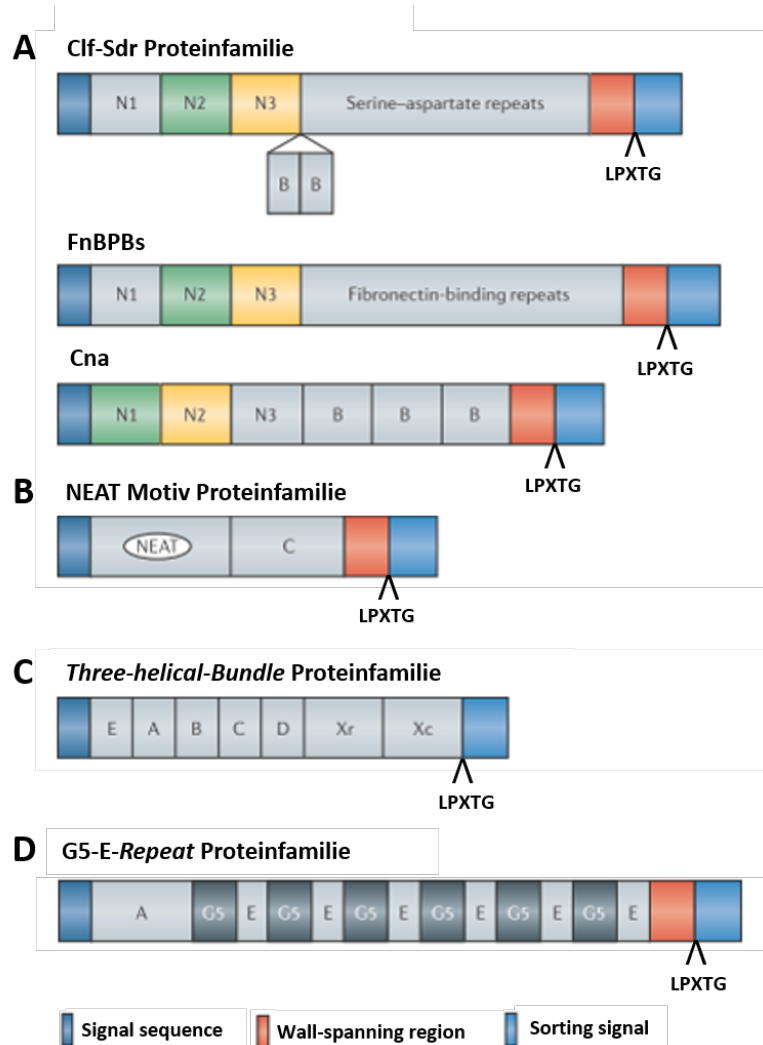


Abb. 1.3: **Klassifizierung der zellwandgebundenen Proteine nach strukturellen Motiven.** CWAs sind charakterisiert durch ein N-terminales Sortiersignal, eine zellwanddurchspannende Domäne und ein C-terminales LPXTG-Motiv. **A MSCRAMM.** Die Subdomänen N1, N2 und N3 bilden *IgG-like folds* aus, der nach dem „*dock-lock-latch*“-Mechanismus den oder die Liganden bindet. Der A-Domäne folgen eine variable Anzahl von (SD-)Repeats. Teilweise sind zusätzliche B-Repeats vorhanden. **B NEAT-Motiv-Proteine.** Isd-Proteine binden eisenhaltige Proteine mittels einer NEAT-Domäne. **C Three-Helical-Bundle-Proteine.** Protein A besitzt 5 tandem-ähnliche Repeats, gefolgt von einer Xr und einer Xc-Region. **D G5-E-Repeat-Proteine.** Bei den Proteinen Aap und SasG bestehen die B-Repeats aus G5-E-Repeats. Durch proteolytische Spaltung wird die A-Domäne entfernt und die G5-E-Domänen vermitteln die interzelluläre Adhäsion. Abbildung adaptiert nach [51, 59].

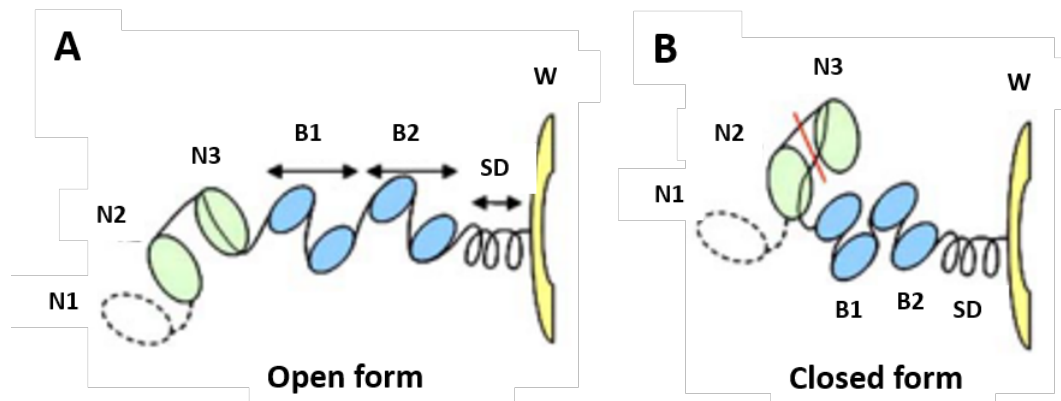


Abb. 1.4: **Hypothetisches Schema der Interaktion von SdrG mit Fibrinogen.** **A Offene Form.** In der offenen (Apo-)Form ist kein Ligand von N2 und N3 gebunden. Die B- und SD-Repeats strecken das Protein von der Zellwand (W) weg. **B Geschlossene Form** Binden N2 und N3 einen Liganden (rote Linie), geht der Komplex in die geschlossene Form über und der C-Terminus der N3-Domäne legt sich über den Liganden. Die B-Repeats zeigen eine kompaktere Konformation. Abbildung adaptiert nach [77].

Die molekularen Mechanismen der Ligandenbindung der MSCRAMMs wurden anhand der Interaktion von SdrG mit Fibrinogen zum ersten Mal beschrieben [75]. Dabei bindet (*dock*) der Ligand (hier die N-terminale β -Kette von Fg) [76] in der hydrophoben Furche zwischen den Domänen N2 und N3 der A-Region des Apo-Proteins, was zu einer Konformationsänderung führt. Der C-Terminus der N3-Domäne legt sich wie ein Riegel über die Furche und schließt das gebundene Fg-Molekül ein (*lock* und *latch*). Es entsteht ein stabiler MSCRAMM-Ligand-Komplex [75, 77]. Die Interaktion des Liganden mit der N2-Domäne ist vorwiegend hydrophober Natur, wohingegen die Interaktion von Fg mit N3 zusätzlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. Wie N2 und N3 auf der Zelloberfläche räumlich angeordnet sind ist noch ungeklärt [76, 77]. In Abb. 1.4 ist ein hypothetisches Modellschema der Interaktion von SdrG mit Fibrinogen über den „*dock-lock-latch*“-Mechanismus dargestellt.

Der „*dock-lock-latch*“-Mechanismus wird als gemeinsames Prinzip der Ligandenbindung innerhalb der MSCRAMM-Proteinfamilie angesehen [74, 77].

Fibronectin-bindende Proteine FnBPA und FnBPB

Die Fibronectin (Fn)-Bindende Proteine FnBPA und FnBPB von *S. aureus* werden von den Genen *fnbA* bzw. *fnbB* [78] kodiert. Die Fn-Bindeaktivität ist in einer hochkonservierten C-terminalen Domäne lokalisiert, die aus 4 sich wiederholenden 40-Aminosäuren langen Repeats D1-D4 besteht, wobei jedes Repeat über einen Tandem- β -zipper-Mechanismus mit einem Fn-Molekül interagiert [69]. Die Aminosäuresequenzen der Liganden-bindenden A-Domäne von FnBPA und FnBPB sind

zu 40 % identisch [79] und bestehen aus drei Subdomänen (N1, N2, N3) [80], wobei N2 und N3 sich zwischen FnBPA und FnBPB stark unterscheiden. Die Expression von *fnbA* bzw. *fnbB* findet hauptsächlich während der exponentiellen Wachstumsphase statt [81]. Die A-Domänen vermitteln Adhäsion an Oberflächen durch Bindung an Fibronectin, immobilisiertes Elastin und Fibrinogen [82, 83] und führen zur Aktivierung von Thrombozyten [84]. Im Gegensatz zur Ligandenbindung, findet die FnBP-abhängige Biofilmbildung nicht nach dem „*dock-lock-latch*“-Mechanismus statt [75, 82, 85]. Es konnte gezeigt werden, dass die FnBP-vermittelte Biofilm-Akkumulation zinkabhängig [81], die Bindung an Fn über Tandem β -*zipper* dagegen zinkunabhängig stattfindet [69]. Beide Funktionen werden über verschiedene Domänen und somit über verschiedene Mechanismen vermittelt [81, 86]. Die FnBP-vermittelte Akkumulation findet möglicherweise über homotypische Interaktionen zwischen den N2N3-Subdomänen benachbarter Zellen, über Anbindung an einen Rezeptor auf der Oberfläche oder via eines Brückenmoleküls statt [81].

Die FnBPs wirken nicht nur als Adhäsine, sie vermitteln ebenfalls die Internalisierung von *S. aureus* in Wirtszellen. Dabei dient Fn als Brückenmolekül und $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin als Rezeptor auf der Wirtszellmembran. Die Bindung an diesen Rezeptor löst eine Signalkaskade aus, welche zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und zur Internalisierung der Bakterienzelle führt [84, 87].

Serin-Aspartat-Repeat-Proteinfamilie

Clumping Factor A und Clumping Factor B Ebenfalls zu den klassischen Vertretern der MSCRAMM-Proteinfamilie gehören die Fibrinogen-bindenden Proteine (Fg-bindende Proteine) *Clumping factor A* (ClfA) und *Clumping factor B* (ClfB), die von *clfA* und *clfB* kodiert werden [88, 89]. ClfA ist das wichtigste Fg-bindende Protein in *S. aureus* [76] und führt zur Verklumpung der Zellen in humanem Plasma [89, 90]. Fibrinogen, ebenso wie Fibronectin, bedeckt bereits nach kurzer Zeit die Oberflächen medizinischer Implantate [91] und begünstigt eine schnelle Besiedelung durch *S. aureus*.

Die *Clumping*-Faktoren sind wichtige Virulenzfaktoren, da sie die Adhäsion an immobilisiertes Fg, an Blutgerinnsel und Biomaterialien, welche mit Plasmaproteinen beschichtet sind, begünstigen. Sie wirken antiphagozytotisch und schützen *S. aureus* so vor Opsonisierung durch das Immunsystem [92]. ClfA bindet den C-Terminus der γ -Kette und ClfB die α - und die β -Kette von Fibrinogen [88, 89]. Die Sequenzen der A-Domänen von ClfA und ClfB sind nur zu 26 % identisch, aber beide weisen signifikante Sequenzhomologien zu der N-terminalen A-Region von FnBPA auf [79]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass FnBPA ebenfalls Fg-Bindeaktivität hat [79]. ClfA und ClfB können Plättchenaggregation vermitteln [90] und ClfA kann zudem direkt an Plättchen binden, indem es mit dem *platelet membrane receptor* interagiert [93]. ClfB bindet auch an humane

abgestoßene nasale Epithelzellen mittels Cytokeratin 10, was darauf schließen lässt, dass dieser Faktor besonders für die nasale Kolonisierung durch *S. aureus* wichtig ist [94].

Die Expression von ClfA und ClfB ist wachstumsphasenabhängig. So wird ClfB nur während der frühen exponentiellen Phase gebildet, kann jedoch in der späten exponentiellen oder stationären Phase nicht mehr nachgewiesen werden [51]. Hier wird die N1-Subdomäne von einer zelleigenen Metalloprotease abgespalten. ClfB verliert dadurch die Fähigkeit zur Ligandenbindung [63]. Die Ligandenbindung der A-Regionen von ClfA und ClfB erfolgt durch den „*dock-lock-latch*“-Mechanismus [76] und wird durch externe Faktoren, wie z.B. bivalente Kationen (Ca^{2+} , Mn^{2+}) reguliert [73]. Strukturanalysen haben gezeigt, dass die ligandenbindende A-Region von ClfA aus drei Domänen (N1, N2, N3) besteht [95], wovon jede ein IgG-ähnliche Faltung annimmt [80]. N1 weist eine sehr hydrophile Aminosäurezusammensetzung und eine längliche Sekundärstruktur [67]. Für die Bindung von Fg sind aber nur N2 und N3 notwendig [76, 92]. Zwischen der A-Region und der zellwanddurchspannenden Domäne befinden sich eine Anzahl von SD-Repeats [59].

In *S. aureus* vermitteln mindestens fünf Fg-bindende Proteine und mehrere weitere Adhäsion [59].

Serin-Aspartat-Repat-Proteine Die Sdr-Proteine SdrC, SdrD und SdrE aus *S. aureus*, sowie SdrF, SdrG und SdrH aus *S. epidermidis* sind durch zusätzliche sog. B-Repeats charakterisiert, die eine β -Faltblatt-Struktur annehmen und sich zwischen den SD-Repeats und der A-Domäne befinden [59, 74, 96]. Die SD-Repeats strecken die A-Region von der Zelloberfläche weg [68]. Innerhalb der B-Repeats befindet sich ein Ca^{2+} -Bindemotiv (EF-Hand), was bei Bindung von Kalzium zur Ausbildung starrer länglicher Strukturen führt [97]. Strukturell und funktionell ähneln die Sdr-Proteine den Fg-bindenden Proteinen ClfA und ClfB [90, 98]. Für die Interaktion von SdrG mit Fg wurde erstmalig der „*dock-lock-latch*“-Mechanismus beschrieben [75, 77, 99]. SdrG bindet den N-Terminus der β -Kette von Fg, was die Thrombin-Schnittstelle verdeckt und für die anti-coagulierende Aktivität von SdrG verantwortlich ist. Die Thrombin-vermittelte Freisetzung von Chemokinen, die Neutrophile anlocken, wird inhibiert und das Überleben von *S. aureus* begünstigt [75, 99]. SdrE induziert Plättchenaggregation und bindet den Komplementfaktor H [100], während SdrC und SdrD Adhäsion an humane abgestoßene nasale Epithelzellen vermitteln [90, 98]. Die Expression von SdrC auf der Oberfläche vermittelt eine hoch-affine und spezifische Adhäsion an β -Neurexin, welches auf der Oberfläche von Säugerzellen exprimiert wird [74]. Für die B-Repeats von SdrF konnte eine Bindung an Kollagen bereits nachgewiesen werden [101].

Eine ähnliche Organisation wie die Sdr-Proteine hat das *Staphylococcus aureus surface protein A* (SasA). Innerhalb der N-terminalen A-Region finden sich hier drei unabhängig voneinander gefaltete Subdomänen (N1, N2, N3) [67].

Bone Sialoprotein-Bindeprotein Bbp Das *Bone Sialoprotein-Bindeprotein* (Bbp) hat Ähnlichkeiten zu SdrC, SdrD und SdrE [102] und konnte aus Knochen- und Gelenksinfektionen mit *S. aureus* isoliert werden. Es bindet Fg [103] und interagiert mit dem *Bone Sialoprotein*, welches in der extrazellulären Matrix von Knochen und Zähnen vorkommt. Es besitzt ebenfalls die für diese Untergruppe charakteristischen zusätzlichen B-Repeats zwischen der A-Region und den SD-Repeats. Die zusätzlichen B-Repeats der Sdr-Proteine und des Bbp bilden kalziumabhängig [97] eine starre längliche Struktur aus, welche die A-Domäne von der Zelloberfläche entfernt exponiert und möglicherweise an der Ligandenbindung beteiligt ist [59].

Collagen-Bindeprotein Cna Das Collagen-Bindeprotein (Cna) unterscheidet sich strukturell von den anderen MSCRAMMs, da hier die N1- und N2- Domänen der A-Region eine IgG-ähnliche Faltung aufweisen und die Ligandenbindung über einen sog. *Collagen hug* erfolgt; einer Variante des „dock-lock-latch“-Mechanismus, der sich vom Mechanismus für ClfA oder SdrG unterscheidet [76, 104]. Bei Cna ist die A-Domäne durch eine variable Anzahl von B-Repeats von der zellwand-durchspannenden Domäne getrennt [59], welche die Liganden-bindende Domäne möglicherweise von der Zellwand wegstrecken [105]. Cna bindet neben Kollagen auch das Komplementprotein C1q, was die Opsonisierung von *S. aureus* durch das Komplementsystem verhindert [106].

1.4.2 G5-E-Repeat-Proteinfamilie

Diese Proteinfamilie ist durch tandemartig angeordnete sog. G5-E-Repeats charakterisiert, die die einzelnen B-Repeats voneinander trennen und eine β -triple-helix- β -ähnliche Struktur einnehmen [59]. Die aus 78 Aminosäuren bestehenden G5-Subdomänen sind wiederum durch Sequenzen von 50 Aminosäuren (E-Regionen) getrennt [107, 108]. G5-Domänen finden sich in enzymatisch aktiven Domänen und sind in der Vermittlung der Substratspezifität und korrekten Ausrichtung der Proteine für die Liganden- oder Cofaktorbindung beteiligt [109].

Accumulation associated protein Aap und sein Homolog SasG Das Oberflächenprotein *Accumulation associated protein* (Aap) aus *S. epidermidis* und sein Homolog, das *S. aureus surface protein G* (SasG) vermitteln PIA-unabhängige Biofilmbildung [46, 64, 110, 111]. Aap ist essentiell für das akkumulative Wachstum während der Biofilmbildung [111] und bildet stäbchenförmige fibrilläre Strukturen aus, die bis zu 120 nm über die Zelloberfläche hinausragen [108, 110, 112, 113]. Die ligandenbindende A-Region von Aap/SasG vermittelt Adhäsion an abgestoßene nasale Epithelzellen, was eine Beteiligung während der Besiedelung von Nasenhöhlen und Haut vermuten lässt [110, 114]. Die Anheftung planktonischer Zellen über Aap/SasG wird durch die N-Domänen

der A-Region vermittelt [115]. Zur Initiierung der Akkumulation wird Aap nahe dem C-Terminus der A-Domäne proteolytisch gespalten [64], während SasG innerhalb der B-Region prozessiert wird. Nach Abspaltung der A-Domäne verbleiben die B-Domänen an der Oberfläche [116]. Die Expression von SasG in *S. aureus* SH1000 führt nicht zur Verstärkung der Adhäsion an Polystyroloberflächen, sondern zu verstärkter Aggregation. Staphylokokken, welche nur die B-Repeats exprimieren, können noch einen Biofilm ausbilden, wird jedoch nur die A-Region exprimiert, so verlieren sie diese Fähigkeit [116].

Die interzelluläre Adhäsion wird von 5-17 B-Repeats vermittelt [64, 116], die bei Aap/SasG von G5-E-Repeats voneinander getrennt sind [59]. Die A-Domäne von SasG ist zu 59% zur A-Region von Aap und zu 52% zur A-Region von Pls, die B-Domäne zu 60-67% zu Aap und zu 65% zu Pls identisch [114]. Die Aminosäuresequenzen der G5-Domänen von SasG und Aap sind zu 34%, die der E-Domänen zu 50% homolog [108]. Die B-Repeats sind zinkabhängige Adhäsionsmoleküle, die über einen Zinkfinger-Mechanismus die G5-vermittelte interzelluläre Adhäsion zwischen benachbarten SasG-Molekülen bewirken [116, 117]. In Abbildung 1.5 ist dieser Prozess schematisch dargestellt. Rekombinante B-Repeats von SasG dimerisieren in Abhängigkeit von Zn^{2+} und bilden dicht gepackte, verdrehte Fibrillen (*twisted cable*) von ungefähr 53 nm Länge auf der gesamten Zelloberfläche [108, 116, 117]. Für SasG konnte gezeigt werden, dass mindestens fünf B-Repeats, die die Länge der Fibrillen bestimmen, für die Vermittlung der interzellulären Adhäsion und der Maskierung der Bindestellen für ECM-Komponenten nötig sind [110]. Auch die B-Domäne von Aap dimerisiert zinkabhängig *in vitro* [117], doch ist unbekannt ob dies direkt auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* *in vivo* übertragbar ist, da die Konzentration von Zn^{2+} in der Zelle viel geringer ist, als für die Dimerisierungsexperimente notwendig war. Möglicherweise vermittelt Zink nicht die Homodimerisierung von Aap, sondern die Bindung an andere Komponenten der Biofilmmatrix wie Teichonsäuren oder DNA [4, 108].

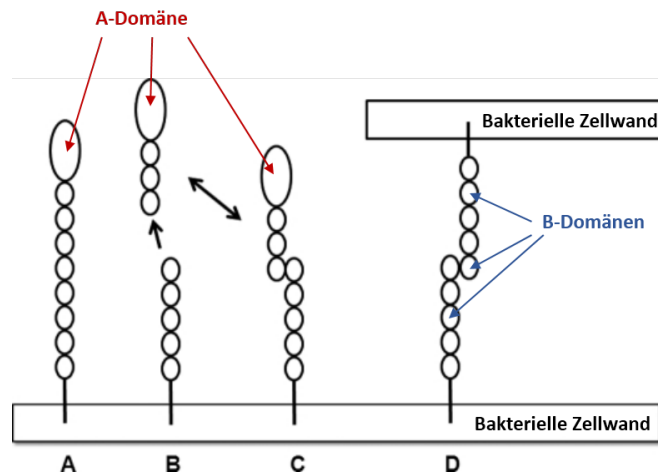


Abb. 1.5: **Modell der Prozessierung und Dimerisierung von SasG.** Während der Biofilmbildung wird kovalent verankertes SasG proteolytisch gespalten (A+B). Die A-Domäne, sowie einige B-Domänen können danach zinkabhängig mit B-Domänen auf der Oberfläche anderer Bakterienzellen dimerisieren (C+D). Abbildung adaptiert nach [116].

Weiterhin verhindert die Expression von SasG die Bindung von den *S. aureus* an Fg, Fn, Cytokeratin 10 und IgG. Da durch die B-Domänen die A-Domäne aus der Zelloberfläche herausragt, wird eine Adhäsion-Liganden Interaktion durch sterische Beeinflussung verhindert. In bestimmten Infektionsstadien ist es für das Bakterium von Vorteil, wenn zugunsten von Dissemination und Weiterverbreitung die Adhäsion an Oberflächenmoleküle inhibiert wird [110] und Zell-Zell-Interaktionen verstärkt werden. Da SasG ebenfalls an abgestoßene nasale Epithelzellen bindet, kann die fehlende Interaktion von ClfB an Cytokeratin 10 kompensiert werden [110, 114].

Plasmin-sensitives Protein Pls Foster *et al.* klassifizieren das *Plasmin-sensitive Protein* (Pls) als G5-E-Repeat-Protein [59]. Das Glycoprotein Pls [118] wird von der (SSC)*mec* I-Kassette kodiert und ausschließlich in MRSA-Stämmen exprimiert. Es besteht aus einer nicht-repetitiven Region sowie drei Repeat-Regionen [119, 120]. Bei Eintritt der Zelle in die stationäre Wachstumsphase wird Pls proteolytisch gespalten [119]. Pls bindet zelluläre Lipide und Glykolipide und vermittelt interzelluläre Interaktion sowie Adhäsion an humane nasale Epithelzellen [12, 114]. Zudem verhindert die Expression von Pls die Bindung von *S. aureus* an IgG, Fg, lösliches und immobilisiertes Fn und die Internalisierung durch Wirtszellen. Dieser Effekt kann auch bei normaler Expression von FnBPA und ClfA [67] beobachtet werden und wird vermutlich durch sterische Beeinflussung vermittelt [121]. Durch die Sequenzhomologie zu Aap/SasG lässt sich vermuten, dass diese Behinderungen möglicherweise durch die Anordnung von Pls auf der Zelloberfläche verursacht werden, da für Aap/SasG der Effekt der Proteinstruktur auf die Funktion belegt werden konnte [108, 110,

113]. Die Pls-vermittelte Biofilmbildung basiert auf zwei unterschiedlichen Mechanismen. So kann sowohl die Glykosylierung der SD-Repeats, als auch die G5-Domänen diese Funktion vermitteln [118].

1.4.3 Three-helical bundle Proteinfamilie - Protein A

Protein A (SpA) ist ein multifunktionales ubiquitär bei *S. aureus* vorkommendes Protein [122], das für die sog. Spa-Typisierung von Staphylokokkenstämmen herangezogen wird. Strukturell wird es von Foster *et al.* in die Gruppe der *Three-helical- Bundle-Proteine* eingeordnet [59]. N-terminal besitzt es 5 homologe Tandem-Repeats (genannt EABCD) aus jeweils ca. 60 Aminosäuren, wovon jede aus drei α -Helix-Bündeln besteht, welche unabhängig voneinander Liganden binden. Diese Domänen binden den Fc-Teil von wirtseigenen IgG-Antikörpern. Dadurch wird das Bakterium mit IgG-Molekülen in falscher Orientierung umgeben, so dass diese nicht von Neutrophilen erkannt werden können. Das Komplementsystem wird daraufhin nicht aktiviert und *S. aureus* ist vor Phagozytose geschützt [51, 59]. Auf die N-terminalen Domänen folgen die Xr-Repeat-Region und der konstanten Xc-Region, die keine Repeat-Strukturen enthält [59]. Zudem interagiert Protein A direkt mit Plättchen [123] und bindet von Willebrand-Faktor (vWF), welcher die Adhäsion von Thrombozyten an geschädigte Endothelzellen vermittelt. Damit kann Protein A eine wichtige Rolle in Staphylokokken-vermittelten endovaskulären Infektionen spielen [84].

Durch die Bindung von Protein A an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1 (TNFR1) ist *S. aureus* auch an Lungenentzündungen beteiligt, da TNFR1 auf den Epithelzellen der Luft- und Atemwegen exprimiert wird. Eine Aktivierung dieses Rezeptors führt zur Sekretion von Cytokinen (IL-8) und zur Anlockung von neutrophilen Granulozyten, die eine starke Entzündungsreaktion auslösen und damit das Gewebe schädigen [124]. Während der Biofilmbildung vermittelt Protein A interzelluläre Adhäsion. Ob diese Funktion über homotypische Interaktion zwischen Protein A-Molekülen oder durch heterotypische Interaktionen zwischen Protein A und anderen Oberflächenproteinen oder nicht-proteinogenen Molekülen und Zellwandstrukturen vermittelt wird, ist noch unbekannt [125].

1.4.4 NEAT-Motiv-Proteinfamilie der Eisentransporterproteine

Eisen dient als Cofaktor bei vielen biochemischen Reaktionen und ist essentiell für Wachstum und Proliferation von Zellen. Jedoch liegen 95% des verfügbaren Eisens intrazellulär vor und sind für extrazelluläre Pathogene wie *S. aureus* nur schwer zugänglich. Das Eisen im Serum liegt proteingebunden an Transferrin und Laktoferrin [16] oder komplexiert in den Tetrapyrrolringen der Häm-Moleküle vor [60]. Nach Foster *et al.* stellen die Eisentransportproteine eine eigene Gruppe

der CWAs dar. Die sog. *Near-Iron-Transporter*-Proteine (NEAT-Proteine) werden unter Eisenlimitierenden Bedingungen exprimiert. Der *Iron-responsive surface determinants*-Locus (Isd) ist nur in *S. aureus* vorhanden [33]. Die Isd-Proteine sind spezielle Transporterproteine, welche eine oder mehrere NEAT-Domänen besitzen, von denen jede ein Häm-Molekül binden kann [60]. Die Transkription von *isdA*, *isdB*, *isdC* und *isdH* wird durch die Eisenkonzentration in der Umwelt und dem *fur*-Regulator (*ferric uptake regulator*) gesteuert [73]. Dadurch können Häm-Gruppen von Eisen-enthaltenden Molekülen, wie Transferrin, Hämin oder Hämoglobin an der Zelloberfläche gebunden, durch die Plasmamembran transportiert und im Zytoplasma von Hämoxigenasen verwertet werden [60, 126]. Neben Häm-Gruppen bindet IsdA Fg, Fn und humane abgestoßene nasale Epithelzellen während IsdB Plättchenadhäsion und -aggregation vermittelt [73, 98].

1.4.5 Strukturell uncharakterisierte, zellwandgebundene Proteine

***S. aureus* surface protein C** Biofilmbildung in *S. aureus* kann durch Polysaccharide oder Proteine vermittelt werden. In einer Studie von Rohde *et al.* konnten von 18 untersuchten klinischen Isolaten von *S. aureus* nur bei 33% das *sasG*-Gen nachgewiesen werden und bei keinem *bap*. Da der gebildete Biofilm jedoch durch Zugabe von Proteasen aufgelöst werden konnte, wurde vermutet, dass noch ein weiteres Oberflächenprotein an der Biofilmbildung von *S. aureus* beteiligt ist [127].

Das identifizierte *sasC*-Gen besteht aus 6558 bp und kodiert für ein Protein aus 2168 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 237,9 kDa. Bioinformatische Analysen haben für SasC (UniProtKB; C7BUR8) eine modulare Organisation ergeben (Abb. 4.1) [67]. Wie andere CWAs besitzt es ein N-terminales Signalpeptid mit einem YSIRK-Motiv und ein C-terminales LPXTG-Motiv zur Verankerung in der Zellwand. Eine 585 Aminosäuren lange A-Region im N-terminalen Bereich [67], welche in ihrer Sekundärstruktur theoretisch der ligandenbindende Domäne von MSCRAMM-Proteinen ähneln könnte [67]. SasC weist jedoch keine Sequenzhomologien zu ähnlich organisierten CWAs wie SasG/Aap oder FnBP auf [128]. Da keine Spaltung von SasC während der Biofilmbildung nachgewiesen werden konnte, unterscheidet sich der Ligandenbinde-Mechanismus offenbar von dem von Aap/SasG und aufgrund der fehlenden Sequenzhomologie auch vom Mechanismus der Ligandenbindung der FnBPs [128].

SasC ist weiterhin charakterisiert durch eine FIVAR-Domäne (*Found in Various Architectures*) aus 54 Aminosäuren (AS 590-643), die mutmaßlich zuckerbindende Funktion hat [128, 129], und 17 DUF1542-Domänen (*Domain of Unknown Function*) aus je 72 Aminosäuren, die von je 55 Aminosäuren voneinander getrennt sind [128]. Die DUF1542-Repeats sind zu 18% bis 47% identisch. Der gesamte Abschnitt nimmt eine *coiled-coil*-Tertiärformation ein, was die Unterteilung des Proteins

in zwei Abschnitte unterstreicht [130]. Diese Art der Tertiärstruktur besteht aus zwei α -Helices, die zu einer Mehrfachhelix umeinander gewunden sind und strukturelle sowie regulatorische Funktionen haben können [131]. Strukturell ähnelt die DUF1542-Repeat-Struktur möglicherweise den B-Repeats von SasG/Aap, allerdings konnte keine Sequenzhomologie nachgewiesen werden. Ein FIVAR-Motiv und DUF1542-Domänen sind ebenfalls in Mrp- und zu FmtB-Proteinen zu finden [130], welche Methicillinresistenz vermitteln, und in den Oberflächen-assoziierten Proteinen Ehb in *S. aureus* und seinem Homolog Embp aus *S. epidermidis* zu finden, die Adhäsion und Biofilmbildung vermitteln [129, 132, 133].

Der N-Terminus (Aminosäuren 38-1305) ist zu 49 % mit dem FmtB-Protein identisch [67, 134].

Unsere Arbeitsgruppe hat *sasC*-Subklone konstruiert, welche verschiedene N-terminale Subdomänen (Subklon 3A, Subklon 3B, Subklon 5 und Subklon 6), den kompletten N-Terminus (Subklon 1) oder 8 der 17 DUF-Domänen (Subklon 2) exprimieren (Abb. 1.6. Expression von *sasC* und Sub 1 in *S. carnosus* TM300 führte zur Bildung von großen Zellaggregaten und zu verstärkter Biofilmbildung auf Polystyrol und Glas. Die Domänen zur SasC-abhängigen interzellulären Adhäsion und Biofilmmakkumulation konnten im N-terminalen Bereich lokalisiert werden [128].

Die Adhäsion an Polystyrol wird durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt. Der Anteil von 25,1 % an hydrophoben Aminosäuren in SasC entspricht dem des Autolysins AtlE (26,4 %) [128, 135]. Für Sub 1 korreliert ein höherer Anteil an hydrophoben Aminosäuren mit der verstärkten initialen Adhäsion an Polystyrol, was für Sub 2 nicht beobachtet werden konnte (28,1 % zu 26,6 %). SasC bindet nicht an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fg, vWF, Plättchen oder Thrombospondin [128].

Das *sasC*-Gen hat in klinischen *S. aureus*-Isolaten eine hohe Prävalenz von 97 %. In 31 untersuchten MRSA-Isolaten waren alle *sasC*-positiv, von 35 untersuchten MSSA-Isolaten waren 33 *sasC*-positiv [130]. Die Expression ist *in vitro* nur sehr schwach. Eine Relevanz der *sasC*-Expression *in vivo* wurde von Clarke *et al.* bestätigt. Er konnte spezifische anti-SasC-Antikörper während einer Infektion mit *S. aureus* nachweisen [136]. Die Expression von *sasC* wird von den Regulationssystemen *arlRS* und *mgrA* kontrolliert [137, 138]. Für *mgrA* ist eine positive Regulierung von extrazellulären Proteinen und eine negative Regulierung der Expression von Oberflächenproteinen bekannt [139]. Daher resultiert eine Deletion des *mgrA*-Operons in einer Verstärkung der *sasC*-Transkription [140]. Studien haben gezeigt, dass in *mgrA*-defizienten, aber Biofilm-positiven Stämmen, die Biofilmbildung von Sortase-verankerten Proteinen abhängt [141].

Bap und SraP Zu den weiteren Zellwand-gebundenen Proteinen gehört das *Biofilm-associated protein* Bap. Die klinische Signifikanz von Bap ist noch unklar, da es bisher nur in Mastitisisolaten von *S. aureus* gefunden wurde, doch sein Homolog Bhp konnte aus klinischen *S. epider-*

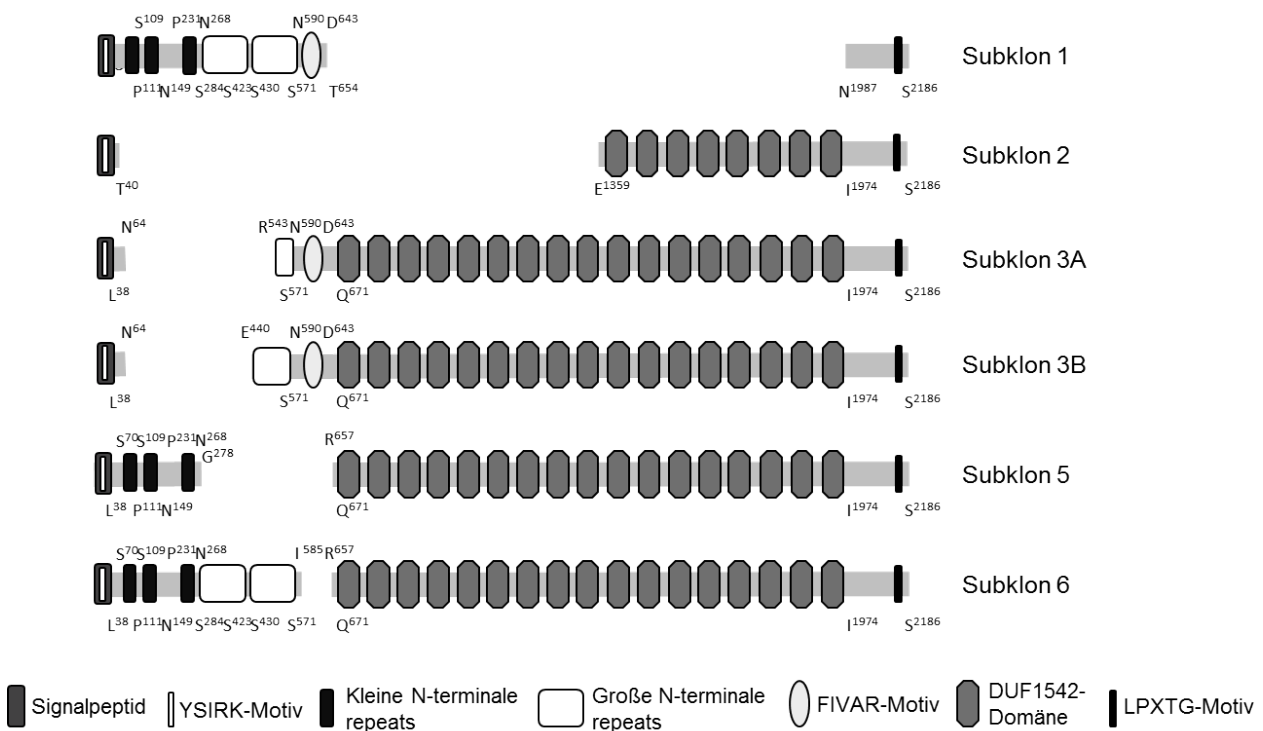


Abb. 1.6: **Schematische Darstellung der SasC-Subklone.** Sub 1 beinhaltet den gesamten N-terminalen Bereich und Sub 2 die DUF1542-Domänen 10-17. Die Subklone 3A, 3B, 5 und 6 unterscheiden sich im N-terminalen Bereich. Sub 3A fehlen alle SR und ein großer Teil des zweiten LR, Sub 3B fehlen ebenfalls die drei SR, aber nur ein kleinerer Teil des zweiten LR, Subklon 5 weist keines der LR auf. Sub 6 exprimiert alle SR und die LR, aber nicht die FIVAR-Domäne. Abbildung nach: Kommunikation mit C. Heilmann)

midis-Stämmen wie RP62A isoliert werden [142, 143]. Bap vermittelt die Anheftung an Polystyroloberflächen, interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung und verhindert die Anheftung an extrazelluläre Faktoren wie Fg, Fn und Internalisierung durch Wirtszellen [144, 145].

Das *Serin-rich surface Protein* SraP ist ein weiteres CWA-Protein und besitzt eine Lektinbindende N-terminale Domäne, die als starre stäbchenförmige Struktur auf der Zelloberfläche exprimiert wird und mittels homophiler Interaktion zweier Cadherin-ähnlicher Domänen Biofilmbildung vermittelt. Die serinreiche Repeat-Region *srr1* (SraP besitzt zwei davon) und eine nicht-Repeat-Region induzieren Plättchenaggregation [146–148]. In Tabelle 1.1 sind die Hauptgruppen der Zellwand-verankerten Proteine von *S. aureus* zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Klassifizierung der Zellwand-gebundenen Proteine von *S. aureus*

Protein	Ligand und Funktion	Referenz
MSCRAMMs		
ClfA	Fg, Platelet membrane receptor, Plättchenaggregation	[89, 90, 93]
ClfB	Fg, Cytokeratin 10, Plättchenaggregation, nasale Kolonisierung (abgestoßene Epithelzellen)	[88, 90, 94]
SdrC	β -Neurexin, nasale Kolonisierung	[74, 98]
SdrD	abgestoßene Epithelzellen	[98]
SdrE	Komplementfaktor H, Plättchenaggregation	[90, 100]
Bbp	Fg, <i>Bone Sialoprotein</i> , Adhäsion	[102, 103]
FnBPA, FnBPB	Fn, Fg, Elastin, Biofilmmakumulation, Internalisierung	[82–84]
Cna	Kollagen, Komplementprotein C1q	[104, 106, 146]
NEAT-Motiv		
IsdA	Hämoglobin, Transferrin, Hämin, Fg, Fn, nasale Epithelzellen, Eisenaufnahme, Resistenz gegen Neutrophilenlyse	[61, 73, 149]
IsdB	Hämoglobin, Hämin, β 3-Integrin, Eisenaufnahme	[61, 150, 151]
IsdC	Hämin, Eisenaufnahme	[61]
IsdH	Haptoglobulin-(Hämoglobin)-Komplex, Eisenaufnahme, Abbau von C3b	[152, 153]
Three-helical-Bundle		
Protein A (SpA)	IgG, vWF, TNFR1, Plättchenrezeptor gC1qR, nasale Kolonisierung, Schutz vor Phagozytose, interzelluläre Adhäsion	[84, 123–125]
G5-E-Repeat		
SasG/Aap	nasale Epithelzellen, homotypische Interaktion mit SasG/Aap, vermittelt interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung, inhibiert Bindung an Fg, Fn, IgG und Cytokeratin 10	[110, 114, 116, 117]
Pls	nasale Epithelzellen, Glykolipide, interzelluläre Adhäsion, verhindert Bindung von IgG, Fg und Fn an <i>S. aureus</i> , Schutz vor Phagozytose	[12, 114, 118, 121]
Strukturell nicht-charakterisiert		
Bap	gp96, Adhäsion an Polystyrol, Biofilmbildung, inhibiert Internalisierung und Bindung an Fg, Fn	[144, 145, 154]
SraP	Lektin, gp340, Plättchenaggregation, Endokarditis und endovaskuläre Infektion	[147, 148, 155]
SasC	Adhäsion an Polystyrol, Aggregation, Biofilmbildung	[128]
SasB, SasD, SasF, SasH, SasJ, SasK, SasL	mutmaßliche LPXTG-Proteine, Liganden und Funktion unbekannt	[67]

1.5 Nicht-kovalent gebundene Oberflächen-assoziierte Moleküle

1.5.1 Sekretierte Proteine - SERAMs

Interzelluläre Adhäsion wird nicht nur durch zellwandgebundene Proteine, sondern ebenfalls von sekretierten Proteinen, welche zum Teil später wieder an der bakteriellen Zellwand binden [84], sog. SERAM-Proteinen (*Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules*) vermittelt.

Autolysin/Adhäsion Atl/AtIE Die am häufigsten vorkommenden Proteine der Staphylokokken-Zellwand sind die nicht-kovalent gebundenen Autolysine/Adhesine Atl/AtIE [4]. Sie sind mit der Oberfläche über hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen assoziiert. Atl/AtIE ist multifunktional und besitzt sowohl enzymatische, genauer hydrolytische und Peptidoglykan-spaltende, als auch adhäsive Aktivität. Die Enzymaktivität ist bifunktional und besteht aus einer Amidase-Domäne und einer Glucosaminidase-Domäne [36, 135].

Da die Autolysine/Adhäsine nicht über ein LPXTG-Motiv in der Zellwand verankert sind, vermuteten Peschel *et al.*, dass diese möglicherweise an die Teichonsäuren der Zellwand gebunden sind [65, 156]. Fedtke *et al.* konnten aber zeigen, dass eine Deletion der LTA-Synthase keinen Einfluss auf die Zusammensetzung und das Muster der Oberflächenproteine hat [157]. Die Anbindung der kationischen Autolysine an die anionischen Teichonsäuren stellt einen Kontrollmechanismus der enzymatischen Aktivität dar [158]. Je stärker die negative Ladung der Teichonsäuren, desto stärker ist die Inhibierung der Autolysine [156].

In der Zelle sind Autolysine/Adhäsine im Zellwand-*turnover*, bei der Zellteilung und der Antibiotika-induzierten Zellyse beteiligt [35, 36]. Sie vermitteln Anbindung an abiotische Oberflächen und können humane Matrixproteine binden [35, 135]. Atl (137 kDa) aus *S. aureus* und AtIE (148 kDa) aus *S. epidermidis* vermitteln die Anheftung an Polystyrol, die Matrixproteine Vitronektin (Vn), Fg und Fn und damit die Biofilmbildung [36, 159]. Expression von AtIE beeinflusst die Hydrophobizität der Zelloberfläche, welche wiederum Einfluss auf die initiale Anheftung an Plastik- und Glasoberflächen hat [135, 160]. Beide Proteine weisen dieselbe strukturelle Organisation auf und werden proteolytisch in eine N-terminale Amidase- und eine C-terminale Glucosaminidase-Domäne gespalten [159, 161]. Die Amidase spaltet die Bindung zwischen der N-Acetylmuraminsäure und dem L-Alanin der Quervernetzung; die Glucosaminidase spaltet die glykosidischen Bindungen des Peptidoglykangerüsts [35]. Die Prozessierung führt zur Zellyse, Freisetzung von DNA und interzellulärer Aggregation und infolgedessen zur Reifung des Biofilms [161]. Die bakteriolytisch aktiven Domänen sind durch drei *direct* Repeats (R1, R2, R3), bestehend aus jeweils ca. 170 Aminosäuren mit zwei Glycin-Tryptophan (GW-)-Dipeptiden, verbunden und vermitteln ebenfalls die Assoziation der Proteine in der Peptidoglykanschicht [159]. Die Synthese

von Peptidoglykankomponenten und der Abbau derselben während der zellulären Teilung befinden sich in einem kontinuierlichen Gleichgewicht. Es konnte gezeigt werden, dass die *atlA* und *atlE*-Gene austauschbar sind und offenbar ähnliche Funktion haben [36, 159].

AtlE und *AtlA*-Deletionsmutanten bilden große Zellcluster [135], haben eine gestörte Zellseparation und sind unfähig an verschiedene Oberflächen zu adhären, was in einem Biofilm-negativen Phänotyp resultiert [36]. Interessanterweise haben diese Auswirkungen kaum Einfluss auf das Zellwachstum. Die Auswirkungen einer *atl*-Deletion können von bis zu einem gewissen Grad von der Hydrolase *Aaa* kompensiert werden [35, 36, 162]. Durch die Fähigkeit zur Anbindung an das *Heat shock cognate protein* (Hsc70) auf humanen Endothelzellen, welches als Rezeptor fungiert, ist *Atl/AtlE* zudem an der Internalisierung in Wirtszellen beteiligt [159].

Autolysin *Aaa/Aae* *Aae* aus *S. epidermidis* und *Aaa* aus *S. aureus* sind Zellwand-assoziierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 35 kDa bzw. 35,8 kDa und zu 76 % homolog [35, 162]. Die N-terminale Region von *Aaa* besteht aus drei sich wiederholenden Sequenzen mit einem Lysin-Motiv (LysM) [162]. LysM-Domänen binden *N*-Acetylglucosaminreste in der Peptidoglykanschicht und vermitteln dadurch eine nicht-kovalente Bindung von Proteinen an die Zelloberfläche [163]. LysM-Domänen wurden in vielen Enzymen des Zellwandmetabolismus und in einigen Oberflächenproteinen wie *EbpS* [164] und Protein A [165] gefunden, wobei LysM dort nicht an der adhäsiven Funktion beteiligt zu sein scheint. Die bakteriolytische Aktivität von *Aaa/Aae* basiert auf der C-terminalen Aminohydrolase/Peptidase (cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase; CHAP)-Domäne [166]. *Aaa* und *Aae* vermitteln Adhäsion, indem sie konzentrationsabhängig und mit hoher Affinität *Fg*, *Fn* und *Vn* binden [35, 36, 162]. In *Aaa* konnte erstmalig eine adhäsive Funktion der LysM- und der CHAP-Domäne nachgewiesen werden [166].

Extrazelluläres Adhäsionsprotein *Eap* und sein Homolog *Emp* Auch die sekretorischen Proteine der SERAM-Proteinfamilie können Bestandteile der Biofilmmatrix sein, wie das Extrazelluläre Adhäsionsprotein (*Eap*), auch als Map/P70 bezeichnet, mit einem Molekulargewicht von 60-72 kDa und das Extrazelluläre Matrix- und Plasma-bindende Protein (*Emp*) mit einem Molekulargewicht von 40 kDa [84]. *Eap*, welches nur in *S. aureus* vorkommt, und *Emp* binden verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix wie *Fg*, *Fn* und *Vn* und können an der Oberfläche von Endothelzellen anheften [84]. Möglicherweise begünstigt eine Bindung von *Eap* an *Fg*, welches in diesem Fall als Brückenmolekül dient, die Internalisierung von Staphylokokken in Wirtszellen [84]. Zudem wirkt *Eap* als entzündungshemmendes Molekül, da es mit dem endothelialen Adhäsionsmolekül ICAM-1 interagieren kann und dessen Erkennung und Bindung durch Neutrophile blockiert. Dadurch wird die Migration von Leukozyten durch das Endothel verhindert und die

phagozytotische Reaktion auf eine Entzündung abgeschwächt [167].

1.5.2 Membrandurchspannende Proteine - Ebh und EbpS

Zu den nicht-zellwandverankerten Proteinen gehören das 1,1MDa große Fibronectin-bindende Protein Ebh (*Extracellular matrix binding protein homologue*) von *S. aureus* und das homologe Embp von *S. epidermidis* [73, 133], welches Adhäsion an immobilisiertes Fn und Biofilmmak-kumulation vermittelt [129]. Ebh bindet humanes Fn, doch sind die Bindestellen zu denen der FnBPs nicht homolog. Die Expression von Ebh ist abhängig von der Wachstumsphase und wird vom *agr*-System reguliert. Ebh ist über eine C-terminale membrandurchspannende Domäne in der Zellmembran verankert, besitzt allerdings kein LPXTG-Motiv und bildet charakteristische Strukturen auf der Zelloberfläche [132]. Embp und Ebh sind weiterhin charakterisiert durch sich wiederholende FIVAR-Domänen, gefolgt von FIVAR-GA (G-related Albumin binding)-Repeats und DUF1542-Domänen, welche auch in SasC zu finden sind [129]. Sowohl die FIVAR-GA-Repeats als auch die FIVAR-Domänen können die Embp-Fn-Interaktion vermitteln [129, 132, 133]. Vorläufige Kristallisationsergebnisse der repetitiven FIVAR-Regionen (Büttner, Perbandt Rohde, unveröffentlicht) und der DUF1542-Domänen weisen darauf hin, dass Embp längliche stabförmige (*rod-like*) Strukturen ausbildet [168].

Das Elastin-Bindeprotein von *S. aureus* (EbpS) ist ein weiteres Protein, welches über einen Membrananker verfügt und Komponenten der extrazellulären Matrix bindet [164].

1.6 Nicht-proteinogene Adhäsionsmoleküle

Polysaccharid-Adhäsion PIA Die Matrix eines Biofilms besteht neben Proteinen und eDNA hauptsächlich aus Polysacchariden wie dem *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA; PNAG; Poly-N-Acetyl-Glucosamin) [4]. Kodiert werden die Proteine der PIA-Synthese durch das *ica*-Operon (*icaABDC*) [54, 169], wobei *icaA* und *icaD* für eine membrangebundene *N*-Acetylglucosamin-Transferase, *icaB* für die PIA-Deacetylase, *icaC* für ein integrales Membranprotein, das verantwortlich für den Transport von *N*-Acetylglucosamin-Oligomeren (Bausteine für PIA) ist. *IcaR* kodiert für ein Regulatorprotein [46, 54, 170]. Das *ica*-Operon wurde zuerst in *S. epidermidis* und später auch in weiteren Staphylokokkenspezies identifiziert. PIA ist ein lineares Glucosaminoglykan aus mindestens 130 β -1,6-verknüpften *N*-Acetylglucosaminresten, von denen 15 bis 20 % deacetyliert vorliegen [52, 171]. Aufgrund seiner positiven Nettoladung kann PIA Aggregation durch elektrostatische Wechselwirkungen der partiell positiven Gruppen mit negativ geladenen Oberflächenbestandteilen, wie z. B. Teichonsäuren und Lektinen, vermitteln [4, 171], wobei die

unverzweigte Struktur des Moleküls von der Waals- und Wasserstoffbrücken-vermittelte Interaktion mit anderen Polysaccharidsträngen und der bakteriellen Zellwand begünstigt [52]. PIA ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor in *S. aureus* [172, 173]. So sind Transposon-Insertionsmutanten des *ica*-Operons in *S. epidermidis* O-47 nicht mehr in der Lage einen Biofilm zu bilden [160].

Oft können Änderungen in der Biofilmbildung auf Änderungen in der Expression des *ica*-Operons zurückgeführt werden, so z. B. die Verfügbarkeit von *N*-Acetylglucosamin und Glucosamin als leicht verfügbare Substrate für die PIA-Synthese [170]. Umweltfaktoren wie Sauerstoffkonzentration beeinflussen *in vitro* die Transkription der *ica*-Gene und damit die PIA-abhängige Biofilmbildung. Anaerobiose, wie sie in einem bestehenden Biofilm zu finden ist (sinkende Sauerstoffkonzentration mit zunehmender Tiefe) induziert die PIA-Expression in *S. aureus* und *S. epidermidis* [174]. In Abwesenheit oder Nicht-Funktionalität der *ica*-Gene können Proteine wie Aap/SasG oder Bap die Rolle von PIA in der Biofilmmakkumulation übernehmen [111, 127, 144, 175]. Dies zeigt, dass PIA zwar eine wichtige, jedoch keine essentielle Bedeutung in der Biofilmbildung zukommt.

Teichonsäuren In der Zellwand von *S. aureus* und *S. epidermidis* sind neben Proteinen auch Teichonsäuren zu finden, die als Virulenzfaktoren an den ersten Schritten der Biofilmbildung beteiligt sind [43, 176]. Teichonsäuren sind stark geladene Polymere und können kovalent an die Peptidoglycanstruktur gebunden (*wall teichoic acids*, WTA) oder mittels Lipidanker in der Zellmembran verankert (*lipoteichoic acids*, Lipoteichonsäuren, LTA) sein. Sie bestehen aus (poly)-Glycerophosphatresten, welche mit D-Alanin und *N*-Acetylglucosaminresten substituiert sein können [177].

Lipoteichonsäuren kommen hauptsächlich in Gram-positiven Bakterien vor, bei welchen der GC-Gehalt der DNA weniger als 50 % beträgt und sind an einer Vielzahl von zellulären Funktionen und Signalwegen wie an der Regulierung der Autolysin-Aktivität [156, 158], Aufrechterhaltung der Homöostase, Entzündungsreaktionen und Biofilmbildung beteiligt [177]. Die Adhäsion an Plastikoberflächen wird von den physikochemischen Eigenschaften des Materials und der bakteriellen Zelloberfläche beeinflusst. In *S. aureus* ist die Kolonisierung von abiotischen Oberflächen auch abhängig von der Ladung der Teichonsäuren [171]. Eine verringerte Synthese von LTAs führt zur Änderung der physikochemischen Eigenschaften der Zelloberfläche und einer reduzierten Biofilmbildung auf Polystyroloberflächen, bedingt durch eine verstärkte Hydrophobizität der Zellen, so dass keine initiale Adhäsion mehr stattfinden kann [157]. Auch das Vorhandensein von D-Alaninestern beeinflusst die Adhäsionseigenschaften. Je weniger dieser Substituenten an den Teichonsäuren vorhanden sind, desto negativer die Nettoladung der Zelloberfläche. Dadurch wird die polyanionische Ladung und Beschaffenheit der Zelloberfläche reguliert [177], was beispielsweise

die Sensitivität gegenüber Vancomycin und die Aktivität von Autolysinen [43, 156]; jedoch nicht das generelle Proteinverteilungsmuster auf der Oberfläche [157], beeinflusst. Zusätzlich vermitteln WTAs Adhäsion an humane nasale Epithelzellen [42] und für *S. epidermidis* wurde beschrieben, dass Teichonsäuren die Bindung an immobilisiertes Fibronectin verstärken können [178].

Extrazelluläre DNA Neben Polysacchariden und Proteinen stellt eDNA eine weitere strukturelle Komponente in Biofilmen von *S. aureus* und *S. epidermidis* dar [27]. Freigesetzt wird eDNA v.a. durch Lyse von Zellen innerhalb der Biofilmmatrix [141, 179]. In *S. epidermidis* wird das Ausmaß dieser Autolyse stark von der Aktivität des Autolysins AtlE bestimmt [36, 179]. In verschiedenen Studien konnte bestätigt werden, dass eDNA zu Aggregation und zu Stabilisierung der Biofilmstruktur beiträgt [141, 180, 181]. Als polyanionisches Molekül kann eDNA, ähnlich wie Teichonsäuren, andere Moleküle, einschließlich kationischer Moleküle wie PIA, miteinander vernetzen [135, 182].

Für *S. lugdenensis* konnte jedoch ein Lyse-unabhängiger Mechanismus der DNA-Freisetzung identifiziert werden. Eine Disruption des Kompetenzgens *comEB* führt zu einer Reduktion der eDNA-Freisetzung und der Biofilmbildung [183, 184], aber zu keiner Änderung in der autolytischen Aktivität von AtlL (Homolog zu Atl und AtlE) [184]. Dass Zugabe von DNase I die initiale Anheftung an Glasoberflächen inhibiert [181] und eDNA als interzelluläres Adhäsion während der frühen akkumulativen Phase zur Stabilität eines Biofilms beiträgt, unterstützt die Bedeutung von eDNA für die Biofilmbildung [27, 181, 185].

1.7 Regulation der Biofilmbildung

Die Flexibilität von *S. aureus* sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen, wird durch die koordinierte Expression einer Vielzahl von Genen ermöglicht [174, 186, 187]. In *S. aureus* unterliegt die Expression der Virulenzfaktoren globalen Regulationsmechanismen wie dem *agr*-Zweikomponenten-System (*accessory gene regulator*) und dem DNA-Bindeprotein SarA, einem alternativen Transkriptionsfaktor [188]. Die Biofilmbildung ist von suboptimalen Wachstumsbedingungen wie Eisenlimitierung [137], anaerobe Zustände [189] oder geringe Antibiotikakonzentrationen [190] begünstigt.

Das *agr*-System ist ein *Quorum-sensing-Locus* (QS), der direkt auf Umweltfaktoren wie Zelldichte und Nährstoffverfügbarkeit reagiert. Während der mittleren exponentiellen Wachstumsphase werden verstärkt sekretierte Proteine exprimiert und gleichzeitig die Produktion von Oberflächenproteinen gehemmt [16, 191]. PIA- Aap- und Embp-abhängige Biofilme unterliegen der Kontrolle durch verschiedene regulatorische Schaltkreise [27]. Ein klassisches Beispiel für die Wirkung des

agr-QS-Systems ist die Hochregulierung der Expression von Adhäsinen während Phasen geringer Zelldichte, wie zu Beginn einer Infektion [4]. Ist die Besiedelung einer Oberfläche erfolgt, führt eine erhöhte Aktivität des *agr*-QS-Systems zur Beendigung der Expression von Adhäsionsmolekülen [191]. Im *agr*-System werden Toxine und extrazelluläre Enzyme positiv reguliert, während Zellwand-assoziierte Proteine der negativen Regulation unterliegen [132]. Sie werden während der initialen Besiedelungsphase verstärkt exprimiert [16, 191].

Auch an der Biofilmstrukturierung wird die Beteiligung von QS-Systemen vermutet, doch sind die zugrunde liegenden Mechanismen weniger gut untersucht als die der interzellulären Aggregation [4, 192]. Die Bildung eines Biofilms erfordert die Entstehung von Tunneln und Flüssigkeitskanälen für den Nährstofftransport in die tieferen Schichten sowie Faktoren, welche bestehende Zell-Zell-Interaktionen auflösen. Dieselben Faktoren können im Endeffekt zur Ablösung von Zellen und Zellclustern führen, was die Stärke und Ausbreitung und Disseminationsrate eines Biofilms beeinflusst [193]. Phenollösliche Moduline (PSM) sind nicht nur pro-inflammatorisch wirkende Moleküle, sondern auch Schlüsselemente bei der inneren Strukturierung eines Biofilms. Sie sind amphipatische Moleküle mit oberflächenaktiven Eigenschaften (Surfaktant), welche streng vom *agr*-QS-System reguliert werden [4, 194]. So vermittelt PSM- δ Neutrophilenlyse [195] und das Peptid PSM- β ist für Strukturierung und Dissemination von Biofilmen *in vitro* verantwortlich [196]. Die Expression von *agr* ist auf die oberflächlichen Regionen eines Biofilms begrenzt, wo es durch Hochregulierung der PSM-Expression die Biofilmbildung steuert [197]. Es konnte gezeigt werden, dass *agr*-Mutanten *in vitro* einen dickeren und kompakteren Biofilm bilden als der entsprechende Wildtypstamm [198, 199]. *agr*-Mutanten machen bis zu 25 % der Isolate aus Biofilm-assoziierten Infektionen aus [197]. Denn eine permanente Inaktivierung des *agr*-Systems resultiert in einer übermäßig starken Biofilmbildung, was in einigen Infektionsstadien für das Überleben der Bakterien vorteilhaft ist [4]. In Staphylokokken scheint zudem die differentielle Expression von PIA zur Strukturierung des Biofilms beizutragen [4, 200]. Die PIA-Expression wird nicht über das *agr*-System reguliert [198, 199], sondern über globale Regulatoren wie das DNA-Bindeprotein SarA und den alternativen Sigmafaktor SigB (σ^B) gesteuert, die wie *agr* auf Umweltstimuli reagieren [186, 201]. So inhibiert SigB beispielsweise die Transkription von *icaR* [202], was wiederum die Transkription von *icaADBC* unterdrückt [203]. SarA reguliert die Promotoraktivität von *icaA* hingegen *icaR*-unabhängig [204]. Christner *et al.* konnten zeigen, dass in *S. epidermidis* eine erhöhte *sarA*-Aktivität die Bildung eines PIA-abhängigen Biofilms fördert und eine *down*-Regulierung einen PIA-unabhängigen Biofilmtyp begünstigt [27, 179]. Das weitverbreitete Insertionselement IS256 kann sich in den *ica*-Genlocus integrieren und die PIA-Produktion unterbinden [44, 205]. Dies könnte einen weiteren Mechanismus zur Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen währ-

rend der verschiedenen Phasen der Infektion darstellen [4]. Integration von IS256 in den *agr*-Locus könnte einen ähnlichen Zweck erfüllen - entsprechende Isolate wurden bereits identifiziert [197]. Der Zusammenhang von globalen Regulationssystemen und Pathogenese ist bereits belegt worden. Die meisten HA-MRSA besitzen einen *agr*⁻-Genotyp oder zumindest einen *agr*⁻/*agr*⁺ Mischtyp, welcher Biofilmbildung und Besiedelung von Plastikoberflächen begünstigt [16, 198].

Zielstellung

Staphylokokken exprimieren eine Vielzahl von proteinogenen und nicht-proteinogenen Adhäsinen und oberflächenassoziierten Faktoren, welche die Biofilmbildung durch initiale Anheftung an biotische und abiotische Oberflächen und interzelluläre Adhäsion während der Reifungsphase vermitteln.

In dieser Arbeit sollten die an der SasC-vermittelten Aggregation beteiligten Domänen im Detail identifiziert und charakterisiert werden. Schroeder *et al.* konnten bereits zeigen, dass die an der Biofilmbildung beteiligte(n) funktionelle(n) Domäne(n) im N-Terminus des SasC-Proteins lokalisiert ist oder sind [128]. Es sollte untersucht werden, ob die SasC-vermittelte Zellaggregation und Biofilmmakulation auf homotypische oder heterotypische Interaktionen der SasC-Subdomänen miteinander oder mit anderen Liganden zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck sollten rekombinante Fusionsproteine der N-terminalen Subdomänen hergestellt und für *in vitro*- und *in vivo*-Protein-Protein-Interaktionsstudien eingesetzt werden. Dazu wurden Western Liganden-Analysen, chemisches *crosslinking*, sowie ein bakterielles *Two-Hybrid*-System herangezogen. Für andere Oberflächenproteine von *S. aureus* konnte bereits gezeigt werden, dass eine Dimerisierung in Abhängigkeit verschiedener Ionen stattfindet. Für die SasC-Subdomänen war der Einfluss von bivalenten Kationen auf das Interaktionsverhalten zu untersuchen. Um die Relevanz der einzelnen Domänen während der Biofilmmakulation zu untersuchen, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dabei sollte der Einfluss von rekombinanten SasC-Proteinen und anti-SasC-Antisera auf das Aggregationsverhalten und die Biofilmbildung verschiedener *sasC*-exprimierender Subklone untersucht werden. Für den Fall einer heterotypischen Interaktion sollten dann gegebenenfalls Liganden des SasC-Proteins auf der Staphylokokkenoberfläche identifiziert werden. Neben Proteinen könnten ebenso Polysaccharide oder Teichonsäuren als potentielle Interaktionspartner für SasC dienen.

Aufgrund der Schwierigkeiten, die mit Biofilm-assoziierten Infektionen einhergehen, wie z. B. Resistenz gegenüber Antibiotikatherapien und der Verbreitung von multiresistenten Keimen ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Biofilmbildung eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung von neuen Strategien zur Prävention und zur Therapie von Staphylokokken-Infektionen. Die verschiedenen, aber spezifischen Interaktionen der Oberflächenproteine mit den

Komponenten der extrazellulären Matrix des Wirtes bieten therapeutisch interessante Ansatzmöglichkeiten. Von der Entwicklung von klassischen Impfstoffen, über anti-adhäsiv wirksame Substanzen [132] bis zu spezifischen Inhibitoren, gerichtet gegen die Oberflächenprotein-Liganden-Interaktion während der Biofilmmakkumulation.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterialien und Geräte

Material	Firma
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Biorad, München
Combitips Plus	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammern sub-cell® GT	Biorad, München
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Erlenmeyer-Schikanekolben	Duran, Mainz
Extra Thick blot paper	Biorad, München
FALCON®Röhrchen 14 ml/50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage XS205 Dual Range	Mettler Toledo
Geltrockner SDG4050	Savant Instruments, USA
illustra NAP-25 G25 Säulen, DNA grade	GE Healthcare, München
Inkubator Typ B 6200	Kendro, Langenselbold
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Membra Pure	Astacus
Micro Pulser™	Biorad, München
Mikrotiterplatte 96 well, Flachboden	Greiner Bio-One, Solingen
Microplate Reader iMark™	Biorad, München
Multifuge 3 S – R	Heraeus, Düsseldorf
Nitrocellulosemembran	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
PCR Thermal Cycler T100	Biorad, München
pH-Meter Level 1	ino Lab, Mexiko
Photometer	Biorad, München
Power Pac Basic	Biorad, München
Power Pac 300	Biorad, München
RunBlue Protein-Gele	Expedeon, Cambridge, UK

Safe Seal Reagiergefäße 1,5/2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Düsseldorf
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot®Turbo™ Transfer System	Biorad, München
Transferpipette®-12	Brand, Wertheim
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Mini-PROTEAN®TGX Stain-Free™ Precast Gels	Biorad, München

Tabelle 2.2: Chemikalien

Chemische Substanz	Firma
Acrylamid (30% 4K)	AppliChem, Darmstadt
Agar	Difco, Lawrence, USA
Agarose LE	Biozym, Oldendorf
Albumin Standard	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
Albumin Fraktion V	AppliChem, Darmstadt
APS	AppliChem, Darmstadt
1-Step™ NBT/BCIP	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bis-Sulfosuccinimidylsuberat (BS ³)	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
BSA Fraktion V	AppliChem, Darmstadt
Chloroform (CHCl ₃) reinst.	AppliChem, Darmstadt
Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail	Roche, Basel
Coomassie Brilliant Blue G250	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagenz	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem, Darmstadt
DMSO p.A.	AppliChem, Darmstadt
DNA-Größenstandard: 1 kb DNA, 100 bp DNA, supercoiled DNA ladder	NEB, Frankfurt a.M.
DNA-Größenstandard: λ DNA HindIII fragments	Invitrogen, Karlsruhe

dNTP mix [10 mM]	Epicentre Biotechnologies, Madison, USA
D-PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure 96 %	AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolut p.A.	AppliChem, Darmstadt
Fibrinogen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin 87 % p.A.	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	Roth, Karlsruhe
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt
LB-Agar, LB-Medium	Becton Dickinson, Heidelberg
D(+)-Maltose	AppliChem, Darmstadt
MacConkey-Agar Base	Becton Dickinson, Heidelberg
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ *7 H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt
Mangan(II)-Chlorid*4 H ₂ O	AppliChem, Darmstadt
Native Mark TM Unstained Protein Standard	Novex, Life Technologies, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogencarbonat (NaH ₂ CO ₃)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	AppliChem, Darmstadt
Nickel(II)-Chlorid 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ONPG	AppliChem, Darmstadt
Orange G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly-L-Lysin 0,01 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein-Free Blocking Buffer	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
Page Ruler TM Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
RNAse A	Qiagen, Hilden
Safranin O	Merck, Darmstadt
SDS 10 % Lösung	AppliChem, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
TEMED p.A.	Roth, Karlsruhe
TEO-Tricine Laufpuffer	Expedeon, Cambridge, UK
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt

TSB, TSB-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Tween20	Merck, Darmstadt
X-Gal	AppliChem, Darmstadt
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D(+)-Xylose	AppliChem, Darmstadt
Zinkchlorid (ZnCl ₂) ≥98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 2.3: Verwendete Kits

Kit	Firma
BACTH System Kit (Cat No EUK001)	Euromedex, Strasbourg
EZ-Link [®] Sulfo-NHS-Biotinylation Kit	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
PrepEase Histidine-tagged Protein Purification – Mini Kit High Specificity	usb, Staufen
PrepEase Histidine-tagged Protein Purification – Maxi Kit High Specificity	usb, Staufen
PrepEase MiniSpin Plasmid Kit	usb, Staufen
PrestoSpin D Bug DNA Purification Kit	Molzym, Bremen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 2.4: Verwendete Enzyme

Enzym	Firma
DNase I	AppliChem, Darmstadt
Lysostaphin	Vak-Chemie
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (2000 u/µl)	Thermo Scientific Life Technologies, Carlsbad, USA
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
Taq DNA-Polymerase (5 u/µl)	Segenetic, Borken

Restriktionsenzyme	Firma
<i>Bam</i> HI-HF	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Kpn</i> I-HF	NEB, Frankfurt a.M.

Tabelle 2.5: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Konzentration in $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Firma
Ampicillin	100 (in H ₂ O)	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	10 (in 70 % Ethanol)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	25 oder 50 (in H ₂ O)	Serva, Heidelberg
Nalidixinsäure	30	AppliChem, Darmstadt
Streptomycin	100 (in H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt

2.2 Antikörper

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendete Antiseren und Antikörper

Antikörper/Antiserum	Verdünnung in $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Quelle
Monoklonaler Maus Penta-His (BSA-free)-Antikörper	1:2000/1:5000	Qiagen, Hilden
Monoklonaler Maus Cya A Antikörper (3D1)	1:500	Santa Cruz, Dallas, USA
Polyklonales Kaninchen anti-T25 Antiserum	1:1000	zur Verfügung gestellt von D. Ladant (Paris); pers. Kommunikation
Polyklonaler Ziege anti-Kaninchen IgG/ AP konjugiert (0,64 g/L)	1:10000	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
Polyklonaler Ziege anti-Maus IgG/ (0,64 g/L)	1:10000	Dako, Agilent, Santa Clara, USA
Polyklonales Kaninchen anti-SasC-NT Antiserum	1:100 – 1:10000	Eurogentec, Köln
Polyklonales Kaninchen anti-SasC-DUF1542 Antiserum	1:100 – 1:10000	Eurogentec, Köln
Polyklonales Kaninchen anti-SasC-His-4 Antiserum	1:5000	Eurogentec, Köln
Polyklonales Kaninchen anti-SasC-His-5 Antiserum	1:5000	Eurogentec, Köln
Präimmunserum	1:100 – 1:10000	Eurogentec, Köln

2.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i>	TOP 10 One Shot TM	Expressionsstamm, <i>F</i> , <i>mcrA</i> $\Delta(mrr$ - <i>hsdRMS-mcrBC) <i>Phi</i> <i>80lacZ</i>Δ<i>M15</i> Δ<i>lacX74recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)$<i>7697</i> <i>galU galK rpsL (Str^R)</i> <i>endA1 nupG</i></i>	Thermo Scienti- fic Life Tech.
<i>E. coli</i>	TG-1 (pRep4)	Expressionsstamm, <i>supE</i> , <i>hsd</i> Δ <i>5</i> , <i>thi</i> $\Delta(lac$ - <i>proAB)</i> , <i>F'</i> (<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ <i>M15)</i>	[206]
<i>E. coli</i>	TG-1 (pHisSasCNT)	Expression von SasC- His-NT	Heilmann, pers. sönliche (pers.) Kommunikation
<i>E. coli</i>	UT5600 (pRep4)	Expressionsstamm, <i>F</i> , <i>ara14</i> , <i>leuB6</i> , <i>se</i> - <i>cA6</i> , <i>lacY1</i> , <i>proC14</i> , <i>tsx67</i> , $\Delta(ompTfepC)$ <i>266</i> , <i>entA403</i> , <i>trpE38</i> , <i>rfbD1</i> , <i>rpsL109</i> , <i>xyl5</i> , <i>mtl1</i> , <i>thi1</i>	[207]
<i>E. coli</i>	UT5600 (pHisSasCF1)	rekomb. F1 mit His- <i>Tag</i>	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>E. coli</i>	UT5600 (pHisSasCF2)	rekomb. F2 mit His- <i>Tag</i>	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>E. coli</i>	UT5600 (pHisSasCF3)	rekomb. F3 mit His- <i>Tag</i>	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>E. coli</i>	UT5600 (pHisSasCF4)	rekomb. F4 mit His- <i>Tag</i>	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>E. coli</i>	UT5600 (pHisSasCF5)	rekomb. F5 mit His- <i>Tag</i>	Heilmann, pers. Kommunikation

<i>E. coli</i>	UT5600 (pHisSasC-DUF)	rekomb. DUF1542 mit His-Tag	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>E. coli</i>	XL-1 Blue	Expressionsstamm, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1 lac [F'</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q lacZΔM15</i> , <i>Tn10 (Tetr)</i>]	[208]
<i>E. coli</i>	DHM1	Reporterstamm, <i>F'</i> , <i>cya-854</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96 (Na^r)</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>spoT1</i> , <i>rfbD1</i> , <i>glnV44(AS)</i>	Euromedex
<i>E. coli</i>	BTH101	Reporterstamm, <i>F'</i> , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1 (Str^r)</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Euromedex
<i>S. aureus</i>	SH1000	ATCC 35556; NCTC 8325 Derivat, <i>rsbU⁺</i>	[209]
<i>S. aureus</i>	SH1000 (pCXΔlip)	Lipasegen in (pCX19) deletiert	diese Arbeit
<i>S. aureus</i>	SH1000 (pSasC)	<i>sasC</i> -expr. Subklon	[128]
<i>S. aureus</i>	SH1000 (pSub1)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 1	[128]
<i>S. aureus</i>	SH1000 (pSub2)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 2	[128]
<i>S. aureus</i>	SH1000 (pSub3A)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 3A	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. aureus</i>	SH1000 (pSub3B)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 3B	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. aureus</i>	SH1000 (pSub5)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 5	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. aureus</i>	SH1000 (pSub6)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 6	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. aureus</i>	4074	klinisches Isolat	[210]
<i>S. aureus</i>	4074 (pCXΔlip)	Lipasegen in (pCX19) deletiert	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. aureus</i>	4074 (pSasC)	<i>sasC</i> -expr. Subklon	[128]

<i>S. aureus</i>	4074 (pSub1)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 1	[128]
<i>S. aureus</i>	4074 (pSub2)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 2	[128]
<i>S. aureus</i>	4074 (pSub3A)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 3A	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. aureus</i>	4074 (pSub3B)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 3B	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. aureus</i>	4074 (pSub5)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 5	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. aureus</i>	4074 (pSub6)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 6	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. carnosus</i>	TM300	Referenzisolat, nicht-pathogener Wildtypstamm	[211]
<i>S. carnosus</i>	TM300 (pCX Δ lip)	Lipasegen in (pCX19) deletiert	[128]
<i>S. carnosus</i>	TM300 (pSasC)	<i>sasC</i> -expr. Subklon	[128]
<i>S. carnosus</i>	TM300 (pSub1)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 1	[128]
<i>S. carnosus</i>	TM300 (pSub2)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 2	[128]
<i>S. carnosus</i>	TM300 (pSub3A)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 3A	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. carnosus</i>	TM300 (pSub3B)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 3B	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. carnosus</i>	TM300 (pSub5)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 5	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. carnosus</i>	TM300 (pSub6)	<i>sasC</i> -expr. Subklon 6	Heilmann, pers. Kommunikation
<i>S. epidermidis</i>	RP62A	ATCC 35984; klinisches Isolat, Methicillin-resistent, biofilmbildend	[212]

Tabelle 2.8: Übersicht über die verwendeten Vektoren und Plasmide

Plasmid	Empfänger- stamm	Beschreibung	Referenz
pQE30Xa	<i>E. coli</i> TG-1	Expressionsvektor, His- <i>Tag</i> , Faktor Xa- Schnittstelle, Amp ^r	diese Arbeit Abb. 4.11
pQE-SasC(His-)F1	<i>E. coli</i> TG-1	Klonierungsvektor (pQE30Xa) mit SasC- (His-)F1 [T ⁴⁰ -N ²⁶⁸]	Abb. diese Ar- beit 4.11
pQE-SasC(His-)F2	<i>E. coli</i> TG-1	Klonierungsvektor (pQE30Xa) mit SasC- (His-)F2 [S ²⁸⁴ -S ⁴²³]	diese Arbeit Abb. 4.11
pQE-SasC(His-)F3	<i>E. coli</i> TG-1	Klonierungsvektor (pQE30Xa) mit SasC- (His-)F3 [S ⁴³⁰ -S ⁵⁷¹]	diese Arbeit Abb. 4.11
pQE-SasC(His-)F4	<i>E. coli</i> TG-1	Klonierungsvektor (pQE30Xa) mit SasC- (His-)F4 [S ²⁸⁴ -S ⁵⁷¹]	diese Arbeit Abb. 4.11
pQE-SasC(His-)F5	<i>E. coli</i> TG-1	Klonierungsvektor (pQE30Xa) mit SasC- (His-)F5 [N ⁵⁹⁰ -T ⁶⁵⁴]	diese Arbeit Abb. 4.11
pUT18C	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	Expressionsvektor für T18-Fusionsproteine	Euromedex
pUT18C-SasC-NT	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pUT18C) mit SasC-NT [T ⁴⁰ -T ⁶⁵⁴]	diese Arbeit
pUT18C-SasC-F1	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pUT18C) mit SasC-F1 [T ⁴⁰ -N ²⁶⁸]	diese Arbeit
pUT18C-SasC-F2	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pUT18C) mit SasC-F2 [S ²⁸⁴ -S ⁴²³]	diese Arbeit
pUT18C-SasC-F3	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pUT18C) mit SasC-F3 [S ⁴³⁰ -S ⁵⁷¹]	diese Arbeit

pUT18C-SasC-F4	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pUT18C) mit SasC-F4 [S ²⁸⁴ -S ⁵⁷¹]	diese Arbeit
pUT18C-SasC-F5	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pUT18C) mit SasC-F5 [N ⁵⁹⁰ -T ⁶⁵⁴]	diese Arbeit
pUT18C-SasC- DUF1542 1-6	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pUT18C) mit SasC- DUF1542 1-6 [T ⁶⁵⁴ - A ¹²⁰²]	diese Arbeit
pUT18C- <i>zip</i>	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH109	(pUT18C) mit Leucin- <i>zipper</i> -Motiv	Euromedex
pKT25	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH110	Expressionsvektor für T25-Fusionsproteine	Euromedex
pKT25-SasC-NT	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pKT25) mit SasC-NT [T ⁴⁰ -T ⁶⁵⁴]	diese Arbeit
pKT25-SasC-F1	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pKT25) mit SasC-F1 [T ⁴⁰ -N ²⁶⁸]	diese Arbeit
pKT25-SasC-F2	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pKT25) mit SasC-F2 [S ²⁸⁴ -S ⁴²³]	diese Arbeit
pKT25-SasC-F3	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pKT25) mit SasC-F3 [S ⁴³⁰ -S ⁵⁷¹]	diese Arbeit
pKT25-SasC-F4	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pKT25) mit SasC-F4 [S ²⁸⁴ -S ⁵⁷¹]	diese Arbeit
pKT25-SasC-F5	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pKT25) mit SasC-F5 [N ⁵⁹⁰ -T ⁶⁵⁴]	diese Arbeit
pKT25-SasC- DUF1542 1-6	<i>E. coli</i> XL- 1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pKT25) mit SasC- DUF1542 1-6 [T ⁶⁵⁴ - A ¹²⁰²]	diese Arbeit

pKT25- <i>zip</i>	<i>E. coli</i> XL-1 <i>Blue</i> , DHM1, BTH101	(pKT25) mit Leucin- <i>zipper</i> -Motiv	Euromedex
-------------------	--	--	-----------

2.4 Primer und Primersequenzen

Die in Tabelle 2.9 aufgelisteten Primer wurden mit verschiedenen Online-Tools designed und anschließend von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Mit Ausnahme der pQE-Sequenzierungsprimer, welche von MWG firmenintern verwendet werden. Sequenzierungen wurden über den *Tube Sequencing Service* von MWG durchgeführt.

Kursiv und unterstrichene Sequenzen kennzeichnen zusätzlich angefügte Basen, kursive fett gedruckte Sequenzen verdeutlichen Restriktionsschnittstellen. *Forward* Primer beinhalten eine GGATCC-*Bam*HI-Schnittstelle, *reverse* Primer besitzen eine GGTAAC-*Kpn*I-Schnittstelle.

Tabelle 2.9: Übersicht über die verwendeten Primer

Primer	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
SasC-F1-NT_B2H_ <i>for</i>	<u>TTAGGATC</u> CCTACGGAT-AATAATGTACAAAGCGA-ATAC	Klonierung von SasC-F1 und SasC-NT in (pUT18C), (pKT25)
SasC-F1_pQE_ <i>for</i>	<u>GAACTGGATCC</u> ACGGA-TAATAATGTACAAAGCG-ATAC	Klonierung von SasC-F1 in (pQE30Xa)
SasC-F1_pQE-B2H_ <i>rev</i>	<u>TAGGGTACC</u> AATTAT-CAACAACGTGTTACTGAT-GGTAC	Klonierung von SasC-F1 in (pQE30Xa), (pUT18C), (pKT25)
SasC-F2-F4_B2H_ <i>for</i>	<u>TTAGGGATC</u> CTAGTCA-TGCAATGGTAAGAAC-GAGC	Klonierung von SasC-F2 und SasC-F4 in (pUT18C), (pKT25)
SasC-F2-F4_pQE_ <i>for</i>	<u>GAACTGGATCC</u> AGT-CATGCAATGGTAAGAA-CGAGC	Klonierung von SasC-F2 und SasC-F4 in (pQE30Xa)
SasC-F2_pQE-B2H_ <i>rev</i>	<u>TAGGGTACC</u> TAGAG-TCAACAAAGCTATAGT-ATTTG	Klonierung von SasC-F2 in (pQE30Xa), (pUT18C), (pKT25)

SasC-F3_B2H_for	<u>TTAGGGATCC</u> GTCA- CATGTTTATGTTGAAAGA- CGAAC	Klonierung von SasC-F3 in (pUT18C), (pKT25)
SasC-F3_pQE_for	<u>GAACTGGATCC</u> TAC- ATGTTTATGTTGAAAGA- CGAAC	Klonierung von SasC-F3 in (pQE30Xa)
SasC-F3-F4_pQE- B2H_rev	<u>TAGGGTACC</u> CCTGAA- TTAATGAAATCTTGTGT- ATATG	Klonierung von SasC- F3 und SasC-F4 in (pQE30Xa), (pUT18C), (pKT25)
SasC-F5_B2H_for	<u>TTAGGGATCC</u> GAATAAA- GATGCATTACAAGCCG- AAG	Klonierung von SasC-F5 in (pUT18C), (pKT25)
SasC-F5_pQE_for	<u>GAACTGGATCC</u> AAT- AAAGATGCATTACAAGCC- GAAG	Klonierung von SasC-F5 in (pQE30Xa)
SasC-F5_B2H_rev	<u>TAGGGTACC</u> AAACTT- CGAATTAACGTATGTTG- CATC	Klonierung von SasC- F5 in (pQE30Xa), (pUT18C), (pKT25)
SasC-DUF15421- 6_B2H_for	<u>TTAGGGATCC</u> TACT- TTAATTCGAAGTGTTGAT- GCTGAA	Klonierung von SasC- DUF1542 Domänen 1-6 in (pUT18C), (pKT25)
SasC-DUF15421- 6_B2H_rev	<u>TAGGGTACC</u> GTGCT- AATGCTGCAGGTTTTTTT- ACAAT	Klonierung von SasC- DUF1542 Domänen 1-6 in (pUT18C), (pKT25)
pUT18C_for	GCTGTTCGACGATGG- GCTGG	Sequenzierung von (pUT18C)-SasC- Konstrukten
pUT18C_rev	CCTGTGACACATGCAGCT- CCC	Sequenzierung von (pUT18C)-SasC- Konstrukten
pUT18C+SasC-NT_for	GCTGGCACGACAGGTTT- CCCGAC	Sequenzierung von (pUT18C)-SasC- Konstrukten inkl. T18- Untereinheit

pUT18C+SasC-NT_ <i>int</i> <i>rev</i>	CATTAGGATCTGCCGGT- GC CGCACG	Sequenzierung (pUT18C)-SasC- Konstrukten inkl. T18- Untereinheit	von
pKT25_ <i>for</i>	GGCGCGCAGTTCGGT- GACCAG	Sequenzierung (pKT25)-SasC- Konstrukten	von
pKT25_ <i>rev</i>	GGGAAGGGCGATCGG- TGCGGG	Sequenzierung (pKT25)-SasC- Konstrukten	von
pKT25+SasC-NT_ <i>for</i>	CGGTACTGCCGGGCCTC- TTGC	Sequenzierung (pKT25)-SasC- Konstrukten inkl. T25- Untereinheit	von
pKT25+SasC-NT_ <i>int</i> <i>rev</i>	GGTTCAGCAATTGCAA- CTACTCTGG	Sequenzierung (pKT25)-SasC- Konstrukten inkl. T25- Untereinheit	von
pQE_ <i>for</i>	GTATCACGAGGCCCTTTC- GTCT	Sequenzierung (pQE30Xa)-SasC- Konstrukten	von
pQE_ <i>rev</i>	CATTACTGGATCTAT- CAACAGGAG	Sequenzierung (pQE30Xa)-SasC- Konstrukten	von

3 Methoden

3.1 Anzucht und Kultivierung von Bakterien

Bakterien wurden auf Agarplatten oder in Flüssigmedium angezogen. Staphylokokken wurden in TSB-Medium oder auf TSA-Platten bei 37 °C kultiviert und für weitere Verwendung bis max. 4 Wochen bei 4 °C gelagert. *E. coli*-Kulturen wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agar bei 37 °C angezogen und für weitere Verwendung bis max. 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Flüssigkulturen wurden im Schikanekolben bei 37 °C und bei 160 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Gegebenenfalls wurde dem Medium ein Antibiotikum zugegeben. Für die längerfristige Lagerung und Stammhaltung in der Kryosammlung wurden Einfrierröhrchen verwendet, die TSB bzw. LB mit 20 % Glycerin und ggf. Antibiotika enthielten. Diese wurden mit frischer Kultur inokuliert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei –80 °C eingefroren.

Tabelle 3.1: **Zusammensetzung der verwendeten Medien und Nährböden**

TSB		TSB-Agar	
Tryptic Soy Broth	30 g	Tryptic Soy Broth	30 g
ddH ₂ O	ad 1 L	Agar	15 g
pH	7,2	ddH ₂ O	ad 1 L
		pH	7,2
LB-Medium		LB-Agar	
Pepton (Trypton)	10 g	Pepton (Trypton)	10 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
ddH ₂ O	ad 1 L	Agar	15 g
pH	7,3	ddH ₂ O	ad 1 L
		pH	7,3

3.2 Arbeiten mit DNA

Genomische DNA und Plasmide wurden bei 4 °C bzw. für längere Lagerung bei –20 °C gelagert. Für die Versuche wurden ausschließlich Nuklease-freies Reinstwasser und -chemikalien verwendet. Zur Isolierung von Nukleinsäuren wurden Bakterien auf Agarplatten frisch ausgestrichen. Nach der Inkubation wurde

das Zellmaterial mit einer Impföse aufgenommen. Für größere Ansätze, wie eine Plasmid Midi-Prep, wurde eine Flüssig- Übernachtskultur (ÜNK) angesetzt.

3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Staphylokokken

Um genomische DNA aus *S. aureus* SH1000 zu isolieren, wurde das PrestoSpin D Bug DNA Purification Kit verwendet. Material von einer frisch bewachsenen TSA-Platte mit ($10 \frac{\text{mg}}{\mu\text{l}}$) wurde in 200 μl TE-Puffer resuspendiert und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 μl RS-Puffer aufgenommen. Für die Lyse der Zellwand wurden 10 μl Lysostaphin ($2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) dazugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 250 μl CH-Puffer wurde der Ansatz 5 s gevortext, mit einer Pipettenspitze homogenisiert und 5 min stehen gelassen bis das Lysat vollständig klar war. Im Anschluss wurden 200 μl AB-Puffer dazugegeben, der Ansatz wiederum 5 s gevortext und auf eine Säule gegeben. Die beladene Säule wurde 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 400 μl WB-Puffer gewaschen, erneut für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Ein weiterer Waschschrift mit 250 μl 70 % und Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm wurde durchgeführt. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml ERG gegeben und die gebundene DNA mit 75 μl EB-Puffer (erwärmt auf 70 °C) für 1 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend 1 min bei 13000 rpm eluiert. Ein Aliquot wurde für die Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese verwendet, das restliche Volumen für Klonierungsexperimente.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung TE-Puffer

TE-Puffer	
Tris/HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH	8,0

3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus Staphylokokken- und *E. coli*-Stämmen wurde mit dem PrepEase MiniSpin Plasmid Kit isoliert. Material von einer frisch bewachsenen Platte wurde in 250 μl A1-Puffer (mit RNase A) suspendiert. Für die Plasmidisolierung aus Staphylokokken wurden dem Resuspensionspuffer 10 μl Lysostaphin ($2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) zugesetzt und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellwandlyse zu ermöglichen. Anschließend wurden 250 μl A2-Puffer hinzugegeben, der Ansatz 6-8 x invertiert und 2 - 3 min bei RT inkubiert. Dann wurden 300 μl A3-Puffer hinzugegeben und der Ansatz 6-8 x invertiert. Bei diesem Schritt fallen Proteine, Lipide und Kohlenhydrate aus. Das Lysat wurde dann durch Zentrifugation für 5 min bei 11000 g geklärt. Eine PrepEaseTM Mini Spin-Säule wurde in ein 2 ml ERG gegeben, das Lysat auf die Säule gegeben und alles für 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die

Säule, mit der darin gebundenen Plasmid-DNA, mit 450 µl AQ-Puffer (mit Ethanol) gewaschen und für 4 min bei 11000 g zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues 1,5 ml ERG gesetzt und 50 µl AE-Puffer darauf gegeben. Nach einer einminütigen Inkubation bei RT wurde die Plasmid-DNA bei 1 min und 11000 g eluiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Waren viele Klone zu überprüfen, wurde ein alternatives Protokoll verwendet. Dafür wurde frisches bakterielles Material in 150 µl P1-Puffer, versetzt mit 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ RNase A, suspendiert. Dann wurden 150 µl P2-Puffer hinzugegeben und der Ansatz 5 x invertiert. Nach Zugabe von 150 µl P3-Puffer wurde das ERG erneut 5 x invertiert und anschließend für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues ERG überführt und 900 µl 100 % Ethanol hinzugegeben. Der Ansatz wurde 5 x invertiert und dann 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die gefällte DNA mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet luftgetrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 25 µl TE-Puffer aufgenommen. Um höhere Ausbeuten, für z. B. präparative Isolierungen für Klonierungsexperimente zu erhalten, wurde für *low copy*-Plasmide, wie (pKT25) (Abschnitt 3.5.3) eine Hauptkultur (LB + Antibiotika) von 100 ml, für *high copy*-Plasmide, wie (pUT18C) (Abschnitt 3.5.3) oder (pQE30Xa) eine Hauptkultur (LB + Antibiotika) von 25 ml angesetzt und die Plasmid-DNA wie oben beschrieben, isoliert.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um isoliertes genetisches Material qualitativ und quantitativ zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Abhängig von der Größe der zu trennenden Nukleinsäuren wurden 1 %ige oder 2 %ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Dazu wurde Agarose in einem entsprechenden Volumen 1 x TAE-Puffer gelöst. Vor der Durchführung der Elektrophorese wurden die Proben mit 6 x 2-Dye-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100-150 V in 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Anschließend wurde das Agarosegel 20-30 min in Ethidiumbromid gefärbt, danach 10 min in einem Wasserbad entfärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Referenz wurden 1 kb-Marker, *supercoiled* DNA-Marker oder λ DNA *HindIII*-Marker verwendet.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung TAE-Puffer und 2-Dye (6x)-Probenpuffer

TAE-Puffer		Probenpuffer 2-Dye (6x)	
Tris	4 mM	Tris/HCl	10 mM
EDTA	2 mM	Glycerin	60 %
pH	8,0	Xylene Cyanol FF	0,03 %
		Orange F	0,2 %

3.2.4 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Um Restriktionsschnittstellen in Plasmide einzuführen oder an DNA-Fragmente (PCR-Produkte) anzufügen, wurde eine enzymatische Restriktion der Nukleinsäuren durchgeführt. Ein enzymatischer Testverdau wurde in einem Volumen von 20 µl für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Verdau für präparative Restriktionen wurden in einem Volumen von 100 µl bei gleichen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3.4: **Analytischer Restriktionsansatz**

Ansatz)	
DNA-Lösung	x µl
Enzym	2 Units
Puffer (10x)	2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Für die Klonierungsexperimente wurden die Vektoren (pQE30Xa), (pUT18C) und (pKT25), sowie *sasC*-PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kpn*I behandelt. Aufgrund der unterschiedlich benötigten Pufferbedingungen ist kein gleichzeitiger Doppelverdau mit beiden Enzymen möglich. Die Nukleinsäuren wurden sequentiell mit beiden Enzymen geschnitten. Nach der ersten Restriktion mit *Bam*HI wurde der Ansatz mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und in 15 µl TE-Puffer eluiert. Der gesamte Ansatz wurde dann für die zweite Restriktion mit *Kpn*I eingesetzt.

3.2.5 Reinigung von Nukleinsäuren

Um PCR-Produkte von überschüssigen Primern, dNTPs und Polymerase oder Plasmid-DNA von Restriktionsenzymen (bei sequentiellem Doppelverdau) zu befreien, wurde das QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Zuerst wurde das 5-fache Probenvolumen an PB-Puffer hinzugegeben und der Ansatz auf eine QIAquick-Säule gegeben. Diese wurde dann 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer zum Waschen der Nukleinsäuren auf die Säule gegeben und das Ganze erneut 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut für 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert um restliches Ethanol aus dem PE-Puffer zu entfernen. Die DNA wurde anschließend, durch Zentrifugation für 60 s bei 13000 rpm, in 30 µl EB-Puffer eluiert.

3.2.6 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische Gensequenzen vervielfältigt werden. Für die Amplifizierung von Genen und Genabschnitten aus genomischer DNA oder aus Plasmiden verschiedener *E. coli*- und Staphylokokkenstämme wurden mit Hilfe der Onlinetools *Primer3*, *OligoCalc* und *PrimerAnneal* passende *forward* und *reverse* Primer konstruiert. In Tabelle 3.5 sind die Reaktionsansätze und PCR-Programme für eine Amplifikation mit der Phusion[®]-Polymerase zusammengefasst.

Für eine Colony-PCR von *E. coli*-Klonen wurde mit einer Impföse bakterielles Material von einer frisch überimpften Agarplatte in den vorbereiteten PCR-Mastermix überführt. Um die Zellen aufzuschließen, wurde der Ansatz vor dem eigentlichen PCR-Programm für 10 min auf 95 °C erhitzt (siehe Tabelle 3.5). Mit einer Colony-PCR kann eine große Anzahl von Klonen parallel auf das Vorhandensein und die Richtigkeit der Größe von klonierten SasC-Fragmenten (in (pQE390Xa), (pUT18C) oder (pKT25)) überprüft werden.

Tabelle 3.5: **Phusion[®] High-Fidelity-PCR und Colony-PCR**

Reaktionsansatz für Phusion [®] High-Fidelity-PCR und Colony-PCR		Cycler-Programm für Phusion [®] High Fidelity-PCR und Colony-PCR		
Template	1 µl bzw. Kolonie	1x	95 °C	10 min
Primer <i>forward</i>	0,2 pM	1x	98 °C	30 sec
Primer <i>reverse</i>	0,2 pM	30x	98 °C	10 sec
dNTPs	15 pM		50,7 °C	30 sec
Phusion DNA-Pol	2 Units 15-30 s/kb		72 °C	1,5 min
HF Puffer (5x)	4 µl	1x	72 °C	7 min
ddH ₂ O	ad 20 µl		12 °C	∞

Um die optimale Annealing-Temperatur für die Amplifizierung der im Rahmen dieser Arbeit klonierten N-terminalen SasC-Fragmente zu identifizieren, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt (Tabelle 3.6). Bei einer Gradienten-PCR werden stufenweise mehrere Annealing-Temperaturen (hier: 50,0 °C, 50,7 °C, 52,0 °C, 53,7 °C, 56,2 °C, 58,1 °C, 59,3 °C und 60,0 °C) getestet. Die Temperatur, welche das sauberste Produkt in hoher Ausbeute lieferte, wurde für die nachfolgenden PCR-Reaktionen mit diesem Primerpaar verwendet.

Tabelle 3.6: **Gradienten-PCR**

Ansatz für Gradienten-PCR		Cycler-Programm für Gradienten-PCR		
Template	1 µl	1x	94 °C	4 min
Primer <i>forward</i>	0,2 pM	30x	94 °C	30 sec
Primer <i>reverse</i>	0,2 pM		50-60 °C	30 sec
dNTPs	15 pM		72 °C	2 min
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	2 Units (1 min /kb)	1x	68 °C	7 min
Puffer A (10x)	2,5 µl		12 °C	∞
ddH ₂ O	ad 25 µl			

3.2.7 Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten

Um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen, wurde das genetische Material zur Sequenzierung zu Eurofins MWG Operon geschickt. Dafür wurden 50-100 ng der DNA, ggf. mit 10 pmol der entsprechenden Primer eingeschickt.

3.2.8 Klassische Klonierungsstrategie

Nach der präparativen Restriktion wurden Vektor und Insert (PCR-Produkt) gereinigt (Abschnitt 3.2.5) und die Konzentration der Insert-DNA und des linearisierten Vektors durch Vergleich mit dem Größenstandard λ DNA *Hind*III auf einem Agarosegel abgeschätzt. Die Ligation erfolgte mit der T4 DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20 μ l bei 16 °C über Nacht. Vektor und Insert wurden in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:5 eingesetzt. Dies wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{ng}(\text{Vektor}) * \text{kb}(\text{PCR-Produkt}) * 5}{\text{kb}(\text{Vektor})} = \text{ng}(\text{PCR-Produkt}) \quad (3.1)$$

Als Religationskontrolle wurde in einem Ansatz der linearisierter Vektor mit T4 DNA-Ligase versetzt. Vor Zugabe der T4 DNA-Ligase und nach Ende der Ligationsreaktion wurden 1,5 μ l des Ansatzes entnommen und der Erfolg der Ligation mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Im Anschluss wurde der Ligationsansatz in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert (Abschnitt 3.3.2, 3.3.4).

3.3 Genetische Manipulation von Bakterien

3.3.1 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*

Eine Hauptkultur von 500 ml wurde mit 2,5 ml einer *E. coli*-ÜNK inokuliert und bei 37 °C, 160 rpm inkubiert bis die Kultur eine $OD_{600\text{nm}}$ von 0,5-0,6 erreichte. Die Zellen wurden für 10-15 min auf Eis gestellt, anschließend in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 2 °C für 20 min bei 4200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Danach wurden 500 ml eiskaltes Wasser dazugegeben und der Ansatz erneut 20 min bei 4200 rpm bei 2 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort vorsichtig abgenommen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Es wurden nochmals 500 ml Eiswasser dazugegeben und der Zentrifugations-schritt wiederholt. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in 40 ml eisgekühltem Glycerin (10 %) resuspendiert, die Zellen für 10 min bei gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Volumen des Pellets wurde abgeschätzt und im selben Volumen Glycerin (10 %) resuspendiert. Aliquots zu je 50 μ l wurden bei -80 °C eingefroren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für verschiedene Experimente die *E. coli*-Stämme XL-1 *Blue*, TG-1, DHM1 und BTH101 elektrisch kompetent gemacht.

3.3.2 Transformation elektro-kompetenter *E. coli*

Ein Aliquot von 50 μ l elektro-kompetenter Zellen wurde für 20 min auf Eis aufgetaut, 1–2 μ l der zu transformierenden DNA dazugegeben und der Ansatz für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in eine Elektroporationsküvette gegeben und elektroporiert. Nach dem Elektropuls wurden 950 μ l vorgewärmtes LB-Medium dazugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C, 300 rpm inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Selektivagar ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Pro eingesetztem Mikroliter DNA können 10^9 Transformanten erwartet werden. Für Interaktionsstudien mittels BACTH (Abschnitt 3.5.3) wurden die *E. coli* DHM1-Co-Transformanten 48 h bei 30 °C inkubiert.

3.3.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*

Das Prinzip der chemischen Kompetenz beruht auf der Steigerung der Aufnahmefähigkeit der Bakterien für Fremd-DNA durch Änderung der Durchlässigkeit ihrer Membran, aufgrund eines Überschusses an Kalziumionen [213]. Eine Hauptkultur von 500 ml wurde mit einer *E. coli*-ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C, 160 rpm inkubiert bis die Kultur eine OD_{600 nm} von 0,3 erreicht hat. Anschließend wurde die Hauptkultur auf die entsprechende Anzahl von 50 ml-Falcons aufgeteilt und 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet in eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und dann mit 50 mM CaCl₂ auf 20 ml aufgefüllt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und für weitere 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 2,5 ml CaCl₂ resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert und dann zu je 100 μ l aliquotiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für verschiedene Experimente die *E. coli*-Stämme XL-1 *Blue* und BTH101 chemisch kompetent gemacht.

3.3.4 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*

Es wurden nur frische chemisch-kompetente Zellen für Transformationen verwendet. Zu einem Aliquot Zellen wurden 1–2 μ l der zu transformierenden DNA gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1,5–2 min bei 42 °C im Thermoblock wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zum Transformationsansatz gegeben und für 1 h bei 37 °C schüttelnd (300 rpm) inkubiert. Verschiedene Volumina wurden anschließend auf Selektivagar ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für die Expression von His-SasC-Fusionsproteinen wurden die *One ShotTM TOP10 Chemically Competent E. coli* verwendet. Für Interaktionsstudien mittels BACTH (Abschnitt 3.5.3) wurden die *E. coli* BTH101-Co-Transformanten 48 h bei 30 °C inkubiert.

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 Herstellung von Zellysaten für Proteinexpressionstests

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden von transformierten *E. coli*-Stämmen Zellysate hergestellt. Eine Übernachtskultur von 5 ml LB und ggf. versetzt mit Antibiotika wurde mit Material eines frisch gewachsenen *E. coli*-Stammes beimpft. Die Hauptkultur wurde dann 1:50 mit der nicht-induzierten Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C mit 160 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Vor der Induktion der Proteinexpression wurde eine Probe (1 ml) entnommen, für 2 min bei 11 000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 50 µl 1 x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Expression der SasC-His-Proteine in *E. coli* UT5600 und TG-1 wurde mit 1 mM IPTG, die T18- und T25-SasC-Fusionsproteine in *E. coli* DHM1 und BTH101 mit 0,5 mM IPTG induziert. Die induzierte Kultur wurde für weitere 5 h bei 37 °C, 160 rpm inkubiert. Anschließend wurde erneut 1 ml Probe entnommen, zentrifugiert und das Pellet in Ladepuffer aufgenommen. Beide Proben wurden zur Überprüfung der Proteinexpression herangezogen und mittels SDS-PAGE analysiert. Für die Herstellung von Zellysaten aus *E. coli* DHM1- und *E. coli* BTH101-Stämmen wurden verschiedene Bedingungen ausgetestet. So wurden die Kulturen ebenfalls bei 30 °C inkubiert, da die Interaktion in den Reporterstämmen bei niedrigeren Temperaturen effektiver ist.

3.4.2 Präparative Reinigung von SasC-His-Fusionsproteinen

Nach der Induktion der Proteinexpression (Abschnitt 3.4.1) für 5 h wurde die Kultur für 20 min bei 4200 rpm zentrifugiert und die Pellets bei -20 °C eingefroren (modifiziert nach Protokoll 8; QIAexpressionist 06/2003). In dieser Arbeit wurden die SasC-His-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen gereinigt. Für Kulturen mit einem Volumen von bis zu 50 ml wurde das PrepEase Histidine-tagged Protein Purification Mini Kit High Specificity verwendet; für Kulturen mit bis zu 300 ml das Maxi Kit.

Die Protein-Reinigungsmethode basiert auf einer immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, IMAC*) mit Ni²⁺-TED beladenen Säulen. Für die Reinigung von His-tagged Proteinen unter nativen Bedingungen wurde die geerntete *E. coli*-Kultur in 1 x LEW-Puffer resuspendiert und Lysozym zu einer Endkonzentration von 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 10x für 15 s mit Ultraschallpulsen behandelt und anschließend 5 $\frac{\text{µg}}{\text{ml}}$ DNaseI zugegeben und der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Das Zellysat wurde dann durch Zentrifugation (30 min bei 10 000 rpm und 4 °C) gewonnen. Der Überstand wurde dann auf eine mit LEW-Puffer äquilibrierte Ni-TED-Säule gegeben. Alle gewonnenen Fraktionen wurden in separaten Falcons gesammelt und ein Aliquot mittels SDS-PAGE analysiert. Falls keine Modifikationen der Bedingungen durchgeführt werden mussten, wurde die Säule zweimal mit 1 x LEW gewaschen und das gebundene Protein anschließend in drei Elutionsfraktionen gesammelt.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Wasch- und Elutionspuffer für native Proteinreinigung

LEW-Waschpuffer		Elutionspuffer	
NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
pH	8,0	Imidazol	250 mM
		pH	8,0

3.4.3 Konzentrationsbestimmung und Entsalzung von Proteinen

Bradford-Assay Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde spektroskopisch mit dem *Coomassie Plus Protein Bradford Assay Reagenz* gemessen [214]. Bei diesem Färbeassay ist das Resultat abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des gemessenen Proteins. Zuerst wurde eine Kalibrationsgerade mit einem Albumin Standard (BSA) erstellt. Von jeder bekannten Standardkonzentration und jeder zu vermessenden Probe wurden 10 µl in die Vertiefungen einer 96 x Mikrotiterplatte gegeben und 300 µl des Coomassie-Reagenz hinzugefügt. Die Lösungen wurden für 30 s geschüttelt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 595 nm gemessen, die Standardwerte grafisch aufgetragen und die Konzentration der unbekanntenen Proben bestimmt. Als Leerwert diente Coomassie-Reagenz ohne Zusatz; der Standard und die Proben wurden in Triplikaten gemessen.

Alternativ wurden die mit Coomassie gefärbten Proteinbanden mit dem ChemiDoc™ Touch Imaging System mit einer Belichtungszeit von 0,625 sec aufgenommen und die Intensität mit dem Programm *Image Lab* bestimmt. Als Referenzproben dienten hier BSA-Proben bekannter Konzentration.

Entsalzen und Umpuffern von Proteinen mittels Gelfiltration Um die gereinigten Proteine von Detergenzien und Imidazol zu befreien, wurden die Elutionsfraktionen in 300 mM NaCl und 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0) umpuffert. Zur Proteinentsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen von Volumina bis 2,5 ml (Maxi-Aufreinigungsansatz) wurden, die mit Sephadex gepackten, illustra NAP-25 Säulen verwendet. Nachdem der sich auf den Säulen befindende Lagerungspuffer durch die Säule durchgeflossen war, wurde diese mit 25 ml LEW-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinproben (maximal 2,5 ml) auf die Säule gegeben und 3 x mit 3,5 ml LEW-Puffer eluiert, nachdem die Probe zuvor vollständig in die Gelmatrix der Säule eingedrungen war. Von allen Eluaten wurden Aliquots von 10 µl mittels SDS-PAGE analysiert und das restliche Volumen für spätere Interaktionsstudien bei -20 °C gelagert.

3.4.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese Proteinproben wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem Glycin-SDS-Laufpuffergemisch analysiert. Durch die Verwendung von SDS werden die Eigenladungen der Proteine überlagert und können über ihr unterschiedliches Molekulargewicht aufgetrennt werden. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 5 x SDS-

Ladepuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C aufgeköcht, um Wasserstoffbrückenbindungen von Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzuspalten. Durch Zugabe von reduzierenden Verbindungen wie β -Mercaptoethanol werden noch vorhandene Disulfidbrücken gespalten. Anschließend werden die Proben kurz abzentrifugiert. Abhängig von der Größe der zu analysierenden Proben (Proteine oder Proteingemische wie z. B. Zellysate) wurden SDS-Gele mit 7,5 %, 10 % und 12 % oder 13,5 % verwendet. Die Gele wurden zu Beginn für 20 min an konstante 90 V angeschlossen. Anschließend wurde für die restliche Zeit die Spannung auf 160 V erhöht. 10 % und 12,5 %ige Gele wurden teilweise als Fertiggele der Firma Expedeon oder von Bio-rad verwendet. Höher- oder niederprozentige Gele wurden selbst hergestellt. Die Gele wurden für 30 min mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt und anschließend entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Tabelle 3.8: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese Puffer und Lösungen

SDS-Ladepuffer (5x)		Laufpuffer für Tris/Glycin-Gele	
Tris/HCl (pH 6,8)	62,5 mM	Glycin	120 mM
Bromphenolblau	0,178 mM	Tris	25 mM
Glycerin	20 % (v/v)	10 % SDS	10 ml
SDS	3 % (v/v)		
β -Mercaptoethanol	8 % (v/v)		
Coomassie-Färbelösung		Entfärbelösung	
Coomassie Brilliant Blau G250	0,1 % (w/v)	Ethanol	40 % (v/v)
Ethanol	40 % (v/v)	Essigsäure	10 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)		

Für die *RunBlue SDS Protein-Gele* von Expedeon wurde Tricin-Puffer als Laufpuffer verwendet. Als Referenz und Größenstandard wurden 6 μ l *Page Ruler Prestained Protein Ladder* aufgetragen.

Native Polyacrylamidgelelektrophorese Um die Funktionalität von Proteinen auch nach einer elektrophoretischen Auftrennung zu gewährleisten, wurde eine native PAGE durchgeführt, bei welcher die native Faltung (natürliche Konformation) der Proteine erhalten bleibt. Eine native PAGE ist, wie die SDS-PAGE, eine diskontinuierliche Form der Elektrophorese in einem Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem. Im Unterschied zur normalen SDS-PAGE wird bei der nativen PAGE auf die Zugabe von Detergenzien wie SDS und β -Mercaptoethanol verzichtet. Dadurch bleiben die Disulfidbrücken der tertiären Proteinstruktur erhalten. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach ihrem isoelektrischen Punkt, da die Nettoladungsdichte nicht von der negativen Ladung von SDS-Molekülen überdeckt wird und nach dem hydrodynamischen Volumen des Proteins. Als Größenstandard wird hierfür auch ein nativer Proteinmarker verwendet.

3.4.5 Western Blot

Um den Erfolg von Proteinreinigungen und Proteinexpressionen zu überprüfen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Proteinproben oder Zellysate wurden mittels SDS-PAGE oder nativer PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür wurde das Gel nach der Elektrophorese für 3 min bei RT in Transferpuffer gelegt und anschließend ein Semi-Dry Western Blot durchgeführt. Dabei wurde für 20 min eine geringe Spannung von 15 V angelegt. Die Membran wurde dann für 1 h bei RT schüttelnd in *Protein-free blocking buffer* inkubiert, um überschüssige Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran 3 x für 8 min in TBS-T gewaschen und anschließend für 1 h oder 1,5 h, abhängig vom verwendeten primären Antikörper oder Antiserum, bei RT inkubiert. In dieser Arbeit wurden sowohl monoklonale Antikörper als auch polyklonale Antiseren verwendet. Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1:5000 oder 1:10000 (Abschnitt 2.6) in TBS-T + 0,3 % BSA eingesetzt. Monoklonale Antikörper wurden 1:2000 in TBS-T + 0,3 % BSA eingesetzt. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift von 3 x 8 min mit TBS-T. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in TBS-T + 0,3 % BSA, dazugegeben. Nach einer 1- bis 2-stündigen Inkubation (2 h bei Verwendung des anti-T25-Antiserums) bei RT wurde die Membran erneut 3 x 8 min mit TBS-T gewaschen. Die verwendeten sekundären Antikörper sind mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert, einem Enzym, welches das NBT/BCIP-Farbreakenz zu einem unlöslichen Indigo-Farbstoff umsetzt und so Proteinbanden auf der Membran sichtbar macht.

Tabelle 3.9: **Zusammensetzung Transfer-Puffer**

Transfer-Puffer	
Tris BASE	30,3 g
Glycin	16,9 g
ddH ₂ O	ad 1 L

3.5 Protein-Protein-Interaktionsstudien

3.5.1 Biotinylierung von Proteinen und Western Liganden-Blot

Mittels Biotinylierung können Proteine so markiert werden, dass ihre normale biologische Funktionalität nur gering beeinflusst wird. Mit einer Größe von 244 Da ist das Biotinmolekül sehr klein, was den Einfluss auf die Aktivität von größeren Proteinen minimiert und es erlaubt, dass mehrere Biotinmoleküle an ein einzelnes Protein konjugiert werden können. Die Bindung an ein Protein kann mit dessen Funktion interferieren, wenn das Biotinylierungsreagenz an Aminosäuren bindet, welche die Proteinaktivität regulieren. Aufgrunddessen sind verschiedene reaktive Gruppen verfügbar, die potentielle Beeinflussung reduzieren, indem sie nur bestimmte funktionelle Gruppen des Zielproteins binden. Dazu gehören pri-

märe Aminogruppen (-NH₂), welche an jedem N-Terminus einer Polypeptidkette oder in den Seitenketten von Lysinresten zu finden sind. Andere mögliche Zielgruppen der Biotinylierung sind Sulfhydrylgruppen (-SH) in den Seitenketten von Cysteinen, Carboxylgruppen (-COOH) am C-Terminus jeder Polypeptidkette und in den Seitenketten der Aminosäuren Aspartat und Glutamat, sowie Carbonylgruppen (-CHO) in Glykoproteinen (durch Oxidation von Carbohydratgruppen).

Aufgrund der hohen Verfügbarkeit von ε-Aminen in Lysinen und N-terminalen α-Aminen werden Amine am häufigsten als funktionelle Gruppe für eine Biotinylierung herangezogen. N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester gehen stabile Bindungen mit primären Aminen ein. Durch Modifikation zu einem Sulfo-NHS-Ester kann das Biotinylierungsreagenz wasserlöslich gemacht werden, so dass die Reaktion in einem wässrigen Medium stattfinden kann. Die spezifische Interaktion und hohe Affinität von (Strept-)Avidin zu Biotinmolekülen wird für Proteindetektion mit hoher Sensitivität genutzt. Für Interaktionsstudien mittels eines Western Liganden-Blots wurden gereinigte und entsalzte SasC-His-Fusionsproteine mit dem EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit biotinyliert. Die benötigte Menge von Sulfo-NHS-Biotin für einen 20-fachen molaren Überschuss wurde mit folgender Formel berechnet:

$$ml[Protein] * \frac{mg[Protein]}{ml[Protein]} * \frac{mmol[Protein]}{mg[Protein]} * \frac{20\text{ mmol}[Biotin]}{mmol[Protein]} = mmol[Biotin] \quad (3.2)$$

Direkt vor der Verwendung wurden 2,2 mg der Sulfo-NHS-Biotin-Pulvers in 500 µl Reinstwasser gelöst und so eine Stocklösung mit einer Konzentration von 10 mM hergestellt. Mit folgender Formel wurde das einzusetzende Volumen berechnet:

$$mmol[Protein] * \frac{443\text{ mg}}{mmol[Protein]} * \frac{500\text{ }\mu\text{l}}{2,2\text{ mg}} = \mu\text{l}[Biotin - \text{Lösung}] \quad (3.3)$$

Das mit der Formel 3.3 berechnete Volumen an Biotinlösung wurde zur Proteinlösung bekannter Konzentration hinzugegeben und der Ansatz 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden nicht-biotinylierte SasC-His-Proteine auf ein 7,5 % natives Gel aufgetragen und eine native PAGE (Abschnitt 3.4.4) mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Statt eines primären Antikörpers wurde nach dem Blocken mit *Protein-free blocking buffer* die Membran mit 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ eines biotinylierten SasC-His-Proteins (in TBS-T, 0,3 % BSA) für 1,5 h bei RT inkubiert. Für einige Experimente wurde der TBS-T-Puffer mit den biotinylierten Proteinen mit 10 mM ZnCl₂ versetzt um zu untersuchen, ob potentielle Interaktionen Zn²⁺-abhängig auftreten. Nach der Inkubation mit Biotin-Proteinen wurde die Membran 3 x 8 min mit TBS-T gewaschen und dann mit 2 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ AP-konjugiertem Streptavidin (in TBS-T, 0,3 % BSA) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde NBT/BCIP-Farbreagenz auf die Membran gegeben. Findet eine Interaktion zwischen dem Protein auf der Membran und dem biotinylierten Protein statt, so bindet das

Biotin-Molekül wiederum Streptavidin, welches über die daran gekoppelte Alkalische Phosphatase die Proteinbanden durch enzymatischen Umsatz des Substrates sichtbar macht.

Vor der Durchführung des Western Liganden-Blots wurde der Erfolg der Biotinylierung mittels eines *Dot blot*-Assays überprüft. Dazu wurden je 2 µl des unmarkierten Proteins und des markierten Proteins auf ein Stück Nitrocellulose-Membran gegeben und wie oben beschrieben weiterbearbeitet (abweichend: jeweils nur 3 x 5 min gewaschen). Die Membran wurde für ca. 15 min mit dem Farbreagenz behandelt. Nur wenn eine eindeutige Reaktion des markierten Proteins mit Streptavidin-AP beobachtet wurde, wurde dieses Aliquot für die weiteren Western Liganden-Assays eingesetzt.

3.5.2 *In vitro*-crosslinking mit Bis-Sulfosuccinimidylsuberat

Der wasserlösliche homo-bifunktionelle NHS-Ester von Bis-Sulfosuccinimidylsuberat (BS³) reagiert mit freien primären Aminogruppen und es entsteht eine stabile Amidbindung unter Abspaltung des NHS-Restes. BS³ besitzt eine geladene funktionelle Gruppe und ermöglicht ein *crosslinking* über eine kovalente irreversible Bindung von Proteinen, wenn sich diese in räumlicher Nähe zueinander befinden. Verschiedene und v.a. geringe Konzentrationen an BS³ sollten keinen Einfluss auf die Struktur und das Aggregationsverhalten der Proteine haben und keine nicht-spezifische Interaktionen hervorrufen [215]. Für die *crosslinking*-Reaktion mit BS³ wurde zu den Proteinproben ein 10-facher, 20-facher oder 40-facher molarer Überschuss von BS³ zugegeben. Zuvor wurden 2 mg *crosslinker* in Wasser gelöst um eine Stocklösung herzustellen. Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl in Konjugationspuffer statt. Die Reaktion wurde für 30 min bei Raumtemperatur ausgeführt, anschließend mit 1 µl Quenching-Puffer (Endkonzentration 50 mM) gestoppt und der Ansatz nochmals für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung Konjugations- und Quenching-Puffer

Konjugationspuffer		Quenching-Puffer	
NaH ₂ PO ₄	100 mM	Tris/HCl	1 M
NaCl	0,15 M	pH	7,5

3.5.3 *In vivo*-crosslinking mittels Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid

Die Methode des *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid Systems* (BACTH) basiert auf der Rekonstitution der Aktivität des Enzyms Adenylatcyclase (CyaA) in *cya*-defizienten *E. coli*-Reporterstämmen. Das Prinzip ist in Abb. 3.1 schematisch dargestellt. Die Wiederherstellung der Funktionalität wird durch Protein-Protein-Interaktion vermittelt. So besteht die katalytische Domäne der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) aus den Untereinheiten T18 und T25 (Abb. 3.1 A). Sind diese komplementären Fragmente nicht in direktem Kontakt, ist das Enzym inaktiv und es entsteht kein cAMP. Die

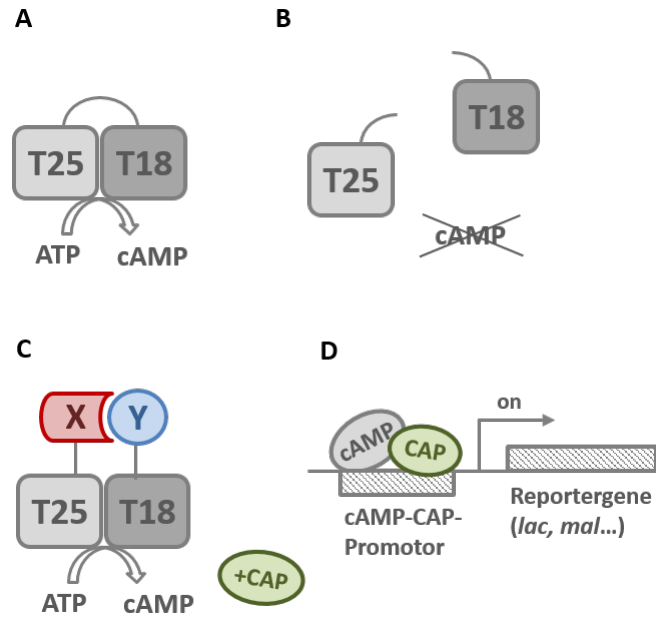


Abb. 3.1: **Prinzip des Bacterial Two-Hybrid System.** Interagieren die Proteine X und Y, fusioniert an die Untereinheiten T18 und T25 der Adenylatcyclase, miteinander, so wird die Enzymaktivität rekonstituiert und cAMP wird synthetisiert. Der cAMP/CAP-Komplex dient als Transkriptionsregulator und führt zur Expression von Reporter genen.

Untereinheiten können nicht von alleine, d.h. nicht ohne interagierende Fusionspartner, die Enzymaktivität rekonstituieren (Abb. 3.1 B). Um potentielle Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, können zwei Proteine oder Proteinfragmente an diese Untereinheiten fusioniert werden. Findet eine Interaktion der zu testenden Proteine statt, so kommt es zur Heterodimerisierung der Untereinheiten T18 und T25, was wiederum zur funktionellen Komplementierung der CyaA führt (Abb. 3.1 C). Daraufhin wird der *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisiert und bindet an das *Catabolite activator protein* (CAP). Der cAMP/CAP-Komplex dient als Transkriptionsregulator in *E. coli* und induziert nun die Expression von spezifischen Reporter genen wie dem *lac*- oder *mal*-Operon, welche in Laktose- bzw. Maltoseverstoffwechslung involviert sind (Abb. 3.1 D). Der Reporterstamm ist dann in der Lage diese Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten.

Konstruktion von T18C- und T25-SasC-Fusionsproteinen In dieser Arbeit wurden verschiedene Proteinfragmente des N-Terminus des SasC-Proteins C-terminal an die T18- bzw. T25-Untereinheit in zwei kompatiblen Vektoren, welche für die T18- (in (pUT18C)) bzw. die T25- (in (pKT25)) Untereinheit codieren, fusioniert (Abb. 3.2; 3.3). Eine Interaktion der an fusionierten SasC-Fragmente sollte in einem *cya*⁺ Phänotyp resultieren. In den Abb. 3.2 und 3.3 sind die Genfusionen in den *multiple cloning sites* (MCS) der beiden Vektoren (pUT18C) und (pKT25) dargestellt.

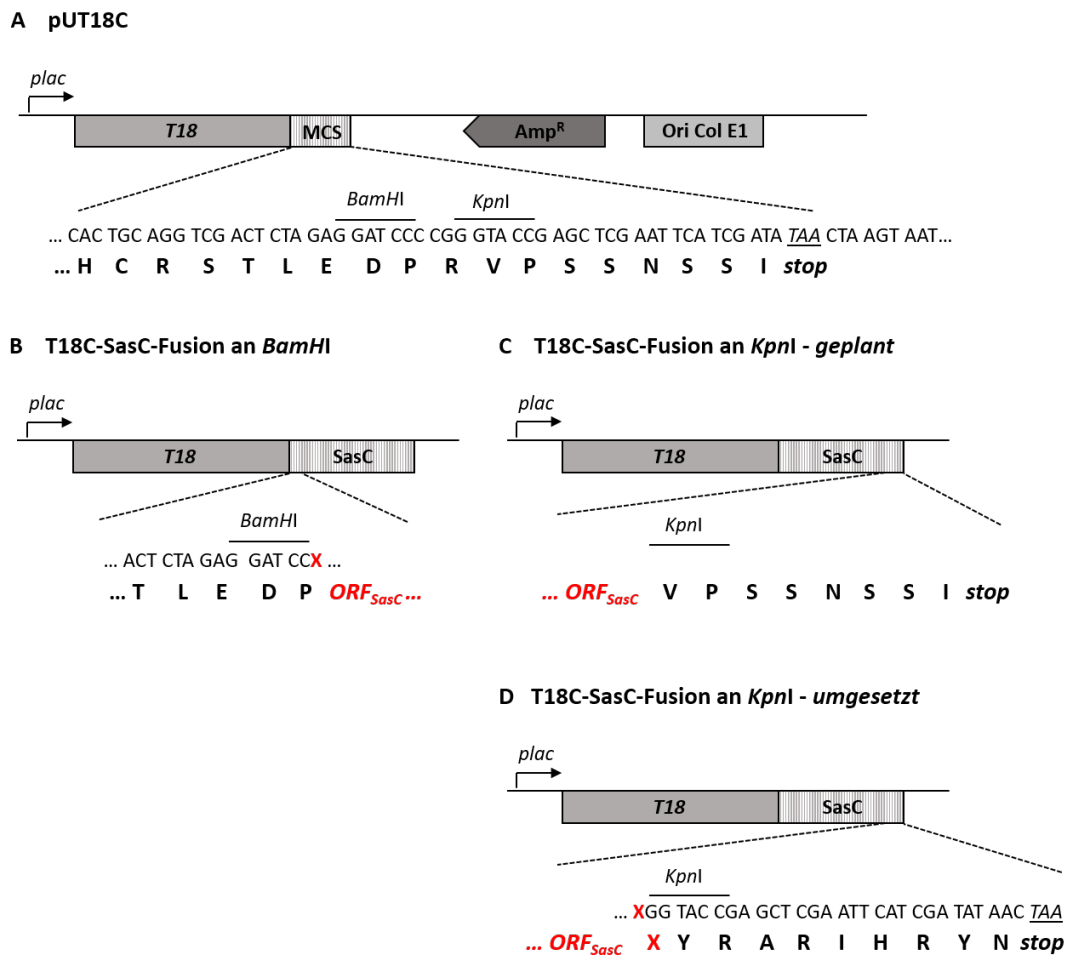


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der T18-SasC-Genfusion. **A** Multiple Cloning Site in (pUT18C). **B** An die T18-Untereinheit wurden SasC-Fragmente C-terminal über eine BamHI-Schnittstelle fusioniert. **C** Der geplante Übergang an der KpnI-Restriktionsschnittstelle. **D** Bei den Konstrukten T18-F1, T18-F2, T18-F3, T18-F4 und T18-DUF1542 1-6 verschob sich das Stopcodon durch Einbau einer zusätzlichen Base vor der KpnI-Schnittstelle.

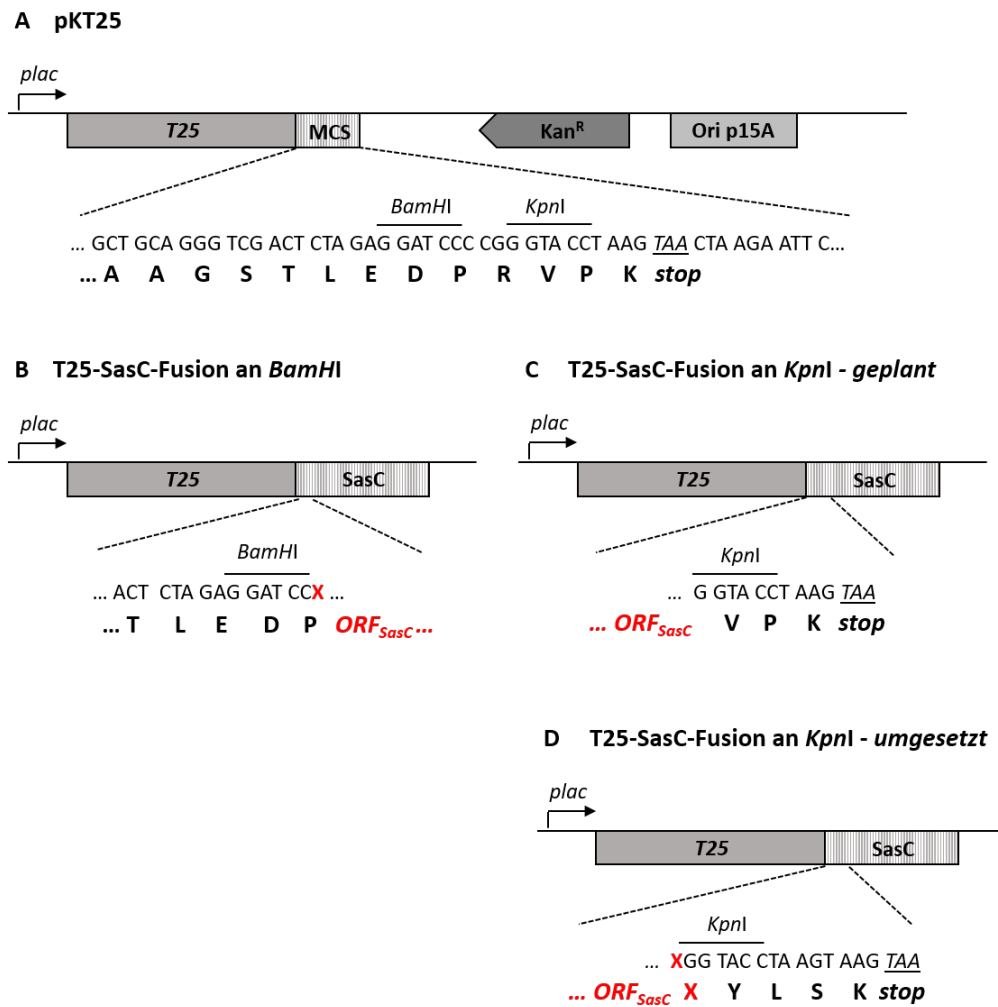


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der T25-SasC-Genfusion. **A** *Multiple Cloning Site* in (pKT25). **B** An die T25-Untereinheit wurden SasC-Fragmente C-terminal über eine *Bam*HI-Schnittstelle fusioniert. **C** Der geplante Übergang an der *Kpn*I-Restriktionsschnittstelle. **D** Bei den Konstrukten T25-F1, T25-F2, T25-F3, T25-F4 und T25-DUF1542 1-6 verschob sich das Stopcodon durch Einbau einer zusätzlichen Base vor der *Kpn*I-Schnittstelle.

Der Vektor (pUT18C) ist ein *high copy*-Plasmid, welcher für die Aminosäuren 225-399 der T18-Untereinheit der Adenylatcyclase (CyaA) kodiert und Ampicillinresistenz vermittelt. Hingegen ist (pKT25) ein *low copy*-Plasmid, welches für die Aminosäuren 1-224 der CyaA kodiert und eine Kanamycinresistenz vermittelt. Beide Gene stehen unter der Transkriptionskontrolle eines *lac*-Promotors. Damit keine Leserasterverschiebung stattfindet, wurde nach der *Bam*HI-Schnittstelle eine zusätzliche Base passend zur eingefügten Insertsequenz eingefügt. Als Stopcodon sollte das im Vektor vorgegebene TAA genutzt werden. Vor (in 5' → 3' Richtung) der *Kpn*I-Schnittstelle wurde ebenfalls (irrtümlicherweise) eine zusätzliche Base eingefügt, wodurch sich bei den Konstrukten T18-SasC-F1, T18-SasC-F2, T18-SasC-F3, T18-SasC-F4 und T18-SasC-DUF1542 1-6 und T25-SasC-F1, T25-SasC-F2, T25-SasC-F3, T25-SasC-F4 und T25-SasC-DUF1542 1-6 das TAA-Stopcodon um einige Aminosäurepositionen verschob.

Die *in vivo*-Detektion von Proteininteraktionen erfordert eine Co-Expression der Fusionsproteine in einem Reporterstamm ohne eigene Adenylatcyclase. Hierfür wurden die *E. coli*-Stämme DHM1 und BTH101 verwendet. Der Stamm BTH101 besitzt eine hohe Komplementierungseffizienz und Wachstumsrate, weist jedoch aufgrund seines *Rec*⁺-Genotyps eine gewisse Plasmidinstabilität auf. DHM1 ist ein *recA*-Stamm mit geringerer Komplementierungs- und Wachstumsrate. Es wurden beide Stämme mittels Elektroporation (Abschnitt 3.3.2) co-transformiert und die Co-Transformanten bei 30 °C für 48 h inkubiert. Positive Klone wurden durch Wachstum auf LB/X-Gal- oder lactosefreien MacConkey/Maltose-Agarplatten selektiert. Klone, bei welchen durch Rekonstitution der CyaA-Aktivität X-Gal durch Expression des *lac*-Operons umgesetzt werden kann, haben auf LB-Agar eine dunkelblaue Koloniefarbe; bei Verstoffwechslung von Maltose zeigen die Klone, bei denen eine Interaktion der Fragmente stattfindet, eine starke Pinkfärbung auf MacConkey.

In Abbildung 3.4 ist der experimentelle Ablauf für das Two-Hybrid System nochmals schematisch dargestellt.

Mikrodilutionstest Ein Mikrodilutionstest wurde durchgeführt um den Einfluss bivalenter Kationen auf das Wachstum von *E. coli* DHM1 zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von ZnCl₂, NiCl₂, MnCl₂, CaCl₂ und MgCl₂ zu 200 µl einer Suspension von *E. coli* DHM1 in TSB in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die OD der Proben bei 578 nm gemessen. Die Konzentration, bei welcher keine Einschränkung des bakteriellen Wachstums stattfand, wurde für die weiterführenden *in vivo*-Untersuchungen zur Ionenabhängigkeit der SasC-Interaktionen verwendet.

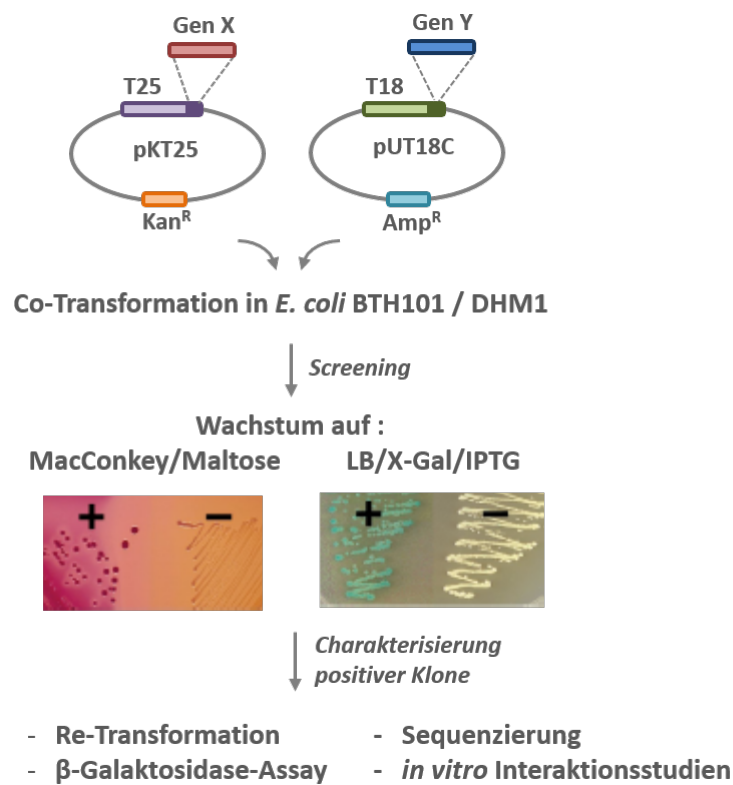


Abb. 3.4: **Übersicht des experimentellen Ablaufs des Two-Hybrid Systems.** Die Gene X und Y werden in die Vektoren (pUT18C) und (pKT25) kloniert und in einen Reporterstamm co-transformiert. Über Anzucht auf den Selektivmedien MacConkey/Maltose oder LB/X-Gal/IPTG wird auf positive Interaktionen getestet.

Herstellung von Gradientenagarplatten Flüssiger LB/X-Gal/IPTG- oder MacConkey/Maltose-Agar, versetzt mit Ampicillin, Kanamycin und bivalenten Kationen, wurde in schräg stehende Petrischalen gegeben und ausgehärtet. Anschließend wurde flüssiger LB/X-Gal/IPTG- oder MacConkey/Maltose-Agar, versetzt mit Ampicillin und Kanamycin, darüber gegossen, so dass eine ebene Oberfläche entstand. Durch die Unterschiede in der Schichtdicke der beiden Agartypen sollte ein Konzentrationsunterschied der Kationen im Agar entstehen. Entlang dieses Gradienten wurden ausgewählte Klone der Co-Transformationen ausgestrichen. Für die Überschichtung wurden 0,7 mM ZnCl₂, 2,5 mM NiCl₂, 5,0 mM MnCl₂, 40 mM CaCl₂ oder 40 mM MgCl₂ dem Agar zugefügt.

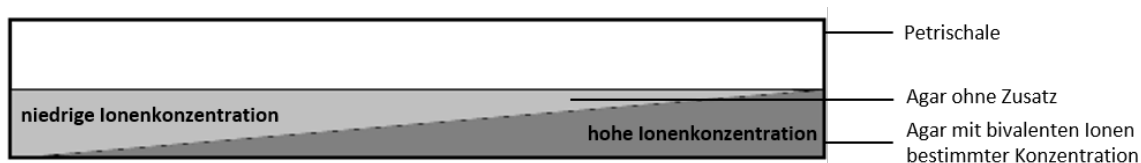


Abb. 3.5: **Prinzip einer Gradientenagarplatte.** LB/X-Gal- oder MacConkey/Maltose-Schrägagar wird mit ionenhaltigem LB/X-Gal- bzw. MacConkey/Maltose-Agar überschichtet, so dass eine ebene Oberfläche entsteht.

Aktivitätsbestimmung der β -Galaktosidase Die Komplementierung der Enzymaktivität wurde zudem mit einem β -Galaktosidase-Assay überprüft, in welchem die Aktivität des rekonstituierten Enzyms gemessen wurde. Der Versuch zur Enzymaktivitätsbestimmung wurde modifiziert nach Battesti und Bouveret durchgeführt [216].

Eine Übernachtskultur mit dem zu testenden Proteinpaar wurde in 3 ml LB, versetzt mit 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Ampicillin (resistenzvermittelt von (pUT18C)) und 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Kanamycin (resistenzvermittelt von (pKT25)), sowie 0,5 mM IPTG, bei 30 °C, 160 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 μl der ÜNK zu 150 μl LB, vorgelegt in einer Mikrotiterplatte, gegeben und die OD bei 600 nm bestimmt. Parallel dazu wurden 200 μl der ÜNK zu 800 μl Puffer Z in ein Greiner-Röhrchen gegeben. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden 1 Tropfen 0,01 % SDS und 2 Tropfen Chloroform (CHCl₃) zu jedem Ansatz gegeben und gevortext. Weitere 150 μl Puffer Z wurden in eine neue Mikrotiterplatte gegeben und 50 μl Zellsuspension der ÜNK hinzupipettiert. In jedes Well wurden dann 40 μl 0,4 % *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) hineingegeben und die enzymatische Reaktion bei 420 nm in Zeitabständen von 2 min für eine Gesamtdauer von 20 min im *microplate reader* gemessen. ONPG wird von der β -Galaktosidase als Substrat erkannt und in Galaktose und *o*-Nitrophenol gespalten, welches ein gelber Farbstoff ist. Die Entstehung von *o*-Nitrophenol ist proportional zur Aktivität und damit zur Konzentration des Enzyms. Direkt vor Verwendung des Puffers wurden 0,14 ml β -Mercaptoethanol zu 50 ml Puffer Z hinzugegeben.

Tabelle 3.11: **Zusammensetzung Puffer Z**

Puffer Z	
Na ₂ HPO ₄	30 mM
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	20 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,5 mM
ddH ₂ O	ad 500 ml
pH	7,0

3.5.4 BIAcore-Analysen: Größenausschlusschromatographie und Oberflächen-Plasmonresonanz

Mit der *Biomolecular Interaction Analysis* (BIA) können Wechselwirkungen von Biomolekülen, deren Assoziations- und Dissoziationsverhalten, sowie Affinitäten gemessen werden. Die Auswertung erfolgt über sog. Sensorgramme, aus denen sich die kinetischen Charakteristika einzelner oder komplexer Reaktionen ablesen und quantifizieren lassen. Die Untersuchungen zur Größenbestimmung mittels Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) als auch Interaktionssmessungen mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) wurden von der Firma Biaffin GmbH & Co KG (Kassel, Deutschland) mit dem Biacore 2000 durchgeführt.

In Abbildung 3.6 ist das Funktionsprinzip einer SPR-Messung dargestellt. Bei Injektion des Analyten in den Mikrofluss steigt das SPR-Signal sprunghaft an, was die Bindung an einen auf einem Sensorchip immobilisierten Bindungspartner anzeigt. Aus der Kurvenform können Bindungs- und Dissoziationskonstanten berechnet werden. Das System wird anschließend mit einer Regenerationslösung gespült, was den gebundenen Analyten vom Liganden auf der Oberfläche wieder entfernt und somit eine vollständige Dissoziation herbeiführt. Durch die Regeneration sollte die Bindungsaktivität des Liganden nicht beeinflusst werden. Die Matrix des CM5-Sensorchips besteht aus einer negativ geladenen Dextran-Matrix aufgebracht auf eine Goldoberfläche (<https://www.biacore.com/lifesciences/products/Consumables/guide/cm5/index.html>, 20.04.2016), wodurch die Goldoberfläche hydrophil wird und eine kovalente Kopplung von Biomolekülen (einer der zu untersuchenden Bindungspartner) ermöglicht. Der Interaktionspartner wird über ein Mikrofluss-System über den beladenen Chip geleitet. Bindung und Dissoziation der Wechselwirkung werden in Echtzeit mittels eines optischen Sensors verfolgt. Das Messprinzip beruht auf der Änderung des Brechungsindex der Oberfläche bei Wechselwirkung der Bindungspartner. Diese Änderung wird als Änderung des SPR-Signals detektiert. Ihr Wert ist proportional zur Konzentration des gebundenen Moleküls. Sie wird in *response units* [RU] angegeben.

Gereinigte und entsalzte Proben der SasC-His-Proteine wurden unter sauren Bedingungen (pH 4,0 - 4,5) mittels kovalenter Kopplung von primären Aminogruppen auf einem Standard CM5-Chip immo-

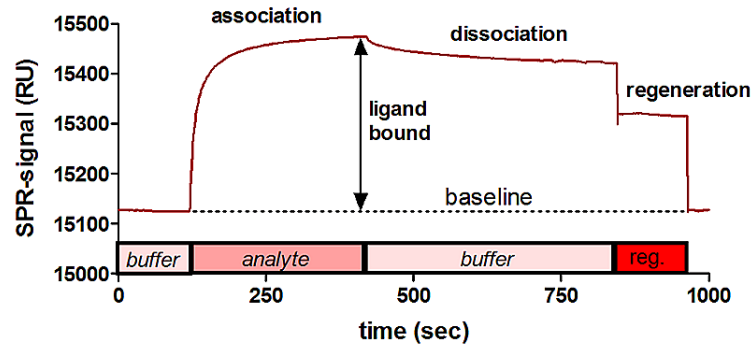


Abb. 3.6: **Prinzip einer SPR-Messung** Das SPR-Signal ändert sich, wenn Bindungsereignisse zwischen dem immobilisierten Partner und dem Analyten stattfinden. Bei Zugabe des Analyten kommt es zu einem steilen Anstieg des Signals. Wird der Ligandenzufluss gestoppt, dissoziiert zuvor gebundener Analyt ab und die Kurve flacht ab. Die Änderung beruht auf einem Anstieg des Brechungsindex der Chipoberfläche bei steigender Konzentration an Molekülen, die sich darauf befinden. Quelle: <http://www.biaffin.com/de/technologie/biacore/> (11.01.2017)

bilisiert. Für die Aktivierung der Chipoberfläche wurde NHS/EDC (0,1 M *N*-Hydroxysuccinimid, 0,4 M *N*-Ethyl-*N*-(3-Dimethylaminopropyl]-Carbodiimid) verwendet. Auf Chip 1 wurden SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-3, auf Chip 2 SasC-His-NT, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 immobilisiert. Chip 1 wurde an Messtag 1 unter schwach ionischen Bedingungen (150 mM NaCl) und an Messtag 3 mit erhöhter Ionenstärke (300 mM NaCl) analysiert. Chip 2 wurde sowohl an Messtag 1 und an Messtag 2 mit schwach ionischem Puffer analysiert. An Messtag 3 wurde der Versuch mit erhöhter Ionenstärke wiederholt. Die SasC-His-Proteine wurden als Analyten qualitativ in zwei Konzentrationen (50 nM und 500 nM) eingesetzt. Als Laufpuffer wurde ein HBS-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0,05 % Tween20, pH 7,4) verwendet. Freie *N*-Hydroxysuccinimidester-Gruppen wurden mit 2 M Ethanolamin (pH 8,5) geblockt. Analysen bei erhöhter Ionenstärke (HBS-Puffer mit 300 mM NaCl) wurden durchgeführt um unspezifische Bindungen an die Kontrolloberfläche zu verhindern.

3.5.5 Rasterkraftmikroskopische Analysen

Die rasterkraftmikroskopischen (*atomic force microscopy, AFM*) Untersuchungen wurden von Prof. Dr. Victor Shahin und Dr. Gonzalo Rosso am Institut für Physiologie II der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster durchgeführt. Die Proben wurden von L. Britz zur Verfügung gestellt. Gereinigte SasC-His-Proteine wurden auf ihr homotypisches und heterotypisches Aggregationsverhalten untersucht. Für

die AFM-Aufnahmen wurden die Proteine auf einer Mica-Oberfläche immobilisiert. Dazu wurden zu jeweils 1 μl der Proteine 56 μl 1 x LEW-Puffer, pH 7,0 gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation wurden 5 μl der Lösung mit 85 μl 1 x LEW-Puffer verdünnt. Der gesamte Ansatz wurde auf *freshly cleaved* Mica aufgebracht, welche mit Poly-L-Lysin beschichtet wurde. Nach 30 min wurden die Proben gewaschen und im AFM aufgenommen. Die Aufnahmen wurden bei Raumtemperatur (20 °C) mit einem *Bruker Multimode Atomic Force Microscope* mit einem J-Scanner und einem Nanoscope V-Kontrollgerät (Bruker, Santa Barbara, CA) gefertigt. Alle Bilder wurden in Lösung im Kontakt-Modus mit einer *oxide-sharpened* Siliziumnitrid-Messspitze (DNP-S; Bruker/ Santa Barbara, CA) aufgenommen. V-förmige Cantilever besitzen typischerweise eine Federkonstante von 0,58 $\frac{\text{N}}{\text{m}}$ und einen Krümmungsradius von schätzungsweise 10 nm. Diese wurden auf einen Wert 10 % bis 20 % unterhalb des Peaks der Resonanzfrequenz eingestellt, welcher üblicherweise zwischen 7,5 und 9 kHz liegt. Die Messamplitude wurde so gewählt, dass die Effektivwert-Amplitude bei 0,3 bis 0,6 V liegt. Die Scanfläche des Mikroskops wurde auf 0 nm eingestellt, um Feinabstimmungen zu ermöglichen. Die Sollwert-Einstellung betrug 100 bis 200 nm oberhalb der Oberfläche. Damit wurde der Sollwert auf den höchstmöglichen Wert eingestellt, der ein Vermessen der Probe mit geringem Hintergrundsignal ermöglicht und um die Kraft, welche auf die Probe wirkt, zu minimieren. Die Aufnahmen wurden mit einer Scanrate von 1 Hz und 512 Scanzeilen pro Fläche angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit dem *Scanning Probe Image Processor* (Image Metrology, Lyngby, Denmark).

3.5.6 MicroScale Thermophorese

Im Rahmen einer Gerätedemonstration des Monolith NT.115 der Firma Nanotemper Technologies GmbH konnten Bindungseigenschaften von Protein-Protein-Interaktionen und Dissoziationskonstanten einiger ausgewählte SasC-His-Proteine mittels MicroScale Thermophorese (MST) untersucht werden. Die Durchführung der Analyse am Gerät wurde unter Anleitung eines Gerätespezialisten der Firma (Dr. Christian Kleusch) nach anfänglicher Einweisung durchgeführt.

Mit der MST-Technik können biomolekulare Interaktionen unter nahezu natürlichen Bedingungen quantifiziert werden. Das Prinzip beruht auf der Messung von Änderungen in der Beweglichkeit von Biomolekülen bei Anlegen eines mikroskopischen Temperaturgradienten. Dieser Effekt wird "Thermophorese" genannt. Ein lokaler Temperaturgradient führt zur einer lokalen Änderung der Molekülkonzentration in diesem Bereich. Diese Änderung wird durch den Soret-Koeffizienten S_T quantifiziert:

$$\frac{c_{\text{hot}}}{c_{\text{cold}}} = \exp(-S_T \Delta T) \quad (3.4)$$

In Titrationsexperimenten wird die Thermophorese eines fluoreszenzmarkierten Proteins unter gleichbleibenden Pufferbedingungen gemessen. Die Interaktion mit nicht-markierten Ligandenmolekülen führt

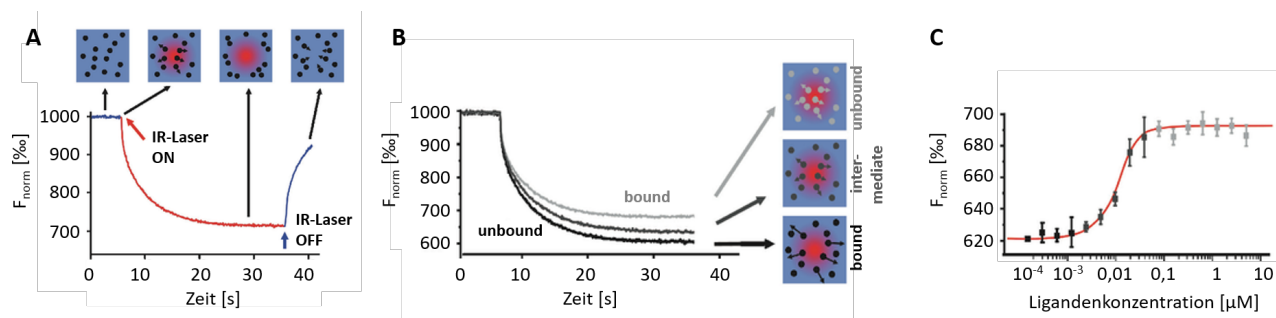


Abb. 3.7: **Prinzip einer MST-Messung.** **A Signal eines MST-Experiments.** Anfangs homogen verteilte Moleküle diffundieren thermophoretisch aus einem erhitzten Bereich heraus. Nach Deaktivierung des IR-Lasers diffundieren die Moleküle wieder zurück. Die Änderung der Fluoreszenz in diesem Bereich wird gemessen. **B Interaktions-Experiment mittels MST.** Das thermophoretische Diffusionsverhalten eines markierten Moleküls (*unbound*) ändert sich bei Bindung eines Liganden (*bound*). **C Grafische Auswertung eines Titrationsexperimentes.** Die Änderung im thermophoretischen Verhalten werden als Änderung der Fluoreszenz F_{norm} ausgedrückt. Titration mit nicht markierten Molekülen führt zu einer graduellen Änderung in F_{norm} , was als Bindungskurve abgebildet werden kann. Abbildung adaptiert nach MST Demo Report NT-CK-Uni Muenster_Heilmann, NanoTemper Technologies GmbH.

zur Änderung im Thermophoreseverhalten des markierten Moleküls, bedingt durch Änderungen in der Hydrathülle, der Ladung oder der Größe des Moleküls. Das Prinzip ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

Durch Messung der Fluoreszenzverteilung innerhalb der Glaskapillare wird auf die thermophoretische Bewegung des markierten Moleküls geschlossen. Wird zu Beginn des Experiments die initiale Fluoreszenz gemessen, sind die fluoreszierenden Moleküle noch homogen in der Lösung verteilt. Über einen Infrarot-Laser wird dann die Temperatur der Lösung in der Glaskapillare lokal um 2 - 6 K erhöht und so ein mikroskopischer Temperaturgradient geschaffen. Sobald der Laser aktiviert ist, können zwei Effekte beobachtet werden. Innerhalb der ersten Sekunde kommt es zum sog. T-Jump (*temperature jump*), einem rapiden Abfall der Fluoreszenzintensität, hervorgerufen durch den plötzlichen Temperaturanstieg. Anschließend kommt es zur Thermophorese (Bewegung) der markierten Moleküle aus dem erhitzten Bereich in die kühleren Regionen der Peripherie. Die Konzentration der fluoreszierenden Moleküle im erhitzten Bereich nimmt ab bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Die Änderungen der Fluoreszenzintensität werden typischerweise für 30 s gemessen. Nach Deaktivierung des Lasers findet ein inverser T-Jump statt und die fluoreszierenden Moleküle diffundieren zurück in den ursprünglich erhitzten Bereich. Der Soret-Koeffizient S_T beschreibt das Gleichgewicht des Konzentrationsverhältnisses der fluoreszierenden Moleküle in den erhitzten und kalten Bereichen der Probe in Abhängigkeit von einem Temperaturanstieg ΔT . Die für die Auswertung verwendete normalisierte Fluoreszenz F_{norm} spiegelt dieses Verhältnis wieder. Während der Titrationsexperimente verändert sich F_{norm} nach folgender Formel:

$$F_{\text{norm}} = (1 - x)F_{\text{norm}}^{[A]} + xF_{\text{norm}}^{[AT]} = (1 - x)F(A)_{\text{norm}} + xF(AL)_{\text{norm}} \quad (3.5)$$

$F(A)_{\text{norm}}$ gibt die Fluoreszenzintensität der ungebunden vorliegenden markierten Moleküle A an, $F(AL)_{\text{norm}}$ die Intensität von Komplexen aus fluoreszierenden Molekülen A mit interagierenden Liganden L und x den Anteil an fluoreszierenden Molekülen, die in einem Komplex vorliegen. Wird nun die Konzentration von nicht-markierten Ligandenmolekülen erhöht, nimmt der Anteil an gebildeten Komplexen zu bis alle fluoreszierenden Moleküle gebunden vorliegen. Daraus folgt, dass der Anteil gebundener Moleküle x aus den Änderungen der Fluoreszenzintensität F_{norm} abgeleitet werden kann. Für diese Arbeit wurden SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-DUF1542 mit dem Monolith NTTM Protein Labeling Kit RED-NHS von NanoTemper Technologies mit dem Fluorophor NT-647 gekoppelt. Der Fluorophor NT-647 besitzt eine funktionelle NHS-Ester-Gruppe, welche mit primären Aminogruppen von Lysinresten stabile Amidbindungen bildet. Mit NT-647-NHS gekoppelte Proteine zeigen ein Anregungsmaximum bei 650 nm und ein Emissionsmaximum bei 670 nm, was in einer roten Fluoreszenz resultiert. Da die SasC-His-Proteine in LEW-Puffer vorlagen, welcher keine primären Amine enthält, wurde auf den Pufferaustausch verzichtet. Für das Labeling der Proteine wurden die zu testenden SasC-His-Proteine auf eine Konzentration von 2-20 μM in Labeling-Puffer eingestellt. Die Molaritäten der Proteine wurden über folgende Formel ermittelt:

$$Protein\left[\frac{Mol}{L}\right] = \frac{Protein\left[\frac{mg}{ml}\right]}{MW_{Protein}[Da]} \quad (3.6)$$

Das als Pulver vorliegende Fluorophor wurde in 30 μl 100 % DMSO aufgenommen, was eine Konzentration von 435 μM ergab. Der Ansatz wurde dann gut gevortext, bis das gesamte Fluorophor gelöst war. Mit Labeling Puffer wurde die Konzentration des Farbstoffes auf die 2-3 fache Konzentration des zu markierenden Proteins eingestellt. Zu 100 μl der Proteinlösung wurden dann 100 μl des Farbstoffes gegeben (Verhältnis 1:1) und der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im nächsten Schritt wurde überschüssiger Farbstoff aus der Protein-Farbstoff-Lösung entfernt. Dazu wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Die Säule wurde 3 x mit 3 ml LEW-Puffer äquilibriert und gewaschen. Anschließend wurden 500 μl der Labeling-Reaktion auf die Säule gegeben und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 600 μl LEW-Puffer auf die Säule gegeben, das Eluat in Aliquots von 50-100 μl gesammelt und bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt. Eine erfolgreiche Labeling-Reaktion war bereits mit bloßem Auge an einer leicht bläulichen Färbung der Lösung erkennbar. Das mit dem Fluorophor NT-647 markierte SasC-His-Protein wurde mit einer konstanten Konzentration von 50 nM eingesetzt. Für die Ligandenproteine wurde eine Verdünnungsreihe mit bis zu 16 verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Für alle Verdünnungen wurde LEW-Puffer verwendet. Die höchste Konzentration der Verdünnungsreihe sollte bei ungefähr dem 20-fachen Wert der erwarteten Dissoziationskonstante der Interaktion (K_d) des jeweiligen SasC-Proteins liegen, damit der Sättigungsbereich erreicht wird. Für die hier verwendeten SasC-His-Proteine konnten jedoch keine K_d -Werte aus vorherigen Experimenten abgeleitet werden, so dass der eingesetzte Konzentrationsbereich des Liganden nur schätzungsweise eingestellt werden konnte.

Die Konzentration des jeweiligen Proteins wurde als maximale Konzentration eingesetzt. Von den Ansätzen der Verdünnungsreihe wurden anschließend 10 μl mit 10 μl des fluoreszierenden Moleküls gemischt und für 1 min inkubiert. Durch Kapillarkräfte wurden die Proben in Standard-Glaskapillaren aufgezogen und diese zur Analyse in den Monolith NT.115 gelegt. Alle Bestimmungen wurden einmalig durchgeführt.

Die MST Datenanalyse wurden von der NanoTemper Analysesoftware durchgeführt. Für jede MST-Messung in jeder Kapillare wird die Bindungsrate kalkuliert, indem das Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei angeschaltetem Laser gegen die Fluoreszenzintensität, kurz bevor der Laser eingeschaltet wird, aufgetragen. Jede Ligandenkonzentration ergibt eine Kurve der relativen Fluoreszenzintensitäten und kann als Bindungskurve (Fluoreszenzintensität gegen Ligandenkonzentration) ausgewertet werden. Die sich daraus ergebende Dissoziationskonstante K_d ist definiert durch:

$$K_d = \frac{[A] * [L]}{[AL]} \quad (3.7)$$

Wobei $[A]$ die Konzentration von freien fluoreszierenden Molekülen angibt, $[L]$ die Ligandenkonzentration und $[AL]$ die Konzentration von Molekül-Liganden-Komplexen. Die quadratische Annäherungsgleichung für $[AL]$ lautet:

$$[AL] = \frac{1}{2} * (([A_0] + [L_0] + K_d) - (([A_0] + [L_0] + K_d)^2 - 4 * [A_0] * [L_0])^{\frac{1}{2}}) \quad (3.8)$$

$[A_0]$ steht für die bekannte Konzentration der freien fluoreszierenden Molekülen und $[L_0]$ für die Konzentration freier Liganden. Die Konzentration von $[A_0]$ bleibt während des gesamten Experimentes konstant, während $[L_0]$ im Rahmen einer Verdünnungsreihe variiert wird. Das gemessene Signal F_{norm} aus der Formel 3.5 korreliert direkt mit dem Anteil an fluoreszierenden Molekülen, welche den Komplex $x = [AL]/[AL_0]$ bilden. Durch Einsetzen in die Gleichung kann der K_d -Wert bestimmt werden.

3.6 Herstellung von Lysostaphinlysaten

Zur Isolierung von zellwandgebundenen Oberflächenproteinen wurden Lysostaphinlysate hergestellt. Übernachtskulturen der *S. aureus*-Stämme SH1000 und 4074 oder des *S. carnosus*-Stammes TM300 wurden in 10 ml TSB, versetzt mit 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Chloramphenicol und 1 % Xylose bei 37 °C und 160 rpm angezogen. Xylose dient als Induktor, da die *sasC*-Subklone unter der Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors von (pCX19) liegen [217]. Der Vektor (pCX19) enthält ein Lipasegen (siehe Anhänge), welches bei Expression in den Subklonen durch die *sasC*-Fragmente ersetzt wurde. In *S. carnosus* TM300 p Δ lip ist das Lipasegen deletiert. Der Stamm wurde als Negativkontrolle bei Aggregations- und Biofilmassays verwendet um den Effekt des Leervektors zu bestimmen.

Die ÜNK wurde am nächsten Tag in ein 50 ml Falcon überführt und die Zellen für 20 min bei 4000 rpm und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Anschließend wurde das Pellet gewogen und in 20 µl/mg Zellpellet PBS mit *EDTA-free protease inhibitor cocktail* (1 Tablette/20 ml PBS) aufgenommen. Zum Ansatz wurde Lysostaphin zu einer Endkonzentration von 400 µg/g Zellpellet und DNase I (10 Units/ml) zu einer Endkonzentration von 20 µl/g Zellpellet gegeben und 4 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Lysate wurden dann bei 4 °C für 45 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, welcher die extrahierten Proteine enthält, wurde in ERGs aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Ein Aliquot wurde für Analyse mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.4) verwendet.

3.7 Aggregationsassays

Um das Aggregationsverhalten von *sasC*-exprimierenden Staphylokokken-Stämmen makroskopisch zu beurteilen, wurde ein Aggregationsassay durchgeführt. Für diesen wurde frisch am Vortag ausgefrorenes Material erneut auf eine TSA-Platte (Cn10, 1% Xylose) überimpft und 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Xylose wurde beigefügt, um die Expression der SasC-Subklone zu induzieren. Am nächsten Tag wurden 20 µl steriles PBS auf einen Glas-Objektträger gegeben und mit einer Impföse etwas Material von der frisch bewachsenen Platte in den Tropfen eingerieben. Das Aggregationsverhalten wurde beobachtet und fotografisch dokumentiert.

3.7.1 Kompetitiver Aggregationsassay

Um den Effekt von rekombinantem SasC-His-NT und SasC-His-DUF1542 auf das Aggregationsverhalten der verschiedenen *S. carnosus*- und *S. aureus*-Subklone zu untersuchen, wurde ein kompetitiver Aggregationsassay durchgeführt. Hierfür wurde steriles PBS mit 1,5 µM SasC-His-NT oder SasC-His-DUF1542 versetzt und auf den Objektträger gegeben. Die restliche Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 3.7 beschrieben. Ebenfalls sollte der Einfluss von anti-SasC-NT- und anti-SasC-DUF-Antiserum auf die SasC-vermittelte Aggregation der *S. carnosus*- und *S. aureus*-Subklone untersucht werden. Hierzu wurden die Antiseren in den Verdünnungen 1:100, 1:1000 oder 1:10000 (in PBS) auf den Objektträger gegeben und das Zellmaterial eingerieben. Um auch langsam wirkende Effekte beobachten zu können, wurden frisch ausgefrorene *S. carnosus*- und *S. aureus*-Stämme auf TSA-Platten (Cn10, 1% Xylose) überimpft, welche zuvor mit anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum versetzt wurden. Dazu wurden 100 µl oder 200 µl der Antiseren mit einem Drigalskispatel auf die Oberfläche der Platten ausgebracht - bezogen auf das Gesamt-Agarvolumen der TSA-Platte von 20 ml entspricht das einer Verdünnung der Antiseren von 1:200 bzw. 1:100. Die Platten wurden dann 16 h bei 37 °C inkubiert und das Aggregationsverhalten (Abschnitt 3.7) untersucht.

Tabelle 3.12: Zusammensetzung Karbonatpuffer

Karbonatpuffer	
NaH ₂ CO ₃	0,05 M
NaCl	0,5 M
pH	9,7

3.8 Untersuchungen zur Biofilmbildung

3.8.1 Semi-quantitativer Biofilm-Assay

Der semi-quantitative Biofilmassay wurde nach Heilmann *et al.* [54] durchgeführt. Mit frisch ausgestrichenen Staphylokokken-Stämmen wurde eine ÜNK von 5 ml TSB, mit 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ Chloramphenicol in 10 ml Reagenzgläsern angezogen (37 °C, 160 rpm). Zur Induktion der Proteinexpression wurde 1 % Xylose hinzugegeben. Mit der ÜNK wurden am nächsten Tag 8 ml TSB (Cn10, 1 % Xylose) auf eine OD₅₇₈ von 0,01 beimpft. Von dieser Suspension wurden je 200 μl in die Wells einer 96 x Mikrotiterplatte überführt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgekippt, die Wells mit je 200 μl 1 x PBS gewaschen und die Platte kopfüber über Nacht luftgetrocknet. Der Biofilm wurde mit 0,1 % Safranin (200 μl /Well) für 30 s gefärbt und erneut luftgetrocknet. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit dem *ChemiDocTM Touch Imaging System* fotografiert und die Intensität des Biofilms mit dem Programm *Image Lab* ausgewertet. Dabei wurde die Safranin-Färbung des gesamten Wells berücksichtigt.

Alternativ wurde für einige Versuche der Biofilm im *microplate reader* bei 490 nm vermessen. Der Nachteil bei dieser Art der Messung ist, dass es bei nicht vollständig homogenen Biofilmen innerhalb eines Wells zu Verfälschungen kommen kann, da der *microplate reader* nur einen einzelnen Punkt in der Mitte des Wells vermisst. So werden Verklumpungen oder große Aggregate außerhalb dieses Bereiches nicht berücksichtigt. Daten beider Messmethoden wurden miteinander verglichen, wobei besonders Biofilme von *S. aureus* SH1000 (pSasC) große Abweichungen zeigten. Für die anderen Subklone lieferten beide Methoden vergleichbare Ergebnisse. Auswertungen mit dem *microplate reader* werden in „Absorption bei 490 nm“ angegeben, Daten aus dem *Image Lab* in „arbitrary units“.

Coating von Mikrotiterplatten mit Fibrinogen oder Poly-L-Lysin Um die Bindung von Staphylokokken-Stämmen, v.a. *sasC*-exprimierender Stämme, an die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte zu verbessern und damit eine bessere Biofilmbildung zu erreichen, wurden die Wells mit 500 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Fibrinogen (in NaH₂CO₃) oder mit 0,01 %iger Poly-L-Lysin-Lösung mit 40 μl /Well bei 4 °C über Nacht prä-inkubiert. Nach der Vorbehandlung wurden die Wells einmal mit 1 x PBS gewaschen und der Biofilm-assay wie unter 3.8.1 beschrieben, durchgeführt. Hier wurde die Intensität des Biofilms durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm im *microplate reader* bestimmt.

3.8.2 Biofilm-Kompetitionsassay

Mit Kompetitionsassays sollte untersucht werden, ob durch Zugabe von Antisera oder rekombinanten Proteinen die Biofilmbildung von SasC-exprimierenden SH1000 beeinflusst wird. Das experimentelle Setup wurde nach Barbu *et al.* adaptiert [218].

Biofilm-Kompetitionsassay mit polyklonalem anti-SasC-NT Antiserum Polyklonales Kaninchen anti-SasC-NT Antiserum wurde in Verdünnungen von 1:10000, 1:1000 oder 1:100 zu der Bakteriensuspension zugegeben und anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, weiterverfahren. Als Kontrolle diente das Präimmenserum desselben Tieres.

Biofilm-Kompetitionsassay mit rekombinanten Proteinen Gereinigtes und entsalztes SasC-His-DUF1542 oder SasC-His-NT wurden in einer Endkonzentration von 1,5 µM gemeinsam mit der Bakteriensuspension in die Wells der Mikrotiterplatte gegeben und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde LEW-Puffer im selben Volumen zu den Bakterien gegeben, da auch die rekombinanten gereinigten Proteine in LEW-Puffer gelöst, eingesetzt wurden. Anschließend wurde, wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben, weiterverfahren.

3.9 Statistische Auswertemethoden

Versuche wurden, sofern nicht anders angegeben, mindestens dreimal als voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde durch Bestimmung des p-Wertes ermittelt und ist in Abbildungen wie folgt gekennzeichnet: *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01 und ***p ≤ 0.001.

3.10 Computer- und Software-gestützte Analysen

Proteinsequenzen wurden aus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> entnommen. Die Berechnung des theoretischen Molekulargewichtes (MW), des isoelektrischen Punktes und der Aminosäurezusammensetzung eines Proteins erfolgte mittels der Programme *ProtParam* von <http://www.expasy.org/> und *ProtCalc* von <http://www.justbio.com>. Plasmidkarten, Sequenzanalysen und Alignments wurden mit dem Programm *Snap Gene* erstellt. Die quantitative Auswertung der Biofilmassays erfolgte mit dem Programm *Image Lab* der Firma Biorad. Geringe Bildbearbeitung zur Verbesserung der Helligkeit, Schärfe und des Kontrastes von Gel-, Blot- und Biofilmbildern erfolgte mit der *ArcSoft PhotoStudio 6 Scansoftware* oder Power Point. Die bioinformatischen Strukturanalysen der SasC-Aminosäuresequenz wurden mittels der frei zugänglichen Software ANTHEPROT (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 *Staphylococcal surface protein C* - SasC

Das *Staphylococcal surface protein C* (SasC; Abb. 4.1) weist typische strukturelle Elemente der Oberflächenproteine Gram-positiver Bakterien auf. Am N-Terminus findet sich ein Signalpeptid mit einem YSIRK-Motiv, welches für die Sortase-abhängige Sekretion des Proteins essentiell ist. Im N-terminalen Bereich befinden sich drei kleine Repeats (*small repeats*; SR) aus je 40 Aminosäuren, zwei große Repeats (*large repeats*; LR) aus je 140 Aminosäuren und eine FIVAR-Domäne. Die FIVAR-Domäne besitzt mutmaßlich zuckerbindende Funktion [129]. An diese schließen sich 17 repetitive Sequenzen aus DUF1542-Repeats an. Am C-Terminus befindet sich ein LPXTG-Motiv, welches für die kovalente Verankerung des Proteins in der Zellwand sorgt [128].

4.1.1 Bioinformatische Strukturanalyse von SasC

Die Analyse mittels ANTHEPROT berechnete einen Anteil von 42.77 % an α -Helices, und nur einen geringen Anteil von 1,10 % sog. *extended strands*, welche in β -Faltblattstrukturen vorliegen können. Den Hauptanteil nehmen *random coils* ein.

Das strukturelle Alignment findet sich in Anhang A1.3.

4.1.2 SasC-His-Fusionsproteine zur heterologen Expression

Zur Charakterisierung der Funktionen der verschiedenen Domänen der N-terminalen Region des SasC-Proteins wurden von C. Heilmann die in den Abb. 4.2 und 4.3 dargestellten SasC-His-Fusionsgene konstruiert und heterolog exprimiert.

SasC-His-NT beinhaltet den gesamten N-terminalen Bereich von T⁴⁰ bis T⁶⁵⁴, SasC-His-1 die ersten beiden kleinen Repeats (SR) von T⁴⁰ bis G²¹⁶, SasC-His-2 das dritte kleine Repeat und das erste große Repeat (LR) von P²⁰⁷ bis E⁴⁴⁰, SasC-His-3 das zweite große Repeat und die FIVAR-Domäne von G⁴²⁹ bis T⁶⁵⁴, SasC-His-4 Teile von beiden großen Repeats von G³²² bis G⁵²² und SasC-His-5 einen Teil des zweiten großen Repeats und die FIVAR-Domäne von P⁵⁴⁸ bis T⁶⁵⁴. SasC-His-DUF1542 beinhaltet die DUF1542-Domänen 4-11 von Q⁹⁰² bis Q¹⁵¹⁵ (Abb. 4.3).

Als Kontrolle wurden acht DUF1542-Domänen (Q⁹⁰² bis Q¹⁵¹⁵) ebenfalls als His-Fusionsprotein exprimiert und in die Interaktionsstudien eingeschlossen. Schröder *et al.* konnten zeigen, dass die DUF1542-Domänen des SasC-Proteins alleine nicht in der Lage sind die SasC-abhängige interzelluläre Aggregation

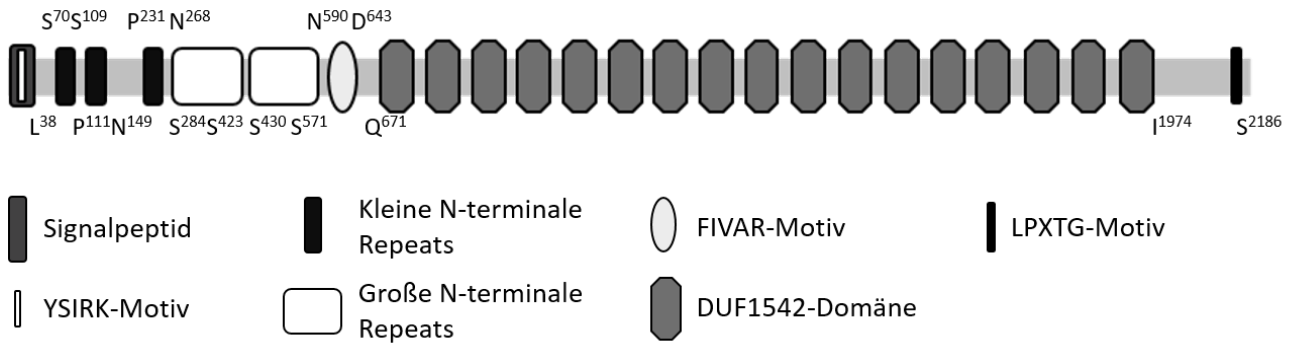


Abb. 4.1: **Schematische Darstellung von SasC.** SasC ist modular organisiert. N-terminal befindet sich ein Signalpeptid mit einem YSIRK-Motiv. Diesem folgen drei SR aus je 40 Aminosäuren, zwei LR aus je 140 Aminosäuren und eine FIVAR-Domäne, an welche sich 17 DUF1542-Repeats anschließen. Am C-Terminus befindet sich ein LPXTG-Motiv.

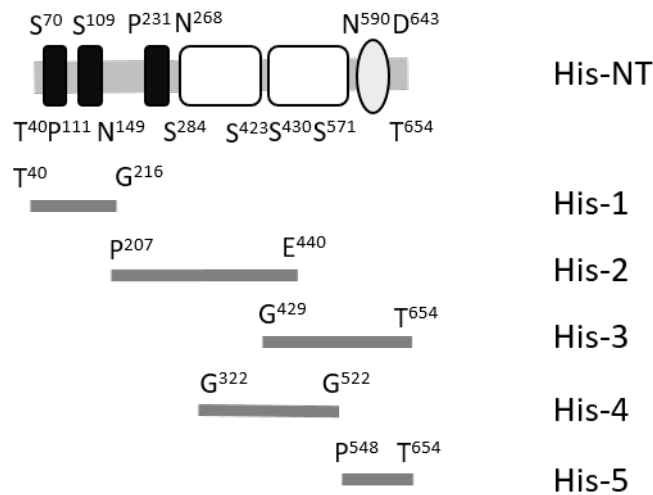


Abb. 4.2: **Schematische Darstellung der His-Fusionsproteine des N-Terminus von SasC.** Die Domänen des N-Terminus von SasC wurden als His-Fusionsproteine exprimiert. SasC-His-NT (T⁴⁰–T⁶⁵⁴); SasC-His-1 (T⁴⁰–G²¹⁶); SasC-His-2 (P²⁰⁷–E⁴⁴⁰); SasC-His-3 (G⁴²⁹–T⁶⁵⁴); SasC-His-4 (G³²²–G⁵²²); SasC-His-5 (P⁵⁴⁸–T⁶⁵⁴).

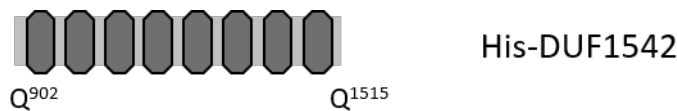


Abb. 4.3: **Schematische Darstellung des SasC-His-DUF1542-Fusionsproteins.** Die DUF1542-Domänen 4-11 (Q⁹⁰²–Q¹⁵¹⁵) wurden als His-Fusionsprotein exprimiert.

zu vermitteln [128]. In dieser Arbeit sollte die Reinigung dieser *His-tagged*-Proteine für Interaktionsstudien optimiert werden.

4.1.3 Optimierung der Reinigung von SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-2, SasC-His-3, SasC-His-4, SasC-His-5 und SasC-His-DUF1542

Die vom Hersteller vorgeschlagene Anzahl der Waschschriffe (W, LEW-Puffer, LEW) zur Reinigung der SasC-His-Fusionsproteine und die Zusammensetzung des Wasch- oder Elutionspuffers war nicht für alle zu reinigenden Proteine geeignet.

Um unspezifische Banden in den Elutionsfraktionen zu eliminieren und die Reinheit der *His-tagged* Fusionsproteine zu erhöhen, wurde, wenn erforderlich, der Waschpuffer mit Detergenzien wie 5 % Glycerin oder 1 % Tween20 versetzt, die Ionenkonzentration auf 800 mM NaCl erhöht oder die Anzahl der Waschschriffe erhöht. Eine Erhöhung der Ionenstärke verhindert unspezifische ionische Interaktionen und Zusatz von Glycerin unterdrückt hydrophobe Protein-Protein-Interaktionen. Tween20 wäscht unspezifisch gebundene Proteine von der Säule. Um gebundene Proteine vollständig von der Säule zu eluieren, wurde für einige SasC-His-Proteine, abweichend von den Instruktionen des Reinigungs-Kits, der pH-Wert des Elutionspuffers oder die Imidazolkonzentration verringert (Tab. 4.1). Sofern nicht anders angegeben betrug der pH-Wert des Elutionspuffers 8,0.

SasC-His-NT konnte durch Erhöhung der NaCl-Konzentration des Waschpuffers auf 800 mM und Zugabe von 5 % Glycerin oder 1 % Tween20 zum Waschpuffer gereinigt werden. Die gleichen Bedingungen wurden für SasC-His-1 verwendet, außer dass im zweiten Elutionsschritt mit einem pH von 4,5 eluiert wurde. In früheren Versuchen, ohne Änderung der Waschpufferzusammensetzung, eluierte SasC-His-1 bei niedrigem pH besser, was hier nicht der Fall war, aber beibehalten wurde. Für die Reinigung von SasC-His-2 wurde zuerst mit unverändertem Puffer gewaschen, anschließend ebenfalls mit erhöhter Ionenkonzentration und ein drittes Mal mit 1 % Tween20. Eluiert wurde 3 x mit 250 mM Imidazol. Für die Reinigung von SasC-His-3 waren zwei Waschschriffe (Waschpuffer normal und mit erhöhter NaCl-Konzentration) ausreichend. Allerdings konnte SasC-His-3 mit niedrigen Imidazolkonzentrationen (10 mM und 20 mM) besser eluiert werden, als mit hohen Konzentrationen (250 mM). SasC-His-4 wurde 1 x mit Waschpuffer mit 800 mM NaCl und 1 x mit LEW-Puffer mit 800 mM NaCl und 5 % Glycerin gewaschen. Die Elutionsbedingungen mussten nicht angepasst werden.

Da SasC-His-5 nur sehr schwach exprimiert wurde, jedoch ebenfalls unspezifische Proteine bei der Reinigung an die Säule gebunden wurden, wurden die Waschbedingungen nur geringfügig verändert (Erhöhung der Ionenkonzentration des Waschpuffers auf 800 mM). Damit sollten unspezifische Proteine vorsichtig von der Säule gewaschen werden, ohne dass gebundenes SasC-His-5 ebenfalls eluiert.

Nur SasC-His-DUF1542 ließ sich gut ohne Optimierung der Waschschriffe reinigen. Aufgrund der sehr hohen Expression wurde ein weiterer Elutionsschritt hinzugefügt.

Tabelle 4.1: Übersicht der Reinigungsschritte für SasC-His-Proteine

	SasC-His-NT	SasC-His-1	SasC-His-2	SasC-His-3
W1	LEW _{800 mM}	LEW _{800 mM}	LEW _{normal}	LEW _{normal}
W2	LEW _{800 mM} +5 % Glycerin	LEW _{800 mM} +5 % Glycerin	LEW _{800 mM}	LEW _{800 mM}
W3	LEW _{800 mM} +1 % Tween20	LEW _{800 mM} +1 % Tween20	LEW _{800 mM} +1 % Tween20	-
E1	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{10 mM}
E2	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM} ; pH 4.5	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{10 mM}
E3	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{20 mM}
E4	-	-	-	Imidazol _{250 mM}
	SasC-His-4	SasC-His-5	SasC-His-DUF1542	
W1	LEW _{800 mM}	LEW _{normal}	LEW _{normal}	
W2	LEW _{800 mM} +5 % Glycerin	LEW _{normal}	LEW _{normal}	
W3	-	LEW _{800 mM}	-	
E1	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM}	
E2	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM}	Imidazol _{250 mM}	
E3	Imidazol _{250 mM}	-	Imidazol _{250 mM}	
E4	-	-	Imidazol _{250 mM}	

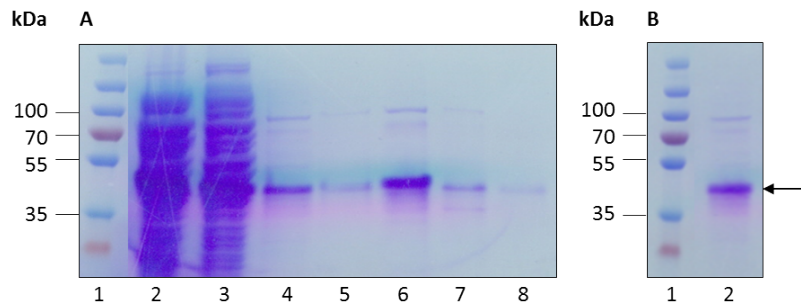


Abb. 4.5: **Reinigung von SasC-His-1.** **A** SDS-PAGE (1) Marker; (2) Lysat; (3) 1. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl); (4) 2. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl + 5 % Glycerin); (5) 3. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl + 1 % Tween20); (6)-(8) Elutionsfraktionen 1-3 von SasC-His-1 mit 250 mM Imidazol. Im 2. Elutionsschritt wurde der pH auf 4,5 verringert. **B** SDS-PAGE mit SasC-His-1-Entsalzung. Für die Entsalzung wurde die Elutionsfraktion 1 verwendet. (1) Marker; (2) Elutionsfraktion der SasC-His-1-Entsalzung.

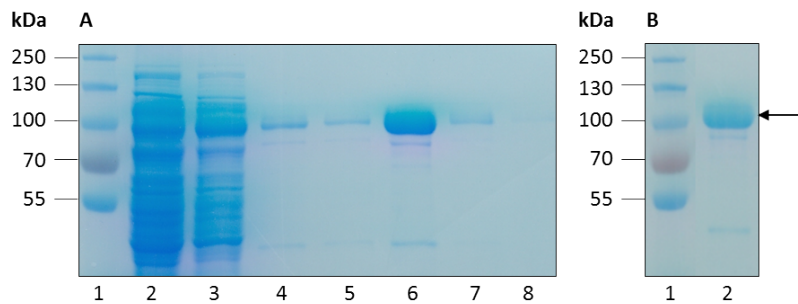


Abb. 4.4: **Reinigung von SasC-His-NT.** **A** SDS-PAGE (1) Marker; (2) Lysat; (3) 1. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl); (4) 2. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl + 5 % Glycerin); (5) 3. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl + 1 % Tween20); (6)-(8) Elutionsfraktionen 1-3 von SasC-His-NT mit 250 mM Imidazol. **B** SDS-PAGE der SasC-His-NT-Entsalzung. Für die Entsalzung wurde die Elutionsfraktion 1 verwendet. (1) Marker; (2) Elutionsfraktion der SasC-His-NT-Entsalzung.

Das theoretisch berechnete Molekulargewicht von SasC-His-NT liegt bei 68,139 kDa. Die Proteinbanden auf den SDS-Gelen in Abb. 4.4 laufen auf einer Höhe von ca. 100 kDa, was weder der Monomergröße entspricht, aber auch kein Dimer zu sein scheint, da für dieses das Molekulargewicht bei 136,2 kDa liegen würde. Bei ca. 40 kDa ist eine schwache Bande zu erkennen, welche durch Waschschritte nicht entfernt werden konnte.

Das Fusionsprotein SasC-His-1 besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 18,23 kDa bzw. 20 kDa inkl. der Peptidsequenz des pQE30Xa-Vektors. Die direkt vor dem SasC-Insert liegende Peptidsequenz des Vektor (HHHHHHGSGSGSGIEGRPYNGTGS) beinhaltet das 6x His-*Tag* und die Spaltstelle für den Faktor Xa, an welcher ggf. das His-*Tag* proteolytisch abgespalten werden kann. Die Proteinbande nach der Reinigung läuft bei 35-40 kDa, was der theoretischen Größe eines SasC-His-1-Homodimers entspricht.

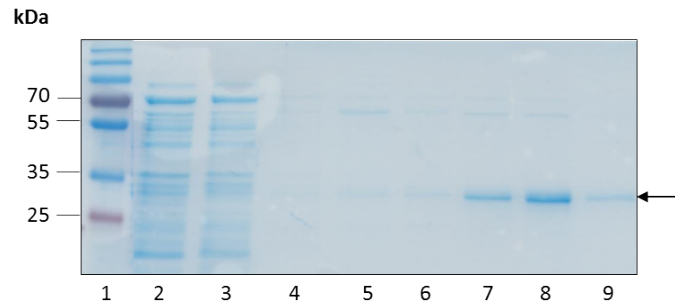


Abb. 4.6: **Reinigung von SasC-His-2.** (1) Marker; (2) Lysat, (3) 1. Waschfraktion (LEW); (4) 2. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl); (5) 3. Waschfraktion (LEW, 1 % Tween20); (6) 4. Waschfraktion (LEW, 5 % Glycerin); (7)-(9) Elutionsfraktionen 1-3 von SasC-His-2 mit 250 mM Imidazol.

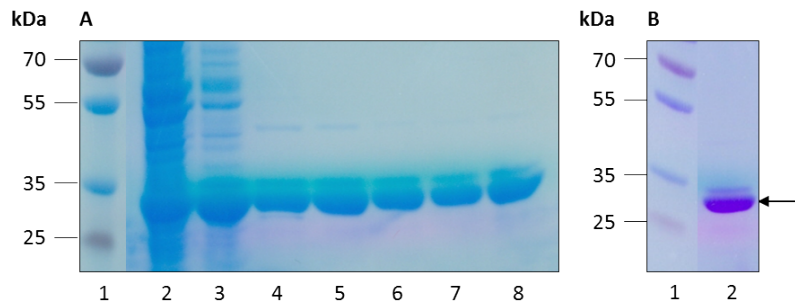


Abb. 4.7: **Reinigung von SasC-His-3.** **A** SDS-PAGE (1) Marker; (2) Lysat; (3) 1. Waschfraktion (LEW); (4) 2. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl); (5)-(6) Elutionsfraktionen 1 und 2 von SasC-His-3 mit 10 mM Imidazol; (7) Elutionsfraktion 3 von SasC-His-3 mit 20 mM Imidazol; (8) Elutionsfraktion 4 von SasC-His-3 mit 250 mM Imidazol. **B** SDS-PAGE mit SasC-His-3-Entsalzung. Für die Entsalzung wurde die Elutionsfraktion 1 verwendet. (1) Marker; (2) Elutionsfraktion der SasC-His-3-Entsalzung.

Ab der 2. Waschfraktion von SasC-His-1 (Abb. 4.5, A, Lanes 4+7) und in der Entsalzungsfraktion (Abb. 4.5, B, Lane 2) sind schwache Banden bei 60 kDa und 70 kDa zu erkennen.

Das SasC-His-2-Protein, welches ein theoretisches Molekulargewicht von 25 kDa, bzw. 26,79 kDa inkl. der N-terminalen Peptidsequenz, welche vom Expressionsvektor (pQE30Xa) vorgegeben wird, konnte nur in geringer Ausbeute isoliert werden. Auch die Reinheit des Eluates (Abb. 4.6, Lane 8) konnte nicht in einem größeren Ansatz reproduziert werden. Für Interaktionsstudien sind größere Mengen Protein notwendig, welche nach der Entsalzung noch einen weiteren Verlust erleiden. Wie in Abb. 4.5 sind auch hier zusätzliche Banden bei 60 kDa und 70 kDa vorhanden.

Für das SasC-His-3-Fusionsprotein konnte eine hohe Ausbeute bei gleichzeitig hoher Reinheit erzielt werden. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 25,32 kDa bzw. 27,09 kDa, wenn der translatierte Peptidanteil aus (pQE30Xa) berücksichtigt wird. Für SasC-His-3 wurden vier Elutionsschritte durchgeführt, um möglichst viel gebundenes Protein zu eluieren. Zum wiederholten Mal ist die Kontaminationsbande mit 40 kDa zu erkennen.

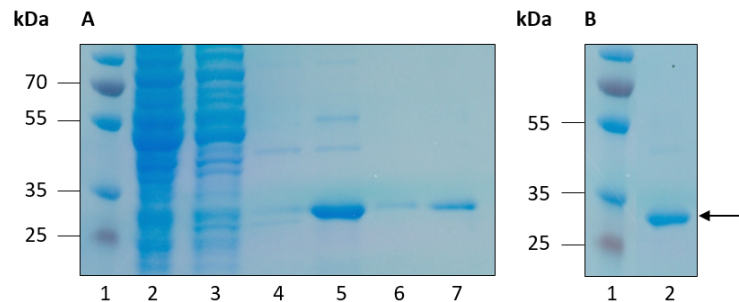


Abb. 4.8: **Reinigung von SasC-His-4.** **A** SDS-PAGE (1) Marker; (2) Lysat; (3) 1. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl); (4) 2. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl + 5 % Glycerin); (5)-(7) Elutionsfraktionen 1-3 von SasC-His-4 mit 250 mM Imidazol. **B** SDS-PAGE mit SasC-His-4-Entscheidung. Für die Entscheidung wurde die Elutionsfraktion 1 verwendet. (1) Marker; (2) Elutionsfraktion der SasC-His-4-Entscheidung.

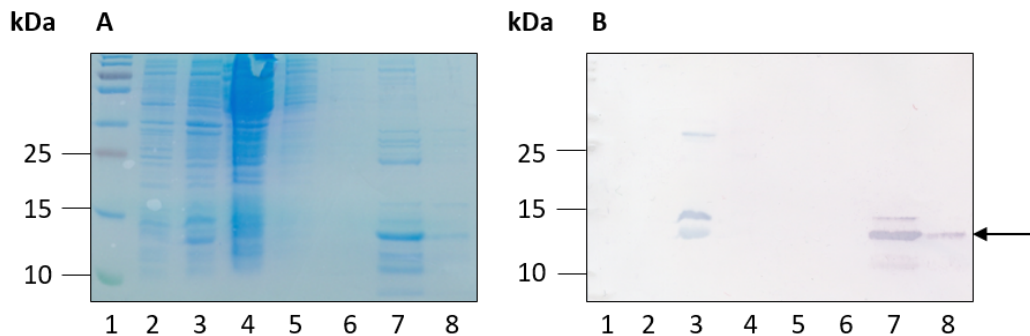


Abb. 4.9: **Reinigung von SasC-His-5.** **A** SDS-PAGE; **B** Western Blot mit anti-His-Antikörper. (1) Marker; (2) nicht-induziertes Lysat; (3) mit IPTG induziertes Lysat; (4) 1. Waschfraktion (LEW); (5) 2. Waschfraktion (LEW); (6) 3. Waschfraktion (LEW, 800 mM NaCl); (7)-(8) Elutionsfraktionen 1-2 von SasC-His-5 mit 250 mM Imidazol.

Das berechnete Molekulargewicht von SasC-His-4 liegt bei 22,25 kDa bzw. bei 23,8 kDa (inkl. der kurzen Peptidsequenz des Vektors). In Abb. 4.8 A in den Lanes 4 und 5 sind Kontaminationsbanden bei 40 kDa, 60 kDa und 70 kDa zu erkennen.

Auf dem SDS-Gel einer SasC-His-5-Reinigung in Abb. 4.9 sind viele unspezifische Banden im Eluat 1 sichtbar. Im Western Blot in Abb. 4.9 B3, konnte in den Lanes 7 und 8 eine Proteinbande zwischen 10-15 kDa detektiert werden. Dies entspricht der Größe des SasC-His-5-Fragmente von 12,25 kDa bzw. 14,02 kDa (inkl. Vektorsequenz). Da die Expression von SasC-His-5 sehr gering war, wurden keine weiteren Waschschritte eingeführt, die die Ausbeute noch weiter verringert hätten. Es konnte nicht genügend SasC-His-5 für die Interaktionstudien gereinigt werden.

Die DUF1542-Domänen 4-11 konnten als His-Fusionsproteine in hoher Ausbeute und Reinheit isoliert werden (Abb. 4.10). SasC-His-DUF1542 läuft auf dem SDS-Gel auf einer Höhe von 90 kDa, was nicht dem

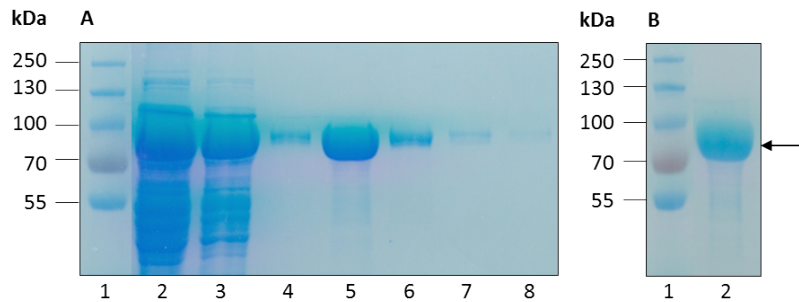


Abb. 4.10: **Reinigung von SasC-His-DUF1542.** **A** SDS-PAGE (1) Marker; (2) Lysat; (3) 1. Waschfraktion (LEW); (4) 2. Waschfraktion (LEW); (5)-(8) Elutionsfraktionen 1-4 von SasC-His-DUF1542 mit 250 mM Imidazol. **B** SDS-PAGE mit SasC-His-DUF1542-Entsalzung. Für die Entsalzung wurde die Elutionsfraktion 1 verwendet. (1) Marker; (2) Elutionsfraktion der SasC-His-DUF1542-Entsalzung.

Tabelle 4.2: **Zusammenfassung der Eigenschaften der SasC-His-Proteine**

Fusionsprotein	[bp]	[kDa]	pI _{theoret.}	[kDa] _{+His/Xa}
SasC-NT	1860	66,37	5,47	68,83
SasC-His-1	531	18,23	5,45	20,69
SasC-His-2	702	25,00	5,55	27,46
SasC-His-3	678	25,32	5,65	27,78
SasC-His-4	603	22,25	5,09	24,71
SasC-His-5	321	12,25	5,55	14,71
SasC-His-DUF1542	1842	66,47	4,84	68,93

berechneten Molekulargewicht von 66,38 kDa bzw. 68,15 kDa, mit zusätzlicher Peptidsequenz des Vektors, oder der Größe eines mutmaßlichen Multimers entspricht. Dieser Effekt war auch bei der Reinigung von SasC-His-NT zu beobachten, jedoch bei keinem anderen SasC-His-Fusionsprotein. In Tabelle 4.1. sind die Eigenschaften der gereinigten SasC-His-Proteine zusammengefasst. Nach erfolgreicher Reinigung der SasC-His-Fusionsproteine konnten weiterführende *in vivo* und *in vitro*-Interaktionsstudien durchgeführt werden, um die Beteiligung der verschiedenen Domänen an der SasC-vermittelten Zellaggregation zu untersuchen.

4.1.4 Klonierung von nicht-überlappenden N-terminalen SasC-Subdomänen

Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Klone zur Expression N-terminaler SasC-Subdomänen (Abb. 4.11) sollten zur genauen Identifizierung und Charakterisierung der an der SasC-vermittelten Zellaggregation beteiligten Domänen heterolog exprimiert und gereinigt werden und für *in vitro*, sowie *in vivo*-crosslinking-Experimente verwendet werden (Anhang A1.2.1). Im Unterschied zu den His-Fusionsproteinen aus den Abb. 4.2 und 4.3, finden sich hier keine Überlappungen der verschiedenen Proteindomänen.

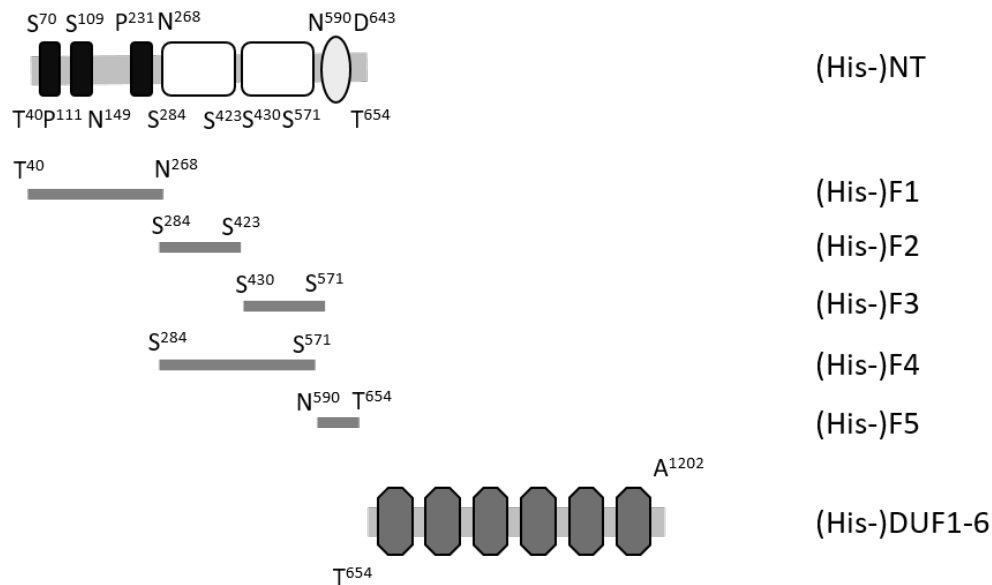


Abb. 4.11: **Schematische Darstellung der nicht-überlappenden SasC-Subdomänen.** Die Subklone der N-terminalen SasC-Subdomänen überlappen sich nicht und enthalten jeweils nur die Gensequenz(en) eines Domärentyps des N-Terminus. (His-)NT (T⁴⁰ – T⁶⁵⁴); (His-)F1 (T⁴⁰ – N²⁶⁸); (His-)F2 (S²⁸⁴ – S⁴²³); (His-)F3 (S⁴³⁰ – S⁵⁷¹); (His-)F4 (S²⁸⁴ – S⁵⁷¹); (His-)F5 (N⁵⁹⁰ – T⁶⁵⁴); (His-)DUF1-6 (T⁶⁵⁴ – A¹²⁰²).

Das (His-)NT-Konstrukt enthält die Gensequenz für den gesamten N-Terminus von T⁴⁰ bis T⁶⁵⁴. Der Subklon (His-)F1 beinhaltet die Sequenzen der drei SR von T⁴⁰ bis N²⁶⁸, (His-)F2 das die Sequenz des ersten LR von S²⁸⁴ bis S⁴²³, (His-)F3 die des zweiten LR von S⁴³⁰ bis S⁵⁷¹, (His-)F4 die Sequenz beider LR von S²⁸⁴ bis S⁵⁷¹ und (His-)F5 das Gen für die FIVAR-Domäne von N⁵⁹⁰ bis T⁶⁵⁴. Das (His-)DUF1-6-Konstrukt beinhaltet die Sequenzen der DUF1542-Domänen 1-6 von T⁶⁵⁴ bis A¹²⁰². Diese Fragmente wurden mittels passender Primerpaare in (pUT18C) und (pKT25) (Abschnitt 3.5.3; Anhang A1.2.2 und 1.2.3) für *in vivo*-Interaktionsstudien oder in (pQE30Xa) zur heterologen Expression und Reinigung über ein His-Tag kloniert. Die Agarosegele der PCR-Produkte der Fragmente sind in Abb. 4.12 dargestellt.

4.1.5 Expression von SasC-(His-)F1, -F2, -F3, -F4 und -F5

Für die Expression von SasC-(His-)F1, SasC-(His-)F2, SasC-(His-)F3, SasC-(His-)F4 und SasC-(His-)F5 wurden die Gensequenzen über *Bam*HI und *Kpn*I-Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor (pQE30Xa) eingebracht und die *E. coli*-Stämme TG-1 und TOP10 (kommerziell erhältliche kompetente Zellen) mit den Ligationsansätzen transformiert. Von den gewachsenen Klonen (Selektionsmedium mit Antibiotika) wurden die Plasmide isoliert, Restriktionsanalysen durchgeführt und das Konstrukt (korrektes Insert) mittels Sequenzierung überprüft. Da in den Expressionstests keine SasC-His-Fusionsproteine

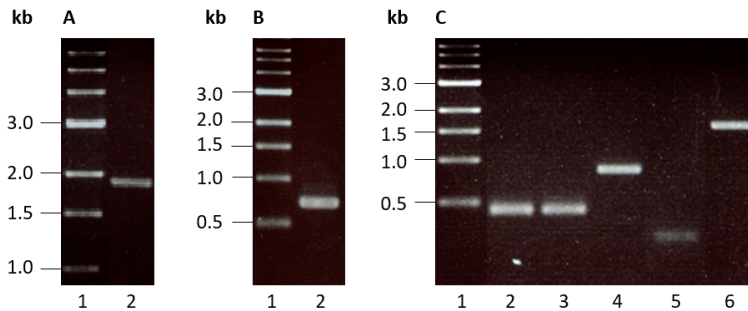


Abb. 4.12: Agarosegele der PCR-Produkte zur Konstruktion der N-terminalen Fragmente. **A** (1) Marker: 1 kB DNA ladder; (2) (His-)NT mit 1860 bp, **B** (1) Marker: 1 kB DNA ladder; (2) (His-)F1 mit 627 bp, **C** (1) Marker: 1 kB DNA ladder; (2) (His-)F2 mit 420 bp; (3) (His-)F3 mit 426 bp; (4) (His-)F4 mit 864 bp; (5) (His-)F5 mit 195 bp; (6) (His-)DUF1-6 mit 1647 bp.

Tabelle 4.3: Theoretische Eigenschaften der nicht-überlappenden SasC-Dubdomänen

Fusionsprotein	[bp]	[kDa]	pI	[kDa] _{+His/Xa}
(His-)F1	627	23,69	5,10	26,15
(His-)F2	420	15,47	5,86	17,93
(His-)F3	426	15,62	5,76	18,08
(His-)F4	864	31,81	5,97	34,27
(His-)F5	195	7,54	8,39	10,00

mittels Western Blot-Analysen nachgewiesen werden konnten, wurden für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien die SasC-His-Fusionsproteine SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-3, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 (Abb. 4.2 und Abb. 4.3) verwendet. In Tabelle 4.3 sind die theoretischen Eigenschaften der nicht-überlappenden SasC-Fragmente zusammengefasst.

4.2 Interaktionsstudien zur Identifizierung der Aggregation- und Biofilmbildung-vermittelnden SasC-Domänen

Interaktionsstudien wurden sowohl *in vitro*, mit gereinigten Proteinen, oder *in vivo* durchgeführt. Mit verschiedenen Methoden sollten die Domänen des N-Terminus von SasC identifiziert werden, welche in der SasC-abhängigen Zellaggregation und damit in der Biofilmbildung involviert sind.

4.2.1 SasC-His-Proteine zeigen Interaktionen im Western Liganden-Blot

Um die Interaktion von Proteinen zu untersuchen, wurde eine native PAGE mit anschließendem Western Liganden-Blot durchgeführt. Der Erfolg der Biotinylierungsreaktion wurde auf einem Dotblot-Assay (Abb. 4.13) überprüft. Ein nicht-biotinyliertes Protein wird nicht von Streptavidin gebunden, so dass

auch keine Umsetzung des Substrates NBT/BCIP durch die an das Streptavidin gekoppelte AP stattfindet. Erfolgreich biotinylierte SasC-His-Proteine wurden für die Western Liganden Blot-Analysen eingesetzt. Bis auf SasC-His-NT, welches auch nicht-biotinyliert schwach von Streptavidin-AP gebunden wird, zeigt keines nicht-biotinylierten SasC-His-Proteine eine Reaktion mit Streptavidin. Es besteht ein großer Unterschied in der Intensität der Farbreaktion zwischen biotinyliertem und nicht-biotinyliertem SasC-His-NT.

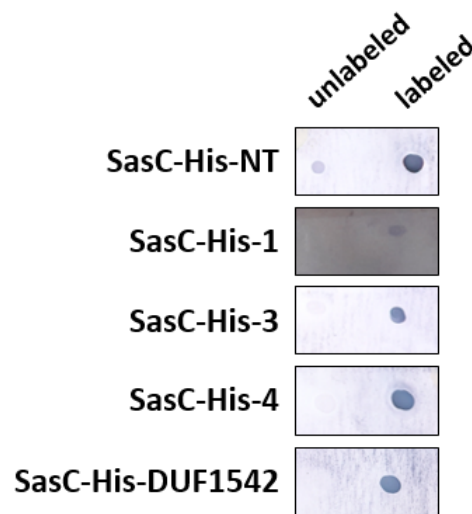


Abb. 4.13: **Dotblot-Biotinylierungstest von SasC-His-Proteinen.** Die SasC-His-Fusionsproteine SasC-His-1; SasC-His-3; SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 zeigen ohne Biotinylierung keine Reaktion mit Streptavidin-AP. SasC-His-NT zeigt nicht-biotinyliert eine sehr schwache Reaktion.

Auf das native Gel (Abb. 4.14) wurden gleiche Mengen der SasC-His-Proteine aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass SasC-His-4 nicht als distinkte Bande läuft, sondern erscheint verschmiert. SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-3 und SasC-His-DUF1542 dagegen laufen als gut abgegrenzte Banden. Keines der Proteine läuft auf der erwartete Höhe, so dass eine Größenbestimmung über den nativen Marker nicht möglich ist. Da mit diesen Versuchen allerdings ausschließlich Protein-Protein-Interaktionen unter nativen Bedingungen untersucht werden sollten, wurde dieser Umstand vernachlässigt. In Abbildung 4.14 A+B sind exemplarisch zwei Western Liganden-Blots einer nativen PAGE abgebildet. In Panel B wurde nur biotinyliertes Protein (hier SasC-His-4) zugegeben, in Ansatz C wurde zum Ansatz noch Zink hinzugegeben. Ohne Zugabe von Zink zeigt das Ligandenprotein SasC-His-4-Biotin eine starke Reaktion mit immobilisiertem SasC-His-4 und ein sehr schwaches Signal mit SasC-His-NT (aber: im Biotinylierungstest zeigt SasC-His-NT auch unbiotinyliert ein schwaches Signal). Im Vergleich zu Panel B ist zu erkennen, dass sich das Interaktionsverhalten der Proteine bei Zugabe von bivalenten Kationen (Zn^{2+}) verändert. Besonders mit SasC-His-1 ist die Reaktion stärker, wohingegen die Reaktion biotinyliertem SasC-His-4 mit SasC-His-NT unbeeinflusst von der Zinkzugabe bleibt. Mit SasC-His-3 interagiert SasC-His-4-Biotin

nicht, und mit SasC-His-DUF1542 nur unter Zinkzugabe sehr schwach.

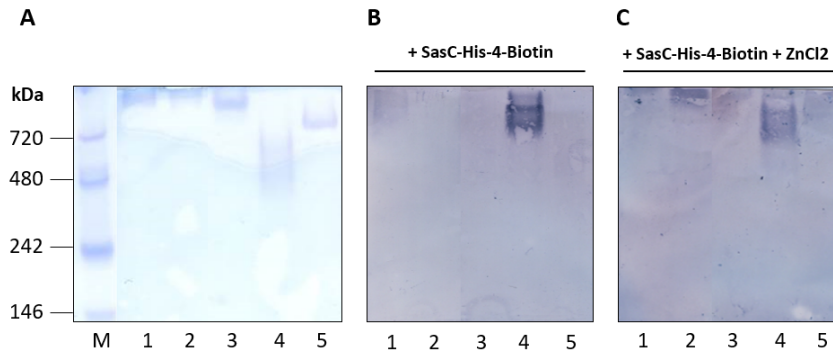


Abb. 4.14: **A Coomassie gefärbtes Gel einer nativen PAGE.** SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-3 und SasC-His-DUF1542 sind distinkte Banden am oberen Rand des Gels zu sehen, während SasC-His-4 als Schmier zu sehen ist. **B Western Liganden Blot nach Inkubation mit biotinyliertem SasC-His-4.** Nach einer Inkubation mit biotinyliertem SasC-His-4 ist eine schwache Reaktion mit SasC-His-NT und eine starke Reaktion mit SasC-His-4 zu beobachten. **C Western Liganden Blot nach Inkubation mit biotinyliertem SasC-His-4 + ZnCl₂** Zugabe von ZnCl₂ zu biotinyliertem SasC-His-4 führt zu Interaktion mit allen immobilisierten Proteinen. (M) Marker: Native Unstained Page Ruler; (1) SasC-His-NT; (2) SasC-His-1; (3) SasC-His-3; (4) SasC-His-4; (5) SasC-His-DUF1542.

In Tab. 4.4 sind die Ergebnisse der Western Liganden-Blot zusammengefasst. Die Intensitäten der Farbreaktionen wurden subjektiv eingeschätzt und beurteilt, was eine Unterscheidung zwischen einer schwachen und einer fehlenden Reaktion erschwerte. Ohne Zinkzugabe interagiert SasC-His-NT-Biotin mit sich selbst und mit SasC-His-4 stark, aber nur schwach mit SasC-His-1, SasC-His-3 und SasC-DUF1542 und bei Wiederholung des Versuchs fand keine Reaktion statt. SasC-His-1-Biotin zeigt hier nur eine Interaktion mit SasC-His-4. SasC-His-3-Biotin zeigt mit allen gebundenen Proteinen eine Interaktion - mit SasC-His-NT und SasC-His-3 die Stärkste.

Biotinyliertes SasC-His-4 interagiert schwach mit SasC-His-NT und stark mit sich selbst - wohingegen immobilisiertes SasC-His-4 mit allen biotinylierten Liganden reagiert. Interessanterweise zeigte sich auch eine Farbreaktion von SasC-His-DUF1542-Biotin mit SasC-His-NT und SasC-His-4 - beide Ansätze wurden nur einmalig durchgeführt. Zusammenfassend ist aus Tab. 4.4 B zu entnehmen, dass Zugabe von Zink zu einer Veränderung im Interaktionsmuster führt. So reagieren alle biotinylierten SasC-His-Proteine nicht mehr nur mit SasC-His-4, sondern auch verstärkt mit gebundenem SasC-His-NT und SasC-His-1. Biotin-SasC-His-1 zeigt eine sehr schwache oder keine Interaktion mit SasC-His-NT unter Zinkeinfluss. Biotin-SasC-His-NT reagiert jedoch schwach mit SasC-His-1. Keines der biotinylierten Proteine reagiert reproduzierbar stark mit SasC-His-3 aber *vice versa* reagiert SasC-His-3-Biotin mit SasC-His-4. Auf der Membran gebundenes SasC-His-4 interagiert mit allen biotinylierten Proteinen stark, jedoch reagierte Biotin-SasC-His-4 nur schwach mit SasC-His-NT und stark mit sich selbst, aber nicht mit den anderen Proben auf der Membran. Eine weitere Auffälligkeit ist eine starke Reaktion von Biotin-SasC-

His-DUF1542 mit gebundenem SasC-His-4 und eine schwache Reaktion mit sich selbst, welche auch ohne Zinkzugabe beobachtet werden konnte. Das Interaktionsmuster der SasC-His-Fusionsproteine änderte sich, wenn Zn^{2+} in Form von ZnCl_2 (10 mM) zu den biotinylierten Proteinen zugegeben wurde (Tab. 4.4 B). SasC-His-3 interagiert kaum mit den Biotin-Proteinen, doch Biotin-SasC-His-3 zeigt im Gegenzug schwache und starke Reaktionen mit allen gebundenen Proben, nur die Schwächste mit sich selbst. SasC-His-4 zeigt durchgehend eine starke Reaktivität mit allen Biotin-Proben, doch reagiert Biotin-SasC-His-4 in Anwesenheit von Zinkionen auch mit allen Proteinen. Der offensichtlichste Unterschied zwischen beiden Bedingungen ist, dass Zinkzugabe zur Interaktion von DUF1542-Domänen mit allen Domänen des N-Terminus führt. Dies betrifft Biotin-SasC-His-DUF1542, als auch SasC-His-DUF1542 mit anderen Biotin-Proteinen. Allgemein betrachtet scheint das Vorhandensein von Zinkionen die Protein-Protein-Interaktionen der SasC-Proteine zu verstärken. Biotin ist ein sehr kleines Molekül, dessen Einsatz und Funktionalität gut dokumentiert ist und sollte das Interaktionsverhalten der SasC-His-Proteine nicht beeinflussen. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse kann dies zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es wurde keine Interaktion von Ligandenproteinen mit gebundenem SasC-His-2 detektiert.

A auf Membran gebunden

		SasC-His-NT	SasC-His-1	SasC-His-2	SasC-His-3	SasC-His-4	SasC-His-DUF1542	
Biotin-Protein [10 µg/ml]	SasC-His-NT	Exp. 1	weak	weak	-	weak	+	weak
		Exp. 2	+	weak	-	-	+	-
	SasC-His-1	Exp. 1	-	-	-	-	+	-
		Exp. 2	-	-	-	-	+	-
		Exp. 3	-	-	-	-	+	-
	SasC-His-3	Exp. 1	+	weak	weak	weak	+	weak
		Exp. 2	+	weak	-	-	+	-
SasC-His-4	Exp. 1	weak	-	-	-	+	-	
SasC-His-DUF1542	Exp. 1	+	-	-	-	+	weak	

B auf Membran gebunden

		SasC-His-NT	SasC-His-1	SasC-His-2	SasC-His-3	SasC-His-4	SasC-His-DUF1542	
Biotin-Protein [10 µg/ml] + ZnCl ₂ [10 mM]	SasC-His-NT	Exp. 1	+	+	-	+	+	+
		Exp. 2	-	+	-	-	-	-
		Exp. 3	+	+	-	-	weak	weak
		Exp. 4	+	+	-	-	weak	+
	SasC-His-1	Exp. 1	-/weak	+	-	-	weak	-
		Exp. 2	-/weak	+	-	weak	+	weak
		Exp. 3	-/weak	+	-	-	+	+
	SasC-His-3	Exp. 1	-/weak	-	-	-	+	-/weak
		Exp. 2	+	+	-	-	+	-
	SasC-His-4	Exp. 1	+	+	-	weak	+	weak
		Exp. 2	weak	weak	-	-	+	-/weak
		Exp. 3	weak	+	-	-	+	weak
	SasC-His-DUF1542	Exp. 1	-	-	-	-	+	-
		Exp. 2	+	+	-	+	+	+
		Exp. 3	weak	weak	-	-	+	weak

Tabelle 4.4: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Western-Liganden Blots. **A Interaktionsmuster bei Inkubation ohne Zink.**; **B Interaktionsmuster bei Inkubation mit Zink.** Eine eindeutige starke Farbreaktion ist mit (+) gekennzeichnet, eine schwache Reaktion mit (weak) und keine Farbreaktion mit (-). Es konnte kein eindeutiges Interaktionsmuster beobachtet werden. Zugabe von Zink führt zur Verstärkung der Interaktion von Liganden mit immobilisiertem SasC-His-1 oder SasC-His-DUF1542. Die Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Versuchen schwankt zum Teil stark.

4.2.2 *In vitro*-crosslinking führt zu Dimer- und Multimerbildung von SasC-His-Proteinen

Mit den *crosslinking*-Experimenten mit BS³ sollte die Fähigkeit der verschiedenen SasC-Domänen zur Multimerbildung untersucht werden. Durch die Zugabe von Bis-Sulfosuccinimidylsuberat (BS³) können Proteine kovalent aneinander gekoppelt werden, wenn sie sich in räumlicher Nähe befinden. In dieser

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der *crosslinking*-Ergebnisse mit BS³

SasC-Fragment	Proteinkomplexe
+ SasC-His-NT	Multimere
+ SasC-His-1	Dimere
+ SasC-His-3	Dimere
+ SasC-His-4	Dimere, Multimere
+ SasC-His-DUF1542	Multimere

Arbeit zeigen die SasC-His-Proteine unterschiedliches Interaktionsverhalten in Anwesenheit des *crosslinker*-Moleküls.

In Abb. 4.15 sind SDS-Gele der *crosslinking*-Ansätze und die dazugehörigen Western Blots dargestellt. So sind bei SasC-His-NT (A+B) zusätzliche Banden auf dem Gel und dem Blot zu erkennen, wenn BS³ zugegeben wurde. Wie bereits beobachtet wurde, läuft die Monomer-Bande nicht auf der erwarteten Höhe von 68 kDa. Die zusätzlichen Banden sind größer als 250 kDa; die exakten Größen können hier über das SDS-Gel nicht bestimmt werden. Das Bandenmuster erscheint bei 20 x und 40 x molarem Überschuss identisch. Bei SasC-His-1 (C+D) verändert sich mit Zugabe von BS³ das Bandenmuster. Bei einem Überschuss von BS³ schwindet die Intensität der Monomerbande bei 35 kDa, dafür ist eine zusätzliche Bande bei 70 kDa sichtbar, was einem SasC-His-1-Tetramer, bzw. einem Homodimer aus zwei SasC-His-1-Dimeren, entsprechen würde. Wird BS³ zu SasC-His-3 (E+F) gegeben, so entsteht ein mutmaßliches Dimer mit einer Größe von ca. 55 kDa (SasC-His-3-Monomer: 25,32 kDa). Im Unterschied zu SasC-His-NT oder SasC-His-1 ist die Intensität der Dimerbande abhängig von der BS³-Konzentration. Bei 40 x molarem Überschuss ist die Dimerbande stärker, während die Monomerbande schwächer wird. Dennoch scheint die Dimerbildung insgesamt schwächer zu sein als bei anderen SasC-His-Proteinen. Bei SasC-His-4 (G+F) erscheint in der Coomassie-Färbung die Monomerbande bei 22 kDa und eine potentielle Dimerbande bei 50 kDa. Der anti-His-Antikörper detektiert noch weitere Multimerbanden bei 100 kDa, was der Größe eines Tetramers entsprechen würde, und bei 200 kDa, was einem putativen Oktamer entspricht.

Die Zugabe von BS³ führt auch zur Bildung von SasC-His-DUF1542-Multimeren (I+K) mit Molekulargewichten > 130 kDa. Die genauen Größen können über den hier verwendeten Marker nicht exakt bestimmt werden, weswegen auch keine Aussage darüber getroffen werden kann, um welche Art von Multimeren es sich handelt. Als Kontrolle wurde His-DHFR (L+M), von welchem keine Interaktion mit sich selbst bekannt ist, verwendet. In keinem Ansatz führt Zugabe von BS³ zu einer Veränderung des Bandenmusters des His-DHFR oder zur Bildung von Multimeren. Ebenfalls wurde der Einfluss von Zink auf das Interaktionsverhalten der SasC-His-Proteine untersucht, wobei keine Änderung des Bandenmusters in Anwesenheit von BS³ und Zink beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die SasC-His-Proteine zeigen unterschiedliches Dimerisierungsverhalten. SasC-His-NT bildet Multimere, SasC-His-1 und SasC-His-3 Dimere, SasC-His-4 Dimere und weitere Multimere und SasC-His-DUF1542 Multimere nicht genau bestimmbarer Größe. Tabelle 4.5 fasst die in den BS³-Experimenten

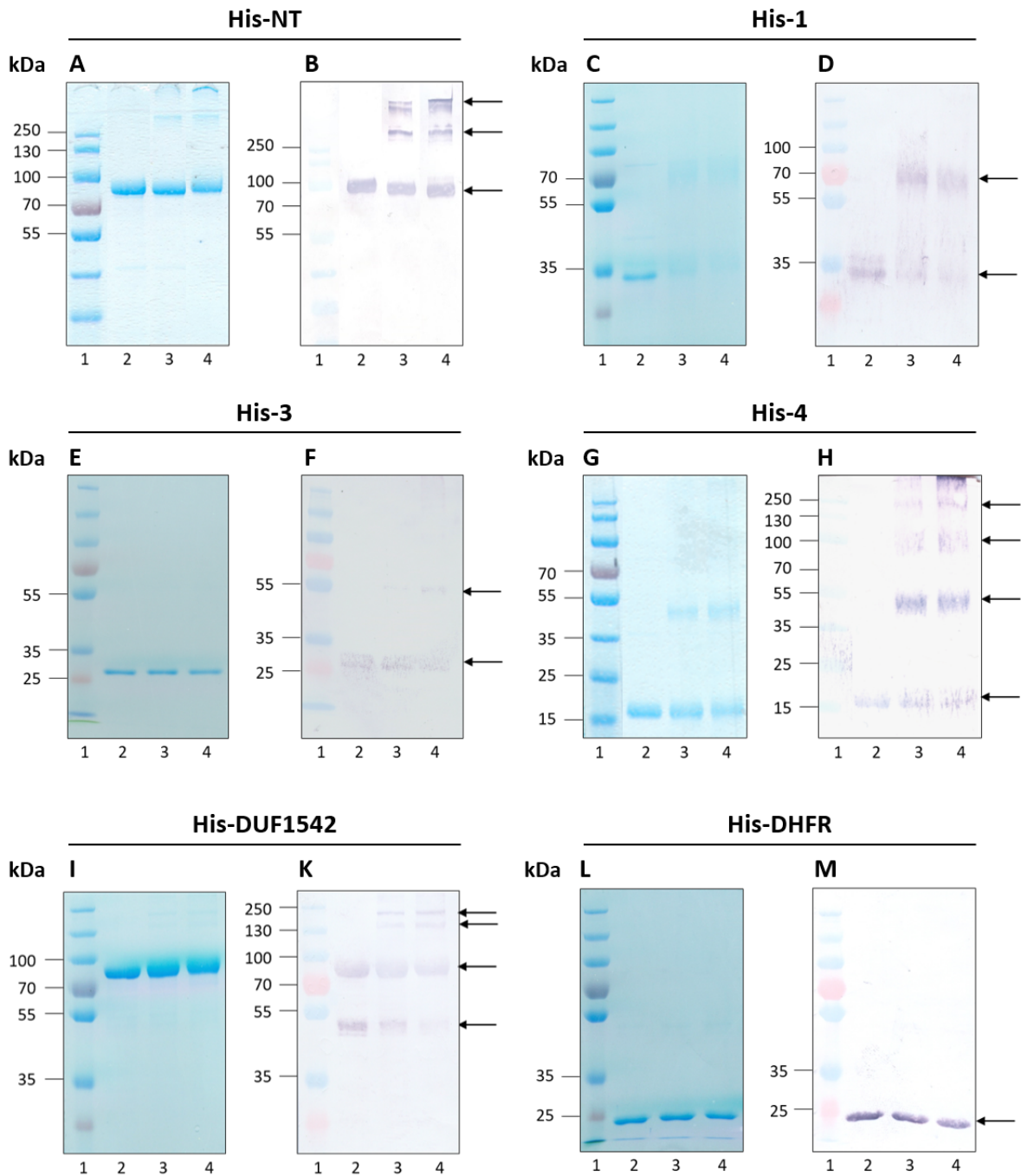


Abb. 4.15: **Homotypisches crosslinking** von SasC-His-Proteinen mit BS³. A+B: SasC-His-NT; C+D: SasC-His-1; E+F: SasC-His-3; G+H: SasC-His-4; I+K: SasC-His-DUF1542; L+M: His-DHFR. Linkes Panel: SDS-PAGE; Rechtes Panel: Western Blot inkubiert mit anti-His-Antikörper (1:5000). (1) Marker; (2) SasC-His-Protein ohne BS³; (3) SasC-His-Protein mit 20 x molarem BS³-Überschuss; (4) SasC-His-Protein mit 40 x molarem BS³-Überschuss.

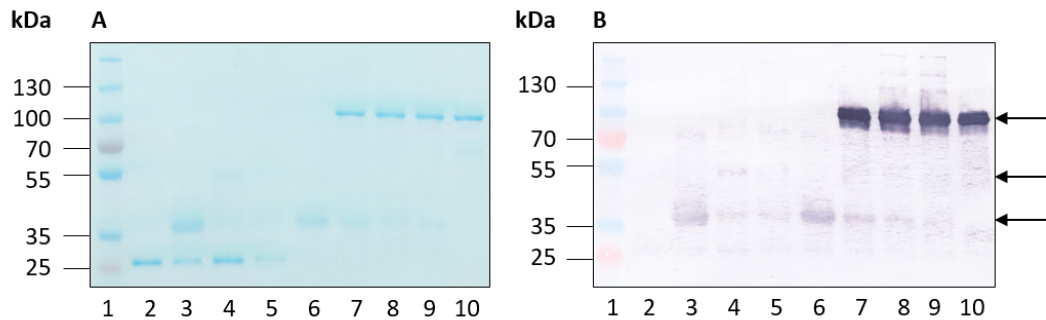


Abb. 4.16: **Heterotypisches crosslinking von SasC-His-1 mit SasC-His-4 und SasC-His-1 mit SasC-His-NT mit BS³.** **A** Coomassie-gefärbte 10% SDS-PAGE; **B** Western Blot inkubiert mit anti-His-Antikörper. (1) Marker; (2) SasC-His-4; (3) SasC-His-1 + SasC-His-4 (1:1 molares Verhältnis); (4) SasC-His-1 + SasC-His-4 (1:1 molares Verhältnis) mit 20 x molarem Überschuss an BS³; (5) SasC-His-1 + SasC-His-4 (1:1 molares Verhältnis) mit 40 x molarem Überschuss von BS³; (6) SasC-His-1; (7) SasC-His-1 + SasC-His-NT (1:1 molares Verhältnis); (8) SasC-His-1 + SasC-His-NT (1:1 molares Verhältnis) mit 20 x molarem Überschuss an BS³; (9) SasC-His-1 + SasC-His-NT (1:1 molares Verhältnis) mit 40 x molarem Überschuss von BS³; (10) SasC-His-NT.

beobachteten Protein-Multimerbildung zusammen. So konnten für SasC-His-NT Multimere mit nicht genau definierbarer Größe (> 250 kDa) beobachtet werden, bei SasC-His-1 ist neben der Monomerbande, wobei diese vermutlich bereits selber aus zwei SasC-His-1-Proteinen besteht (ca. 35 kDa) eine zusätzliche Dimerbande von 70 kDa zu erkennen. Bei SasC-His-3 war neben der Monomerbande von 25 kDa eine schwache Dimerbande bei 50 kDa zu sehen. Für SasC-His-4 konnten eine eindeutige Dimerbande bei 50 kDa, als auch Multimerbanden bei 100 und 200 kDa beobachtet werden. Die Größen der SasC-His-DUF1542-Multimere konnten nicht genau bestimmt werden.

Für den Nachweis einer heterotypischen Interaktion, wurden SasC-His-1 und SasC-His-4 in äquimolaren Mengen gemischt (1:1) und mit BS³ versetzt (Abb. 4.16). Die Proteine wurden ausgewählt, da SasC-His-4 bereits in den Western Liganden-Blots mit allen anderen Fragmenten Interaktion zeigte und SasC-His-1 mutmaßlich im nativen Zustand als Dimer vorliegt. Zudem haben beide Proteine gut unterscheidbare Molekulargewichte, so dass die verschiedenen Banden und potentielle Multimere einander nicht überlappen würden. SasC-His-NT wurde gewählt, da dieses alle N-terminalen Subdomänen besitzt und theoretisch sowohl mit SasC-His-1 als auch mit SasC-His-4 reagieren müsste.

Die Interaktion von SasC-His-NT mit jeder anderen SasC-Subdomäne wird in dieser Arbeit als "heterotypisch" bezeichnet, da die Zusammensetzung und Struktur der Proteine nicht identisch ist. Die Interaktion der einzelnen rekombinanten Subdomänen mit ihren Pendant in SasC-His-NT ist natürlich homotypischer Art.

Auf dem SDS-Gel (Abb. 4.16 A) sind die Monomerbanden von SasC-His-4 in den Lanes 2-5, sowie die Monomerbande von SasC-His-1 (Lanes 3+4) zusätzlich sichtbar. Interessanterweise wird im Western Blot nur die Dimerbande von SasC-His-1 vom anti-His-Antikörper detektiert.

In Lane 4 ist im Blot eine Bande zu sehen, welche einem SasC-His-4-Dimer entspricht. Eine vergleichbare Bande konnte für SasC-His-4 bereits in den BS³-Versuchen zur homotypischen Interaktion beobachtet werden (Abb. 4.15 G+F). Wird BS³ (Lanes 4+5) hinzugegeben, so ist die SasC-His-1-Proteinbande merklich schwächer. Ein Dimer aus einem SasC-His-1-Monomer (36 kDa) und einem SasC-His-4-Monomer (25 kDa) hätte eine Größe von 61 kDa. Jedoch ist eine Bande dieser Größe weder auf der SDS-PAGE noch im Blot erkennbar. In Lane 6 ist nur SasC-His-1 aufgetragen; die Bande ist gut sichtbar im Gel und im Blot.

Ist SasC-His-NT im Ansatz vorhanden, aber kein BS³ (Lane 7), so wird die SasC-His-1-Bande schwächer, ist jedoch noch erkennbar. Wurde BS³ dazugegeben (Lanes 8+9), so verschwindet die SasC-His-1-Bande nahezu vollständig. Im Größenbereich > 250 kDa sind einige schwache Banden zu erkennen, welche vermutlich SasC-His-NT-Multimere darstellen (siehe Abb. 4.15 A+B). Ein Dimer aus SasC-His-1 (36 kDa) und SasC-His-NT (68 kDa) hätte ein theoretisches Molekulargewicht von 104 kDa. Auch wenn SasC-His-NT bereits auf einer Höhe von ca. 100 kDa läuft, so würde eine heterotypische Interaktion eine sichtbare Veränderung im Bandenmuster zur Folge haben. Doch kann kein Unterschied zwischen einer reinen SasC-His-NT-Bande (Lane 10) und dem Ansatz mit SasC-His-1 und BS³ festgestellt werden.

4.2.3 *In vivo*-crosslinking führt zu keiner Interaktion der SasC-His-Proteine

Für die *in vivo*-Interaktionsstudien wurden die in Abb. 4.11 dargestellten SasC-Fragmente an die T18- und die T25-Untereinheiten der Adenylatcyclase fusioniert.

Expression der T18-SasC- und T25-SasC-Fusionsproteine in *E. coli* XL-1 Blue

Um die Expression der T18- und T25-SasC-Fusionsproteine in *E. coli* XL-1 Blue zu überprüfen, wurden Zelllysate hergestellt und diese mittels Western Blot analysiert. Die Blots wurden mit einem polyklonalen anti-T25-Antiserum (Serum L24023; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. D. Ladant, Biochemistry of Macromolecular Interactions, Institut Pasteur, Paris), welches die T25-Untereinheit detektiert (genaues Epitop unbekannt; [219]). Die T18-Untereinheiten sollten mit einem anti-Cya A-Antikörper (3D1) inkubiert, welcher gegen die Aminosäuren 1-400 (Angaben des Herstellers) der Adenylatcyclase von *B. pertussis* gerichtet ist und damit beide Untereinheiten detektieren würde. Robichon *et al.* detektierten mit diesem Antikörper spezifisch die T18-Untereinheit [219].

Der anti-Cya A-Antikörper zeigte in keiner eingesetzten Verdünnung oder unter verschiedenen Bedingungen, wie Pufferzusammensetzung oder Inkubationszeit, eine Reaktion mit den T18-SasC-Fusionsproteinen. Das anti-T25 Antiserum detektierte nicht nur T25-SasC-Fusionsproteine, sondern auch die T18-SasC-Fusionsproteine.

Aus Abb. 4.17 ist zu erkennen, dass eine Expression der konstruierten T18- bzw. T25-SasC-Fusionsproteine in *E. coli* XL-1 Blue stattfindet. Das anti-T25-Antiserum von Dr. Daniel Ladant (Paris) detektiert ebenfalls die T18-SasC-Fusionsproteine. Die T18-Untereinheit (T18-*zip* aus (pUT18C-*zip*) und

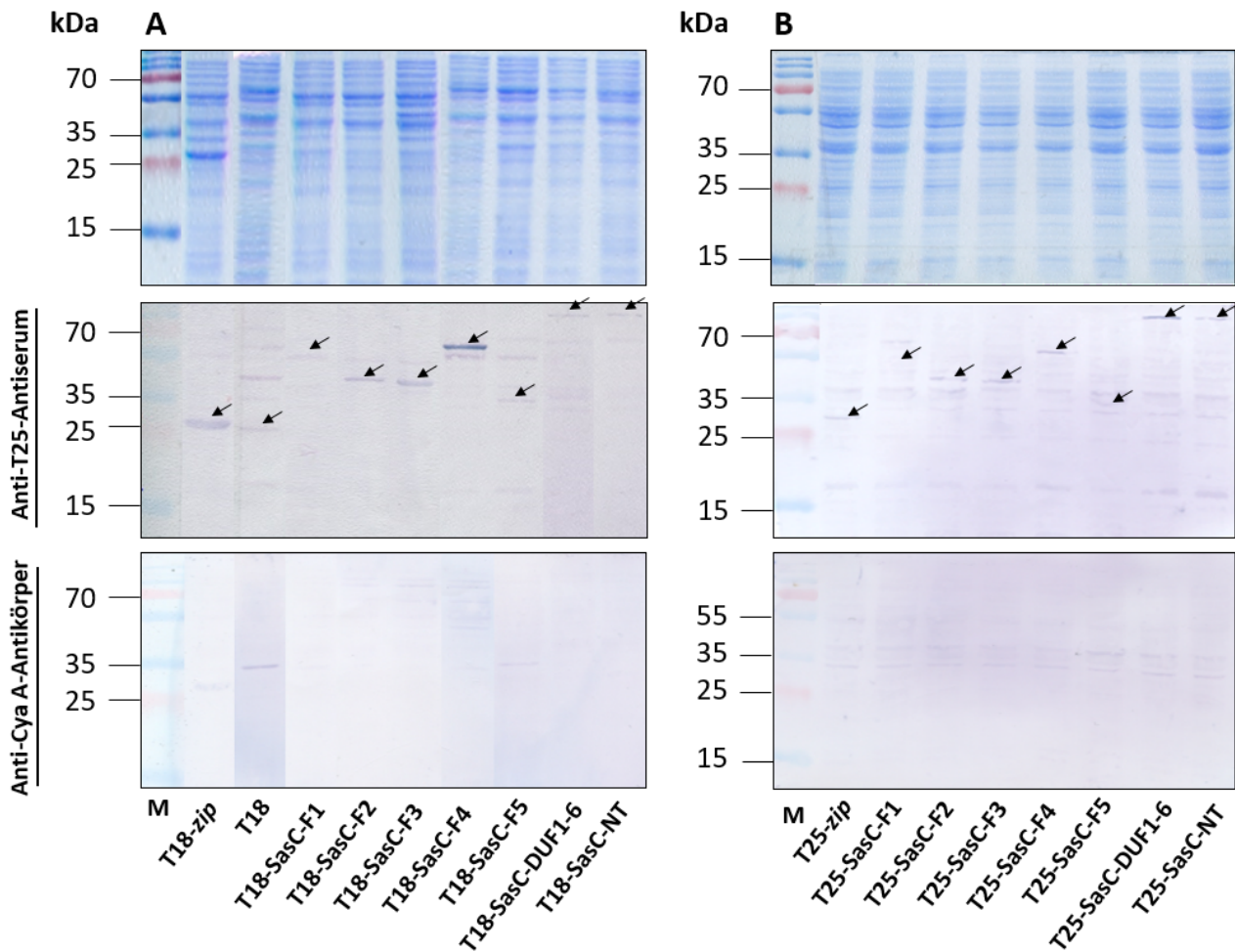


Abb. 4.17: Expression der T18- und T25-SasC-Fusionsproteine in *E. coli* XL-1 Blue. **A** Zelllysate T18-SasC-Transformanten. **B** Zelllysate T25-SasC-Transformanten. Western Blots wurden mit anti-T25-Antiserum oder Anti-Cya A-Antikörper inkubiert. Exprimierte Fusionsproteine sind mit Pfeilen markiert.

Tabelle 4.6: Größen der T18- und T25-SasC-Fusionsproteine

SasC-Fragment	T18-Fusionsprotein [kDa]	T25-Fusionsprotein [kDa]
+ (His-)NT	88,2	89,8
+ (His-)F1	45,5	47,08
+ (His-)F2	37,27	39,17
+ (His-)F3	37,43	39,18
+ (His-)F4	53,6	55,19
+ (His-)F5	29,3	30,89
+ (His-)DUF1-6	80,76	82,35

T18 aus dem Leervektor (pUT18C)) hat ein theoretisches Molekulargewicht von 21,8 kDa, für T18-SasC-F1 beträgt das MW 45,5 kDa, für T18-SasC-F2 32,27 kDa; für T18-SasC-F3 37,43 kDa; für T18-SasC-F4 53,6 kDa; für T18-SasC-F5 29,3 kDa; für T18-SasC-DUF1-6 80,76 kDa und für T18-SasC-NT 88,2 kDa. Für die T25-Untereinheit (T25-*zip* aus (pKT25-*zip*)) beträgt das MW 23,39 kDa, für T25-SasC-F1 47,08 kDa, für T25-SasC-F2 39,17 kDa, für T25-SasC-F3 39,18 kDa, für T25-SasC-F4 55,19 kDa, für T25-SasC-F5 30,89 kDa, für T25-SasC-DUF1-6 82,35 kDa und für T25-SasC-NT 89,8 kDa (siehe auch Tabelle 4.4). Neben den Banden der Fusionsproteine sind verschiedene weitere Banden auf dem Blot zu erkennen. Bei allen drei Antiseren ist eine intensive Doppelbande bei 35 kDa zu erkennen. Nach Inkubation mit anti-SasC-DUF12542-Antiserum ist teilweise ein auffälliger Intensitätsunterschied zwischen nicht induziertem und induziertem Zellysate bei dieser Bande zu erkennen.

Das anti-T25-Antiserum reagiert zudem stark mit einem Protein von ca. 40 kDa, welches nicht von den beiden anderen Antiseren detektiert wird.

Es konnte bestätigt werden, dass alle SasC-Fusionsproteine, sowohl mit der T18- als auch der T25-Untereinheit, in *E. coli* XL-1 Blue exprimiert werden. Die Plasmide, welche das Fusionsprotein exprimieren, wurden isoliert und anschließend für die Co-Transformation in die *E. coli*-Reporterstämme DHM1 und BTH101 eingesetzt.

Co-Transformation von *E. coli* DHM1 und BTH101 mit T18-SasC- und T25-SasC-Fusionskonstrukten führt zu keiner Interaktion der SasC-Fragmente

Es wurden (pUT18C-SasC-NT) und (pKT25-SasC-NT), (pUT18C-SasC-DUF1-6) und (pKT25-DUF1-6) oder (pUT18C-SasC-F1) und (pKT25-SasC-F1) in elektro-kompetente *E. coli* DHM1 und chemisch-kompetente *E. coli* BTH101 eingebracht. Beide Stämme wurden ebenfalls mit den Leervektoren (pUT18C) und (pKT25) co-transformiert, welche als Negativkontrolle dienen. Die Untereinheiten T18 und T25 sind alleine nicht in der Lage miteinander zu interagieren. Als Positivkontrolle wurden die T18-*zip* und T25-*zip*-Plasmide co-transformiert. Das enthaltene Leucin-*zipper*-Motiv führt zu einer Interaktion der beiden Untereinheiten und zur Rekonstitution der Aktivität der Adenylatcyclase. Die Transformationsansätze wurden auf LB/X-Gal- oder auf MacConkey/Maltose-Selektivmedien ausplattiert.

4.2 Interaktionsstudien zur Identifizierung der funktionsvermittelnden SasC-Domänen

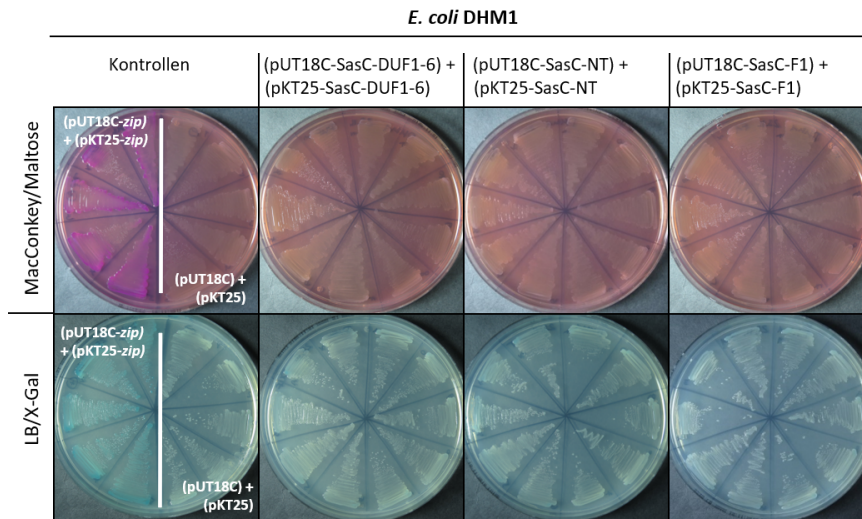


Abb. 4.18: **Co-Transformation von *E. coli* DHM1 mit (pUT18C-SasC)- und (pKT25-SasC)-Konstrukten.** Der Reporterstamm DHM1 wurde mit (pUT18C-SasC-NT) und (pKT25-SasC-NT), (pUT18C-SasC-DUF1-6) und (pKT25-DUF1-6) oder (pUT18C-SasC-F1) und (pKT25-SasC-F1) co-transformiert. Als Kontrolle dient eine Co-Transformation mit (pUT18C-*zip*) und (pKT25-*zip*) oder mit den Leervektoren (pUT18C) und (pKT25). In der oberen Reihe sind die Co-Transformanten auf MacConkey/Maltose-, in der unteren Reihe auf LB/X-Gal-Agar überimpft worden.

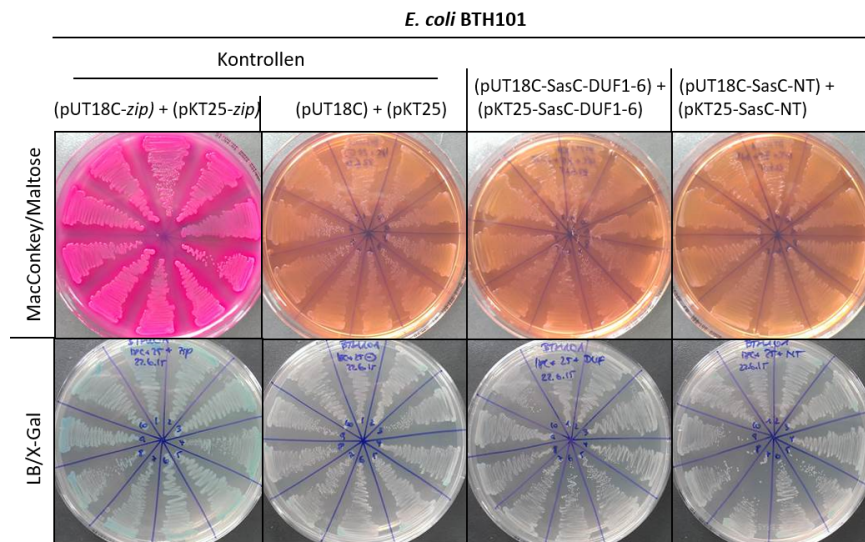


Abb. 4.19: **Co-Transformation von *E. coli* BTH101 mit (pUT18C-SasC)- und (pKT25-SasC)-Konstrukten.** Der *E. coli*-Reporterstamm BTH101 wurde mit (pUT18C-SasC-NT) und (pKT25-SasC-NT) oder mit (pUT18C-SasC-DUF1-6) und (pKT25-DUF1-6) co-transformiert. Als Kontrolle dient eine Co-Transformation mit (pUT18C-*zip*) und (pKT25-*zip*) oder mit den Leervektoren (pUT18C) und (pKT25). In der oberen Reihe sind die Co-Transformanten auf MacConkey/Maltose, in der unteren Reihe auf LB/X-Gal überimpft worden.

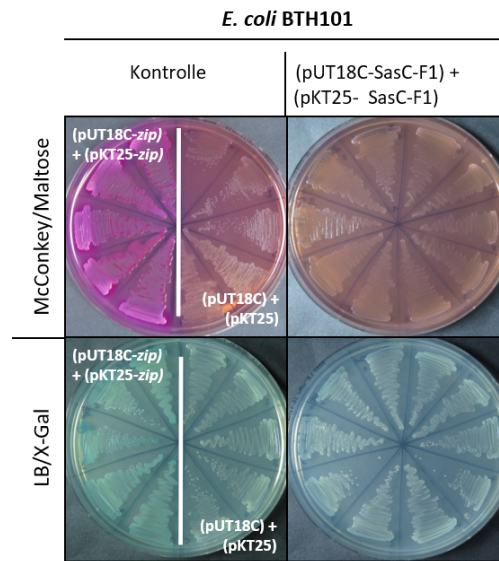


Abb. 4.20: **Co-Transformation von *E. coli* BTH101 mit (pUT18C-SasC-F1) und (pKT25-SasC-F1)**. Der *E. coli*-Reporterstamm BTH101 wurde mit (pUT18C-SasC-F1) und (pKT25-SasC-F1) co-transformiert. Als Kontrolle dient eine Co-Transformation mit (pUT18C-*zip*) und (pKT25-*zip*) oder mit den Leervektoren (pUT18C) und (pKT25). Co-Transformanten wurden auf MacConkey/Maltose- oder auf LB/X-Gal-Agarplatten überimpft.

Wie in den Abb. 4.18 und 4.19 zu erkennen, zeigen mit den *zip*-Plasmiden co-transformierten DHM1 und BTH101 eine starke Pinkfärbung auf MacConkey/Maltose- bzw. eine Blaufärbung der Kolonien auf LB/X-Gal-Agar. Dies lässt auf eine Interaktion der T18 mit der T25-Untereinheit schließen. Dadurch wurde die Enzymaktivität der Adenylatcyclase wiederhergestellt und die Reportergene des *lac*- bzw. *mal*-Operons exprimiert. Wurden die Leervektoren (pUT18C) und (pKT25) in DHM1 eingebracht, so konnte keine Interaktion detektiert werden. Die Kolonien waren weißlich/farblos. Für die Fusionskonstrukte mit SasC-NT und SasC-F1 konnte mit diesem System in dem hier verwendeten Reporterstamm und unter verschiedenen Bedingungen keine phänotypische Veränderung, bedingt durch die Interaktion der SasC-Fragmente, beobachtet werden. Die Transformanten weisen dieselbe Färbung auf wie die Negativkontrolle mit den Leervektoren. Von den SasC-DUF1-6-Fusionsproteinen wurde nach Schröder *et al.* keine Interaktion erwartet [128], doch haben u.A. *crosslinking*-Experimente mit BS³ im Rahmen dieser Arbeit auf eine mögliche Beteiligung der DUF1542-Domänen an der SasC-vermittelten Aggregation hingewiesen.

Um die Möglichkeit zu überprüfen, dass die SasC-Interaktionen ionenabhängig sind, wurden Co-Transformanten ebenfalls auf LB/X-Gal oder MacConkey/Maltose, versetzt mit 0,3 mM ZnCl₂, ausplattiert. Bei allen Ansätzen mit SasC-Fusionskonstrukten zeigte sich eine leicht rötliche Färbung in der Mitte der einzelnen Kolonien. Durch Verlängerung der Inkubationszeit auf z. T. mehr als 48 h bei 30 °C verstärkte sich diese Färbung (Daten hier nicht gezeigt). Da aber die Co-Transformanten mit beiden

Leervektoren ebenfalls diesen Effekt zeigten, scheint dies kein Hinweis auf eine Interaktion der SasC-Fragmente zu sein.

Zur Überprüfung ob eine Expression der einzelnen Fusionsproteine in den Reporterstämmen erfolgt, wurde *E. coli* BTH101 mit den verschiedenen T18- bzw. T25-SasC-Konstrukten transformiert. In Abb. 4.21 sind die Western Blots verschiedener Zellysate (jeweils 2 Klone der Transformation), inkubiert mit anti-T25-Antiserum, anti-SasC-NT-Antiserum oder anti-SasC-DUF1542-Antiserum, abgebildet. Obwohl *in vivo* bei Co-Transformation mit (pUT18C-*zip*) und (pKT25-*zip*) eine Protein-Interaktion (blaue bzw. pinke Koloniefarbe auf LB/X-Gal-Agar bzw. MacConkey/Maltose) beobachtet wurde, wurden weder die T18-*zip* noch die T25-*zip* Proteine im Zellysate durch das anti-T25-Antiserum detektiert. T18- und T25-SasC-NT- (88,2 kDa bzw. 89,8 kDa) und T18- und T25-SasC-DUF1-6-Fusionsproteine (80,76 kDa bzw. 82,35 kDa) konnten mit dem anti-T25-Antiserum nachgewiesen werden. Die zusätzlichen Banden sind in den induzierten Zellysaten auf den Blots in Abb. 4.21 mit Pfeilen markiert. Dieses Ergebnis wurde teilweise durch die Reaktion des anti-SasC-DUF1542-Antiserums mit den T18- bzw. T25-SasC-DUF1-6-Fusionsproteinen bestätigt. Mit dem anti-SasC-NT-Antiserum konnten die T18- und T25-SasC-NT-Fusionsproteine in *E. coli* BTH101 nicht detektiert werden. Da die T18- und T25-SasC-NT-Fusionsproteine hier jedoch mit dem anti-T25-Antiserum detektiert werden konnten, kann von einer Expression in *E. coli* BTH101 ausgegangen werden.

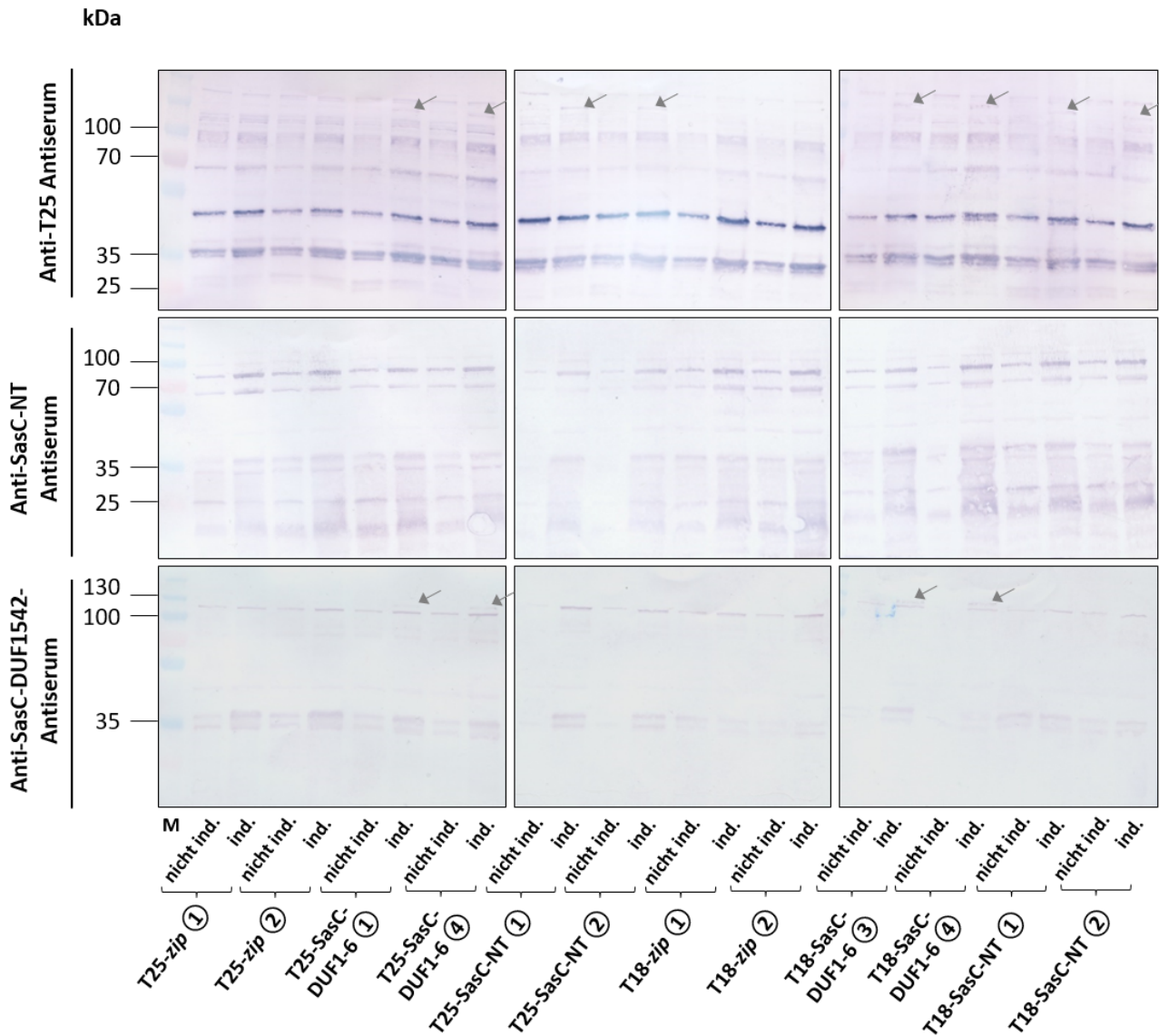


Abb. 4.21: Expressionstest von T18- und T25-SasC-Fusionsproteinen in *E. coli* BTH101. Mit anti-T25-Antiserum konnte die Expression von T25-SasC-NT und T25-SasC-DUF, sowie T18-SasC-NT und T18-SasC-DUF nachgewiesen werden. Das anti-SasC-DUF-Antiserum konnte die DUF-Fusionsproteine ebenfalls detektieren.

Zugabe von bivalenten Kationen beeinflusst konzentrationsabhängig das Wachstum von *E. coli* DHM1

Da Protein-Protein-Interaktionen ionenabhängig sein können, wurden bei der Durchführung des BACTH Ionen zu den Selektivmedien zugegeben. Es wurde ein Mikrodilutionstest mit verschiedenen bivalenten Kationen (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+}) durchgeführt, um einen interaktionsunabhängigen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* DHM1, welcher für das BACTH als Reporterstamm dienen soll, auszuschließen und die optimale Konzentration für die Selektivmedien zu ermitteln.

Anhand der Abb. 4.22 wird deutlich, dass verschiedene Ionen konzentrationsabhängig auf das Wachstum von DHM1-Zellen wirken. Bis zu einer Konzentration von 0,45 mM beeinflussen Zinkionen das bakterielle Wachstum nicht. Um in den einen möglichst breiten Gradienten an Ionenkonzentration in den Selektivmedien abzudecken (Abb. 4.23), wurde mit einer Maximalkonzentration von 0,7 mM Zink gearbeitet. Ab dieser Konzentration war fast kein Wachstum mehr nachweisbar. Kalzium und Magnesium führen auch bei der höchsten getesteten Konzentration von 40 mM zu keiner Beeinträchtigung des Zellwachstums. Diese Ionen wurden später bis zu einer Konzentration von 40 mM verwendet. Mangan- und Nickelionen wirken schwächer als Zink auf das *E. coli*-Wachstum. Erst ab einer Konzentration von 1,25 mM zeigen diese Übergangsmetalle einen beginnenden zytotoxischen Effekt. Bei Zugabe von Mangan konnte ab einer Konzentration von 10 mM kein bakterielles Wachstum mehr nachgewiesen werden, bei Nickel lag diese Konzentration bei 2,5 mM. Ab 10 mM Nickel konnte eine leichte Zunahme des bakteriellen Wachstums beobachtet werden. Für weitere Versuche wurde Mangan bis zu einer maximalen Konzentration von 5 mM und Nickel bis 2,5 mM eingesetzt. Die Höchstkonzentrationen der Ionen in Gradientenagarplatten entsprechen den Konzentrationen, bei welchen im Mikrodilutionstest fast kein bakterielles Wachstum mehr stattfand.

Zugabe verschiedener Kationen zeigt keinen Effekt auf das Interaktionsverhalten der *E. coli* DHM1 Co-Transformanten Da eine Ionenabhängigkeit der SasC-Interaktionen möglich ist, wurden Gradientenagarplatten mit Ionen versetzt und Co-Transformanten darauf ausgestrichen (Abb. 4.23). Das Wachstumsverhalten wurde dadurch nicht beeinflusst. Verschiedene Konzentrationen von biologisch relevanten bivalenten Kationen hatten keinen Effekt auf das Interaktionsverhalten der T18- und T25-NT-Fusionsproteine in den DHM1-Zellen zeigen.

Von Co-Transformantenplatten (Abb. 4.18) wurden einige Klone auf die Gradientenplatten überimpft. Dem Verlauf des Ionen-Konzentrationsgradienten folgend, wurden das bakterielle Material als durchgehende Linie aufgetragen. Der Klon der Positivkontrolle zeigt auf jeder Platte die charakteristische rote bzw. blaue Färbung. Die Interaktion der Leucin-*zipper*-Motive von (pUT18C-*zip*) und (pKT25-*zip*) wird nicht durch die Zugabe von Ionen beeinflusst. Auf LB/X-Gal erscheinen alle SasC-SasC-NT-Co-Transformanten ebenso farblos wie die Negativkontrolle. Auf MacConkey/Maltose dagegen weisen die Kolonien eine rötliche Färbung auf, da dies jedoch auch auf die Negativkontrolle zutrifft, ist dies kein Indiz auf eine ionenabhängige Interaktion. Bei den Kolonien der Negativkontrolle und der SasC-SasC-NT-

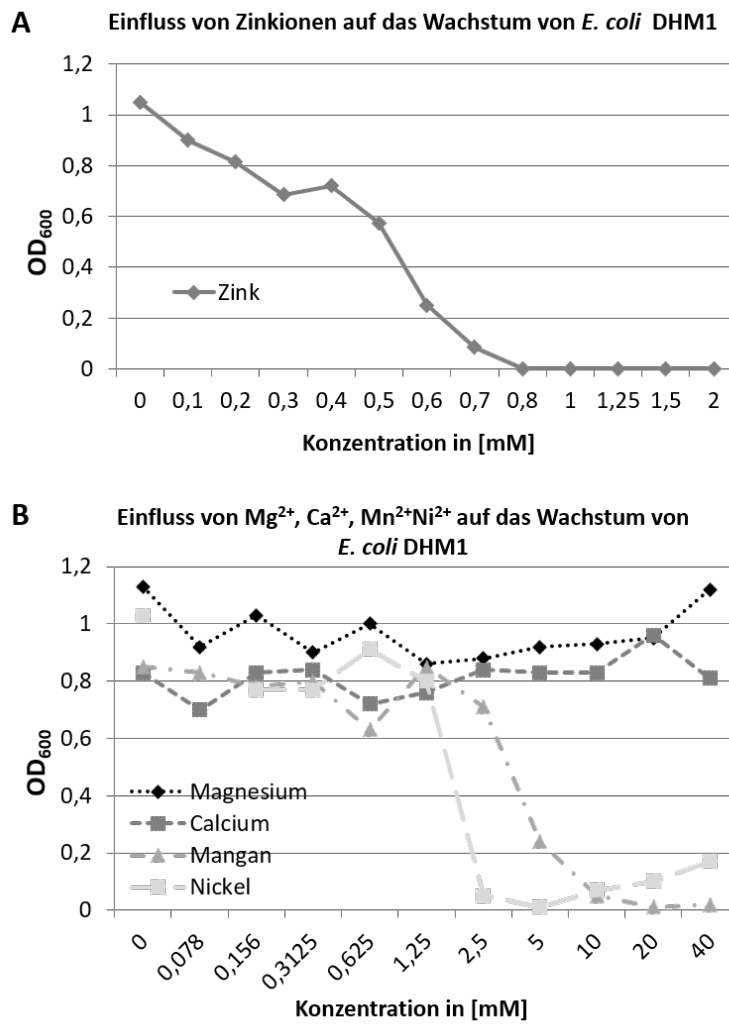


Abb. 4.22: Einfluss von bivalenten Kationen auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* DHM1. **A Zugabe von Zink.** Zink wirkt bereits bei geringen Konzentrationen zytotoxisch auf die DHM1-Zellen. **B Zugabe von Magnesium, Kalzium, Mangan oder Nickel.** Magnesium und Kalzium zeigen auch bei hohen Konzentrationen keinen Effekt, wohingegen Mangan und Nickel ab 5 mM bzw. 2,5 mM starke zytotoxische Wirkung zeigen.

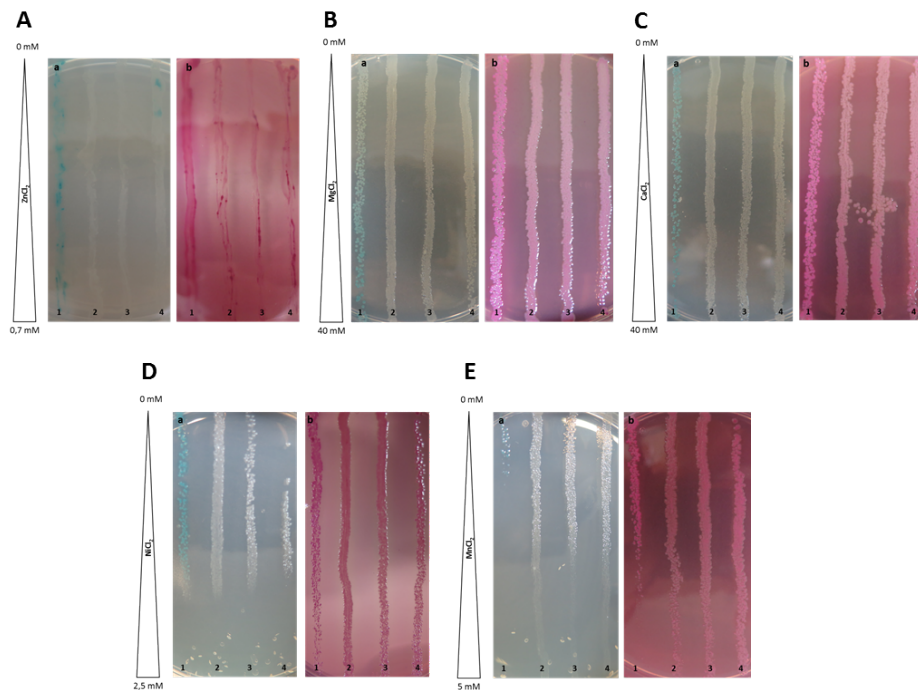


Abb. 4.23: Einfluss von bivalenten Kationen auf die Interaktion von T18- und T25-SasC-Fusionsproteinen in *E. coli* DHM1. A ZnCl₂-Gradient; B NiCl₂-Gradient; C MnCl₂-Gradient; D CaCl₂-Gradient; E MgCl₂-Gradient. Linkes Panel: Co-Transformanten auf LB/X-Gal; rechtes Panel: Co-Transformanten auf MacConkey/Maltose. (1) Co-Transformanten mit (pUT18C-*zip*) und (pKT25-*zip*), (2)+(3) Co-Transformanten mit (pUT18C-SasC-NT) und (pKT25-SasC-NT), (4) Co-Transformanten mit (pUT18C) und (pKT25).

Co-Transformanten auf LB/X-Gal konnte keinerlei, in diesem Fall bläuliche, Färbung beobachtet werden. Offensichtlich ist hier der zytotoxische Effekt höherer Konzentrationen von Mangan und Nickel, was die Ergebnisse des Mikrodilutionstests widerspiegelt, wobei der Effekt auf LB/X-Gal-Platten ausgeprägter ist als auf MacConkey-Platten. Geringe Konzentrationsungleichheiten können nicht ausgeschlossen werden, da die Platten manuell gegossen wurden.

Aktivität der β -Galaktosidase in *E. coli* DHM1-Co-Transformanten Um die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche zu überprüfen, wurde ein β -Galaktosidase-Assay durchgeführt. Der Graph in Abb. 4.24 zeigt, dass nur eine Co-Transformation mit (pUT18C-*zip*) und (pKT25-*zip*) zu einer Rekonstitution der β -Gal-Aktivität führt und damit die Umsetzung von IPTG (LB/X-Gal) bzw. Maltose (MacConkey) ermöglicht. Erwartungsgemäß zeigt die Co-Transformante mit den Leervektoren keine Enzymaktivität. Auch für die SasC-NT-Fusionskonstrukte konnte keine Aktivität gemessen werden.

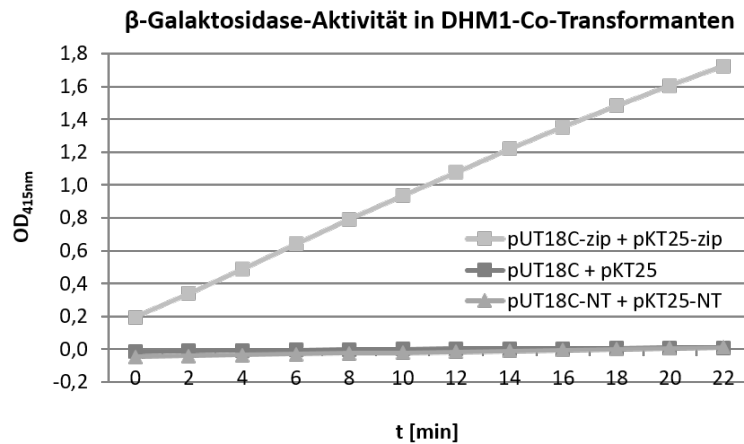


Abb. 4.24: **Aktivität der β-Galaktosidase in DHM1-Co-Transformanten.** Nur mit (pUT18C-*zip*) und (pKT25-*zip*) co-transformierte DHM1-Zellen zeigen eine Rekonstitution der Enzymaktivität. Mit den Leervektoren oder den SasC-NT-Fusionskonstrukten co-transformierte DHM1 weisen keinerlei β-Gal-Aktivität auf.

Expression der T18-SasC- und T25-SasC-Fusionsproteine nach Co-Transformation in *E. coli* DHM1 Weil das BACTH-System auf Selektivmedien unter verschiedenen Bedingungen (Inkubationszeit, Temperatur, Zugabe von Ionen) keine Hinweise auf eine Interaktion der SasC-Fragmente lieferte, wurde die Expression der Fusionsproteine T18-SasC-DUF1-6 und T25-SasC-DUF1-6 bzw. T18-SasC-NT und T25-SasC-NT im Reporterstamm DHM1 überprüft. Mittels Western Blot konnten in den Zellysaten der DHM1-Co-Transformanten keine SasC-Fusionsproteine detektiert werden (Abb. 4.25).

Auf dem Blot in Abb. 4.25 ist eine zusätzliche Proteinbande im induzierten Zellysat der (pUT18C-*zip*)/(pKT25-*zip*)-Co-Transformante zu erkennen. Die Positivkontrolle zeigte bereits phänotypisch auf den Selektivmedien die Rekonstitution der β-Gal-Aktivität. Die T18-Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 21,8 kDa, die T25-Untereinheit eine Größe von 23,39 kDa. Die vom anti-T25-Antiserum detektierte Proteinbande läuft etwas höher als 28 kDa. Ein Heterodimer aus T18 und T25 würde ein Molekulargewicht von 45,2 kDa besitzen. Weitere T18- oder T25-Fusionsproteine wurden nicht detektiert. Auch die Inkubation mit anti-SasC-NT-Antiserum detektierte kein SASC-NT-Fusionsprotein (Daten hier nicht gezeigt).

Die Expressionstests der Co-Transformanten zeigen, dass eine mögliche *in vivo*-Interaktion der Fusionsproteine nicht nachgewiesen werden konnte, weil keine Co-Expression in den Reporterstämmen DHM1 und BTH101 stattfindet.

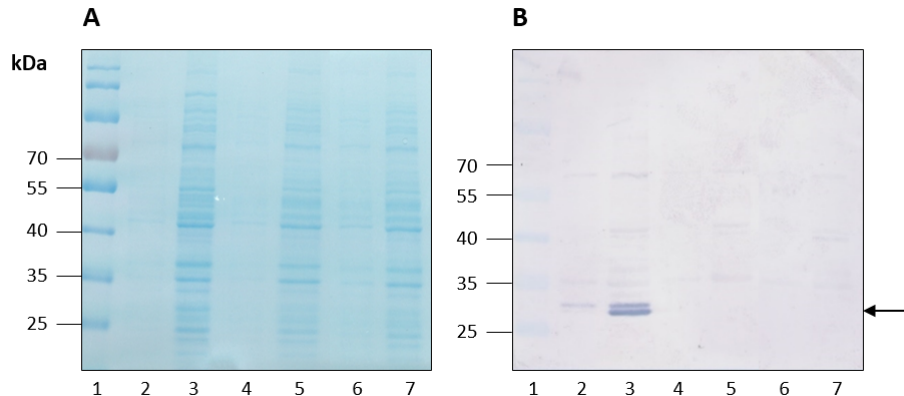


Abb. 4.25: **Co-Expressionstest von T18- und T25-SasC-Fusionsproteinen in *E. coli* DHM1.** **A SDS-PAGE. B Western Blot.** Western Blots der Zelllysate wurden mit anti-T25-Antiserum inkubiert. Im induzierten Zelllysate der (pUT18C-*zip*)/(pKT25-*zip*)-Co-Transformante (3) ist eine intensive Bande im Bereich von 30 kDa zu erkennen. (1) Marker; (2) nicht induziertes (n.ind.) Zelllysate (pUT18C-*zip*)/(pKT25-*zip*); (3) induziertes (ind.) Zelllysate (pUT18C-*zip*)/(pKT25-*zip*); (4) n.ind. Zelllysate (pUT18C-SasC-DUF1-6)/(pKT25-SasC-DUF1-6); (5) ind. Zelllysate (pUT18C-SasC-DUF1-6)/(pKT25-SasC-DUF1-6); (6) n.ind. Zelllysate (pUT18C-SasC-NT)/(pKT25-SasC-NT); (7) ind. Zelllysate (pUT18C-SasC-NT)/(pKT25-SasC-NT).

4.3 Multimere von SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 in rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen SasC-His-Proteine als Monomere, Dimere, Oligomere oder Multimere vorliegen, wurden Proben der gereinigten Proteine an das Institut für Physiologie II zu Prof. Dr. Victor Shahin gebracht und dort mit einem Rasterkraftmikroskop analysiert. Die Versuchsdurchführung als auch die Auswertung wurde von Prof. Shahin und Dr. Ganzalo Rosso (beide Institut für Physiologie II) durchgeführt. Mittels Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*) können Einzelmoleküle sichtbar gemacht werden (*single molecule imaging*), um individuelle Proteinkomplexe zu untersuchen (Abb. 4.26 und 4.27). In den Abb. 4.28 bis 4.30 sind dreidimensionale (3D-) Projektionen der Höhendifferenzsaufnahmen verschiedener Proteinproben dargestellt. Diese Aufnahmen basieren auf Größenunterschieden der Partikel. Eine genaue Berechnung der Molekulargewichte der vermessen Partikel erfolgte nicht.

Die SasC-His-NT-Aufnahme in Abb. 4.26 zeigt eine breite Streuung der detektierten Partikelgrößen, was darauf schließen lässt, dass SasC-His-NT sowohl in oligomeren, als auch in multimeren Komplexen vorliegt. Auch für SasC-His-1 (Abb. 4.26) wurden verschiedene Partikelgrößen gemessen. Diese weisen eine geringere Variationsbreite der Partikelgrößen auf. Die Größen der am häufigsten detektierten Partikel sind höher als für ein SasC-His-1-Monomer zu erwarten gewesen wäre. Weiterhin konnten verschiedene Partikelgrößen detektiert werden, die mutmaßlich von Oligomeren stammen.

Ähnlich wie bei SasC-His-1 (Abb. 4.26) entspricht auch bei SasC-His-3 (Abb. 4.27) ein großer Anteil

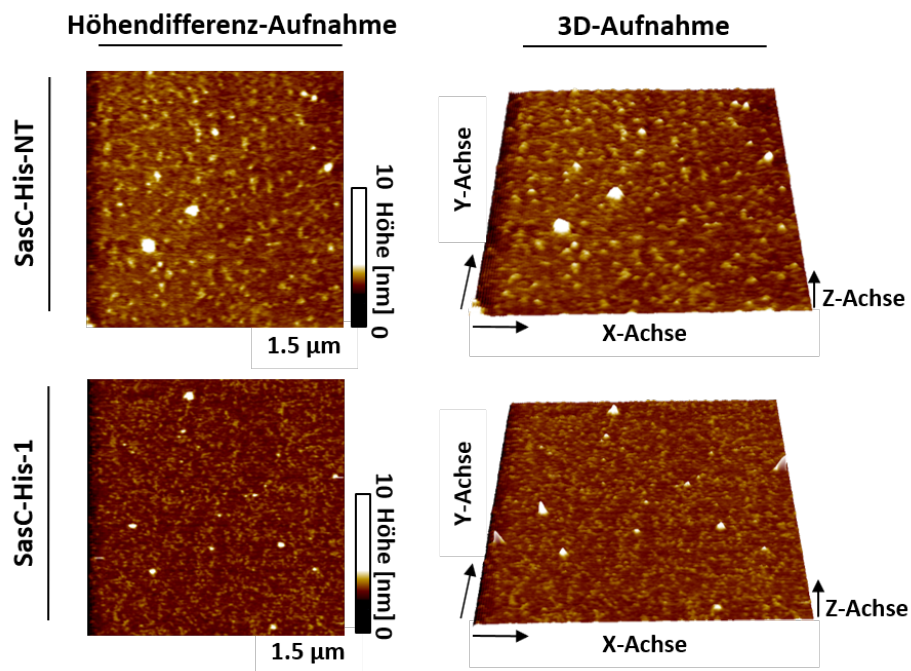


Abb. 4.26: **Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von SasC-His-NT und SasC-His-1.** Linkes Bild: Höhendifferenz-Aufnahme der auf dem Chip haftenden Proteine. Rechtes Bild: 3D-Projektion der Höhendifferenz-Aufnahme. Je heller die Färbung, desto größer das Probenmolekül. Für SasC-His-NT variiert die Partikelgröße sehr, was auf die Bildung von SasC-His-NT-Oligomeren weist. Für SasC-His-1 ist die Variationsbreite der Partikelgröße geringer, doch erscheinen die Partikel im angegebenen Maßstab zu groß um nur Monomere zu sein.

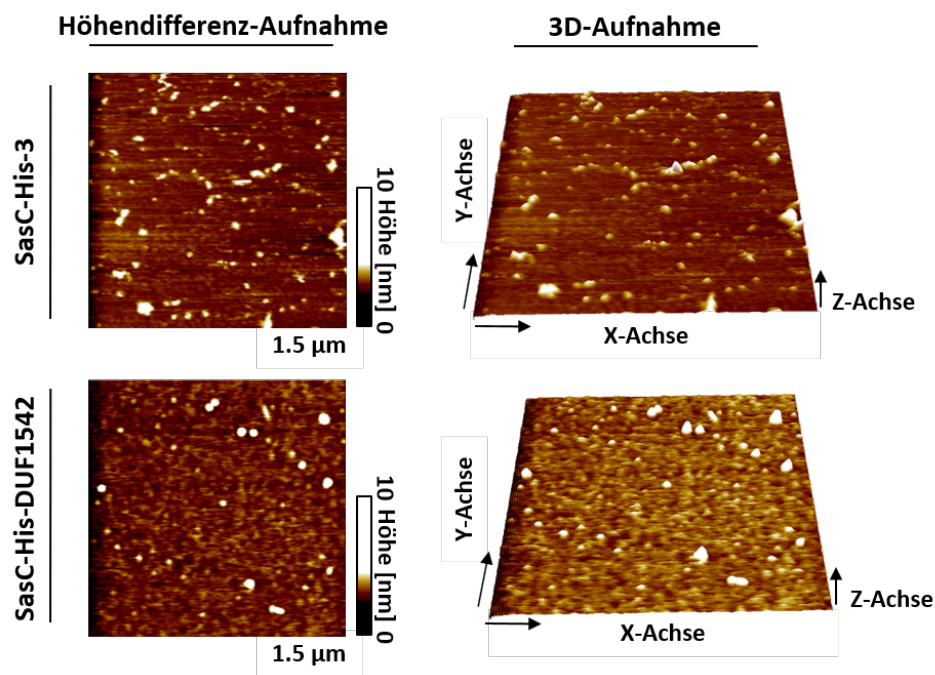


Abb. 4.27: **Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von SasC-His-3 und SasC-His-DUF1542.** Linkes Bild: Höhendifferenz-Aufnahme der auf dem Chip aufgebracht Proteine. Rechtes Bild: 3D-Projektion der Höhendifferenz-Aufnahme. Je heller die Färbung, desto größer das Probenmolekül. Für SasC-His-3 variiert die Partikelgröße. Der Vergleich mit dem angelegten Maßstab (1,5 µm) zeigt, dass die Partikel zu groß für SasC-His-3-Monomere sind. Die SasC-His-DUF1542-Proteine zeigen eine gleichmäßigere Größenverteilung, deren absolute Partikelgröße nicht einem Monomer entspricht.

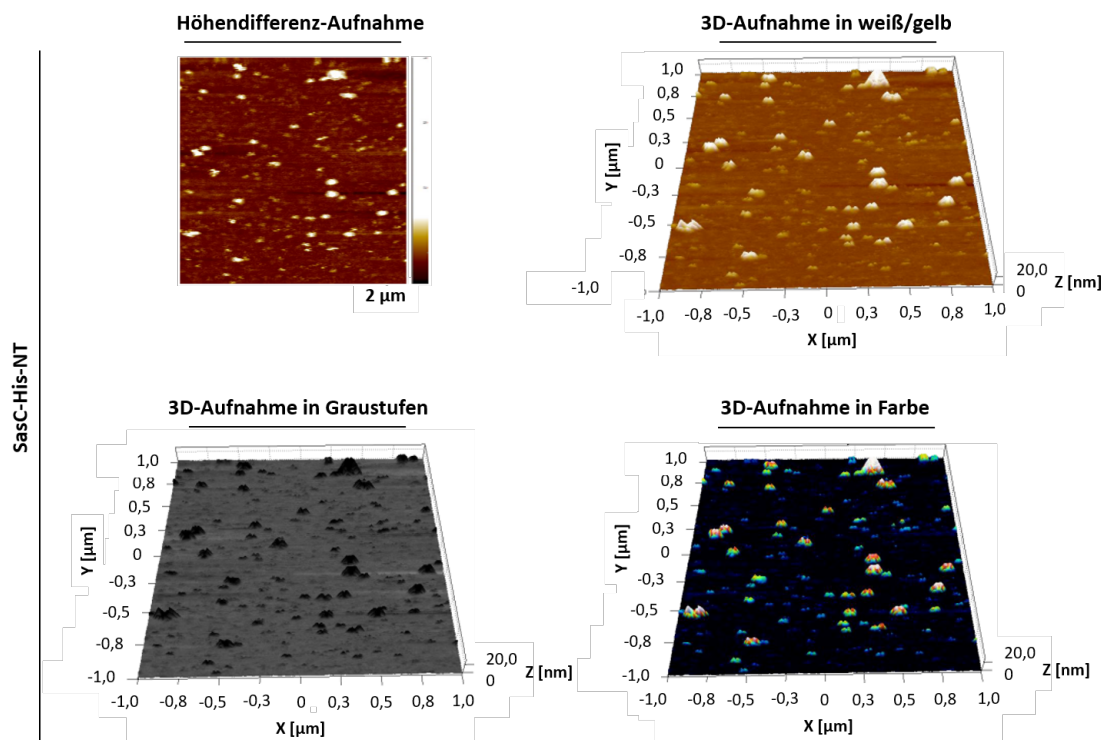


Abb. 4.28: **Rasterkraftmikroskopische Analyse von SasC-His-NT in verschiedenen 3D-Aufnahmen.** Die Höhendifferenz-Aufnahme wurde in eine 3D-Projektion konvertiert und mit verschiedenen Farbkodierungen unterlegt. In der weiß-gelben Aufnahme repräsentieren hellere Bereiche größere Partikel. Die Graustufen-Aufnahme zeigt die Partikel in schwarzer Färbung, während in der Farbskalierung blaue Partikel Monomere, andere Farben (grün, rot) Oligomere verschiedener Größe repräsentieren. SasC-His-NT-Partikel konnten als monomere und oligomere Strukturen detektiert werden. Die Partikelgröße ist nicht einheitlich, sondern variiert stark. Die größte Teil der Partikel liegt als Monomer vor.

der registrierten Partikel nicht einem SasC-His-3-Monomer. Weitere Partikel verschiedener Größen, welche Oligomere und Multimere darstellen, konnten ebenfalls beobachtet werden. Die SasC-His-DUF1542-Proteine in Abb. 4.27 zeigen eine homogenere Partikelgröße. Doch auch diese entspricht nicht einem SasC-His-DUF1542-Monomer. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die 3D-Projektionen von SasC-His-NT (Abb. 4.28), SasC-His-4 (Abb. 4.29) und SasC-His-DUF1542 (Abb. 4.30) mit einer Farbkodierung unterlegt. Je heller ein Bereich in der weiß/gelben Aufnahme (oberes rechtes Bild), desto größer ist das Partikel. In der grauen Farbkodierung (unteres linkes Bild) sind alle Partikel, gleich welcher Größe, schwarz abgebildet und in der bunten Farbprojektion (unteres rechtes Bild) repräsentieren blaue Partikel Monomere, während andere Farben oligomere Proteinkomplexe darstellen. Dem Farbverlauf von blau zu grün zu gelb zu rot folgend, nimmt die Partikelgröße zu.

Abbildung 4.28 verdeutlicht was bereits in Abb. 4.26 zu erkennen ist; dass SasC-His-NT eine breite Variabilität der Partikelgrößen aufweist. In der bunten Farbkodierung wird dies durch die unterschiedliche Färbung der verschiedenen Partikelgrößen besonders deutlich. So sind Monomere und Oligomere

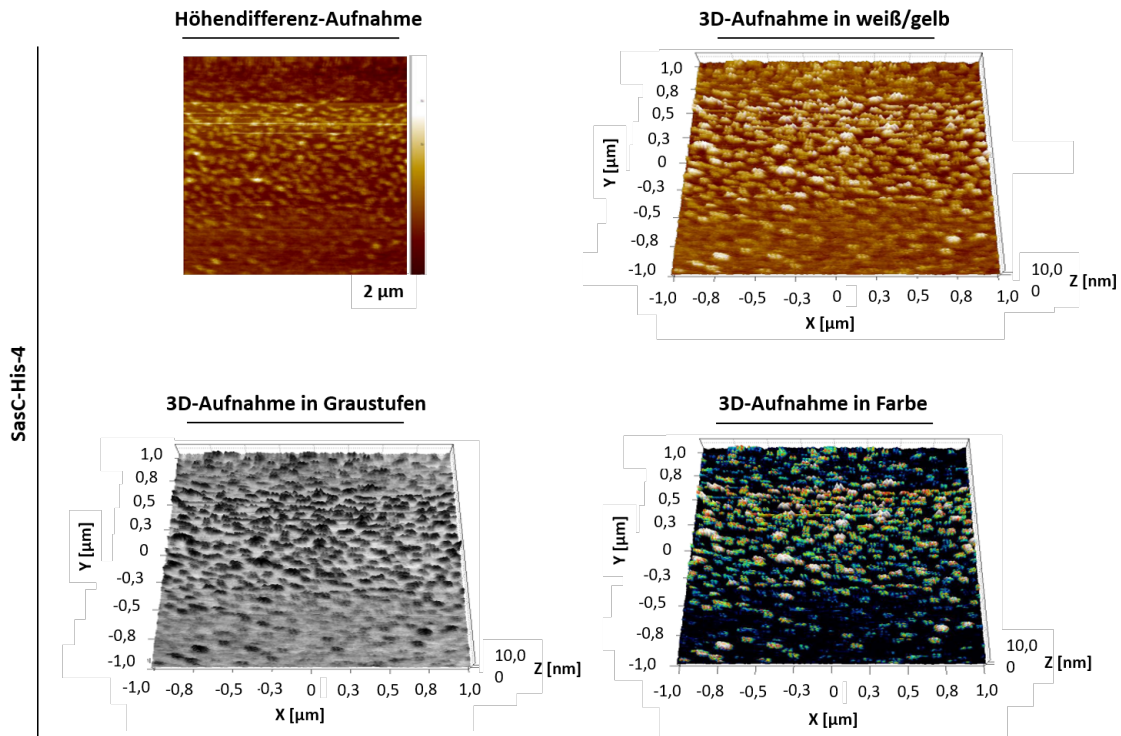


Abb. 4.29: **Rasterkraftmikroskopische Analyse von SasC-His-4 mit verschiedenen dreidimensionalen Projektionen.** Die Höhendifferenz-Aufnahme wurde in eine 3D-Projektion konvertiert und mit verschiedenen Farbkodierungen unterlegt. In der weiß-gelben Aufnahme repräsentieren hellere Bereiche größere Partikel. Die Graustufen-Aufnahme zeigt die Partikel in schwarzer Färbung, während in der Farbskalierung blaue Partikel Monomere, andere Farben (grün, rot) Oligomere verschiedener Größe repräsentieren. Die Partikelgröße ist nicht einheitlich, sondern variiert stark. Ein klarer Hinweis auf die Oligomerisierung von SasC-His-4.

verschiedener Komplexität erkennbar.

SasC-His-4 (Abb. 4.29) weist ebenfalls ein breites Spektrum an Partikelgrößen auf. Die Daten weisen auf Oligomerbildung hin. Die bunte Farbkodierung zeigt deutlich, dass ein Großteil der Partikel nicht als Monomer (blaue Partikel) vorliegt, sondern als größere Komplexe. In Abb. 4.30 sind die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen von SasC-His-DUF1542 dargestellt. Die SasC-His-DUF1542-Partikel liegen als Monomere (blau) und Oligomere vor. Die SasC-His-DUF1542-Oligomere zeigen eine geringe Größenvariabilität (gleicher Farbverlauf verschiedener Partikel).

Die getesteten Proteine haften unterschiedlich gut an der beschichteten Glasoberfläche. Obwohl gleiche Konzentrationen eingesetzt wurden, variiert die Dichte der Proteinpartikel zwischen den verschiedenen Proben. Grund dafür ist die unterschiedliche Oberflächenladung der Proteine. Die Haftung der Proteine ist unabhängig von ihrer Tendenz zur Multimerisierung. Die Ergebnisse der Rasterkraftmikroskopie indizieren, dass alle hier getesteten SasC-His-Proteine in der Lage sind Oligomere oder Multimere zu bilden, sich jedoch deutlich in ihrer Tendenz dazu unterscheiden.

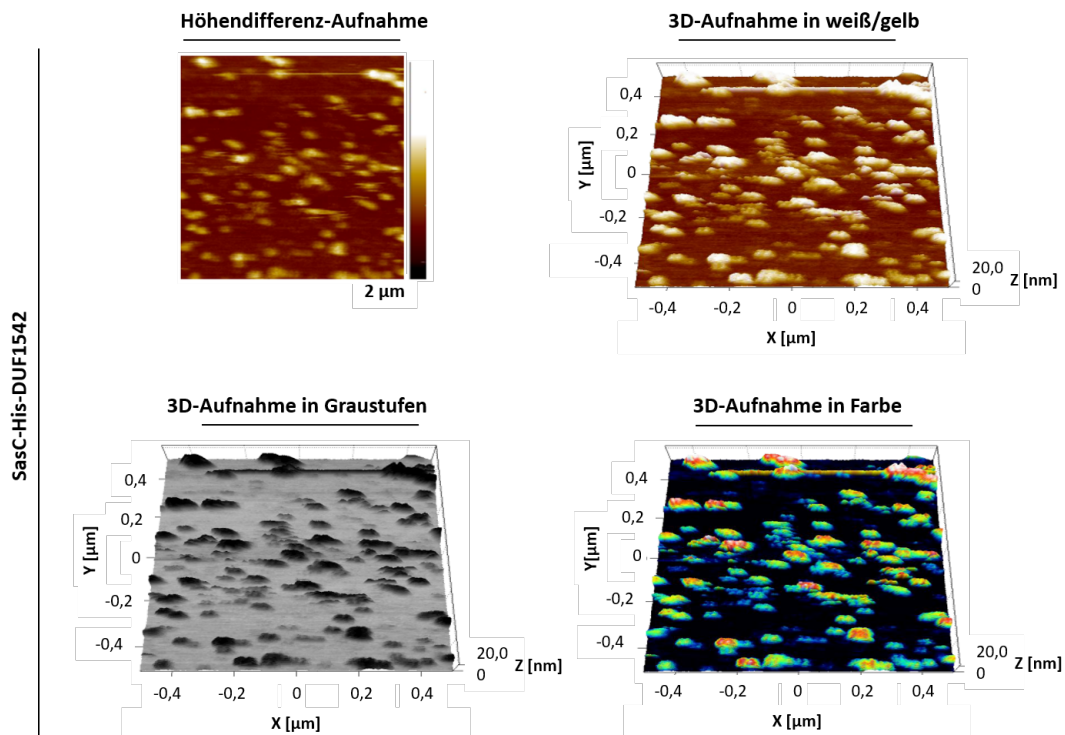


Abb. 4.30: Rasterkraftmikroskopische Analyse von SasC-His-DUF1542 mit verschiedenen 3D-Projektionen. Die 3D-Projektion der Höhendifferenz-Aufnahme wurde in eine drei-dimensionale Projektion konvertiert und mit verschiedenen Farbskalierungen unterlegt. In der weiß-gelben Aufnahme repräsentieren hellere Bereiche größere Partikel. Die Graustufen-Aufnahme zeigt die Partikel in schwarzer Färbung, während in der Farbskalierung blaue Partikel Monomere, andere Farben (grün, rot) Oligomere verschiedener Größe repräsentieren. SasC-His-DUF1542-Partikel liegen als Monomere und Oligomere mit geringer Größenvariabilität vor.

4.4 Interaktionsstudien mittels Surface Plasmon Resonance

4.4.1 Bestimmung der Molekulargewichte der SasC-His-Proteine mittels Größenausschlusschromatographie

Vor der BIAcore-Messung (durchgeführt bei Biaffin) wurde, ebenfalls von der Firma Biaffin, eine Größenausschlusschromatografie (*Size Exclusion Chromatography, SEC*) zur exakten Bestimmung der Molekulargewichte der SasC-His-Proteine durchgeführt, um festzustellen ob die SasC-His-Proteine nativ in einem monomeren oder oligomeren Zustand vorliegen. Abhängig von der Größe und dem Molekulargewicht eluieren die Proteine bei genau definierbaren Retentionszeiten (t_R). Das theoretische Molekulargewicht der Proteine wurde zuvor berechnet, woraus sich theoretische Retentionszeiten ableiten lassen. Makromolekulare Komplexe wie Oligomere haben geringere Retentionszeiten und eluieren vor einem Monomer. Die grafische Auswertung der Messungen wurde von der Firma Biaffin durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

In Abb. 4.31 sind die Diagramme der SEC für SasC-His-NT (A), SasC-His-1 (B), SasC-His-3 (C), SasC-His-4 (D) und SasC-His-DUF1542 (E) abgebildet. Die dazugehörigen Messdaten sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Im sog. Ausschlussvolumen (Totvolumen) eluieren Partikel, welche zu groß sind, um in die poröse stationäre Phase zu gelangen. Aggregate dieser Größenordnung finden sich nur in der SasC-His-NT-Probe (Abb. 4.31 (A)). Für SasC-His-NT wurden vier Messungen durchgeführt. Vor Messung 2 wurde die Probe für 2 h bei 4 °C gelagert, für Messung 3 einem Einfrier-/Auftau-Zyklus unterzogen und vor Messung 4 1 x eingefroren/aufgetaut und anschließend für 2 h bei 4 °C gelagert.

Bei den Messungen 2-4 eluierte Protein, neben dem Hauptpeak bei 1,24-1,25 min, zusätzlich bei einer Retentionszeit (t_R) von 0,9 min, was auf ein stark aggregiertes Protein hinweist, da dieser Peak oberhalb des Ausschlussvolumens liegt. Für das Protein, welches bei einer $t_R = 1,25$ min eluiert, wurde ein Molekulargewicht von 167,2 kDa in Messung 1 und ein Gewicht von 175,2 kDa in den Messungen 2, 3 und 4 bestimmt. Beide Peaks eluieren vor der theoretischen t_R von SasC-His-NT und entsprechen etwa der 2,5 x Größe des Monomers. Somit liegt SasC-His-NT in oligomerem Zustand vor. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch Lagerung SasC-His-NT in Lösung aggregiert und aus diesem Grund kein Monomer in der SEC detektiert werden konnte.

Bei allen weiteren Proben wurden zwei Messungen (Messung 2 nach Lagerung für 2 h bei 4 °C durchgeführt. SasC-His-1 (Abb. 4.31 B) zeigt zwei Peaks bei Retentionszeiten von 1,2 min und 1,37 min detektiert, wobei das Eluat bei $t_R = 1,37$ min nur in sehr geringer Ausbeute und Reinheit vorlag. Beide Peaks liegen vor der theoretisch erwarteten t_R . Es wurden Molekulargewichte von 211,7 kDa ($t_R = 1,2$ min) und 94,4 kDa ($t_R = 1,37$ min; Messung 1) bzw. 86,3 kDa ($t_R = 1,37$ min; Messung 2) berechnet. Es eluierte keine monomere Form von SasC-His-1. Die berechneten Komplexgrößen weisen auf SasC-His-1-Oligomere hin.

SasC-His-3 (Abb. 4.31 C) zeigte Peaks bei $t_R = 1,42$ min und $t_R = 1,62$ min. Das Eluat bei 1,62 min

Tabelle 4.7: **Messwerte der Größenausschlusschromatographie.** Aus den gemessenen Retentionszeiten konnten die Molekulargewichte der SasC-His-Proteine bestimmt werden. Für alle hier gemessenen Proteine konnten Oligomerformen detektiert werden. Nur bei SasC-His-3 repräsentiert der Hauptpeak ein Monomer.

Protein	Konzentration [mg/ml]	Aufgabemenge [µg]	Messung	Retentionszeit t_R [min]	mAU*ml	Reinheit [%]	[kDa _{berechnet}]	[kDa _{theoretisch}]				
SasC-His-NT	0,714	7,1	1	1,25	0,0668	90,4	167,2	68,14				
				0,92	0,088	8,9	im Ausschlussvolumen					
			2	1,24	0,0852	86,5	175,2					
				3	0,9	0,0384	29,8		im Ausschlussvolumen			
			1,24		0,0886	68,8	175,2					
			4	0,9	0,0787	41	im Ausschlussvolumen					
				1,24	0,1081	56,4	175,2					
			SasC-His-1	0,14	2,8	1	1,2		0,4048	89,9	211,7	20
1,37	0,0184	4					94,8					
2	1,2	0,4015				89,6	211,7					
	1,37	0,022				5	86,3					
SasC-His-3	0,302	6,0				1	1,42	0,0665	8,3	74,9	27,09	
							1,62	0,7217	91,2	29,1		
			2	1,42	0,0566	7,2	74,9					
				1,62	0,721	91,7	29,1					
SasC-His-4	0,149	3,0	1	1,38	0,0462	35,1	90,4	23,82				
				1,53	0,0641	48,7	44,5					
			2	1,38	0,0398	33,4	90,4					
				1,53	0,0583	48,9	44,5					
SasC-His-DUF1542	0,25	5,0	1	1,12	0,0359	32,2	308,9	68,15				
				1,57	0,0384	34,4	36,9					
			2	1,12	0,0345	26,3	308,9					
				1,55	0,0388	29,6	40,5					

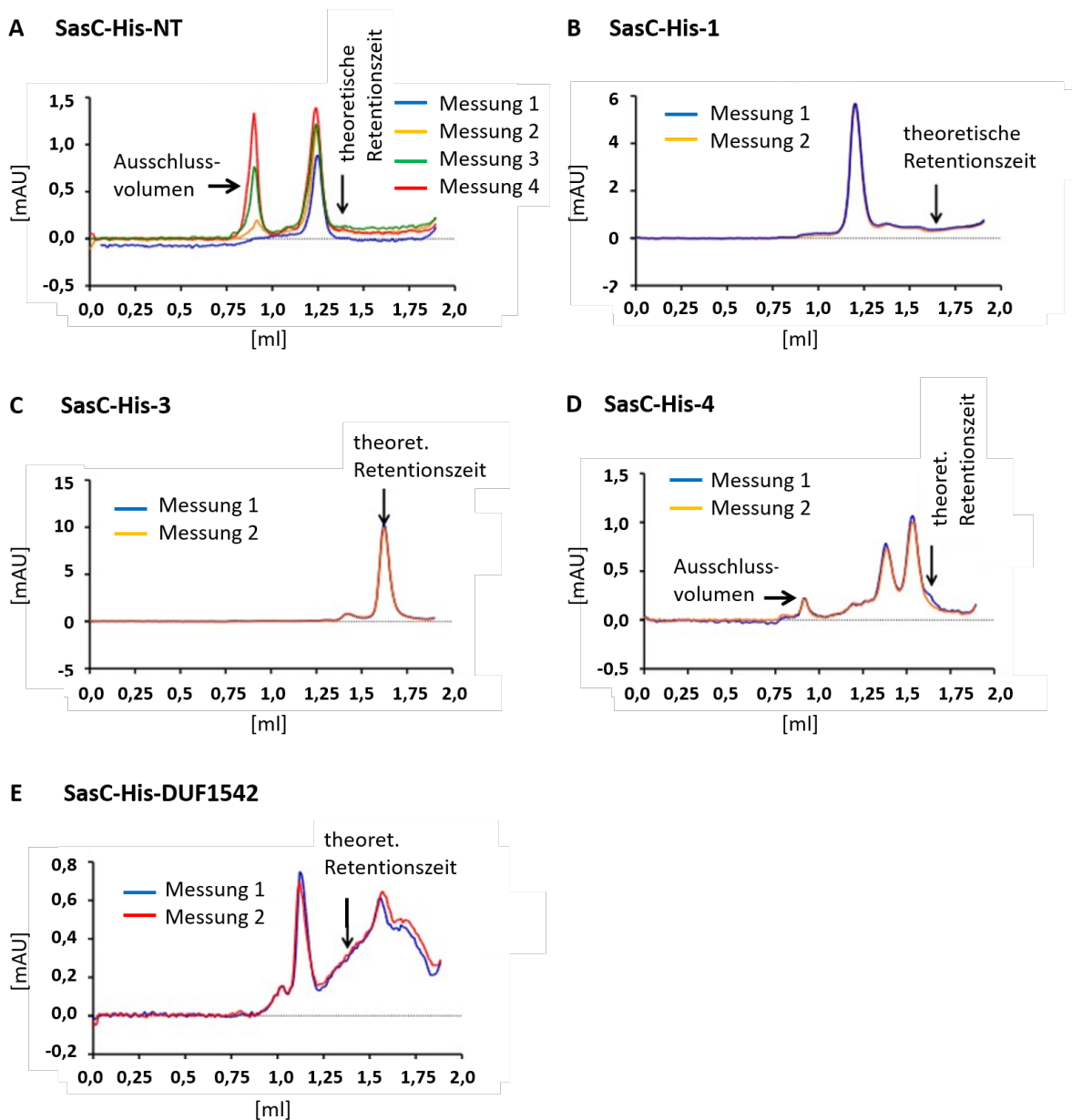


Abb. 4.31: **Elutionsdiagramme der Größenausschlusschromatographie.** **A SasC-His-NT.** SasC-His-NT eluiert vor der theoretischen Retentionszeit bereits bei 1,25 min. Für das Eluat wurde ein Molekulargewicht von 175,2 kDa berechnet. **B SasC-His-1.** Für SasC-His-1 wurde ein Molekulargewicht von 211 kDa bei einer Retentionszeit (t_R) von 1,2 min ermittelt. **C SasC-His-3.** Für den höchsten Peak bei einer t_R von 1,62 min wurde ein Molekulargewicht von 29,1 kDa berechnet, was der Monomerform entspricht. **D SasC-His-4.** Für $t_R = 1,38$ min wurde ein Gewicht von 90,4 kDa ermittelt, für den Peak bei $t_R = 1,53$ min ein MW von 44,5 kDa. **E SasC-His-DUF1542.** Für den höchsten Peak bei $t_R = 1,12$ min wurde ein MW von 308,9 kDa ermittelt, für den breiten Peak nach der theoret. t_R ein MW von 38,7 kDa berechnet.

weist eine große Reinheit auf und das berechnete Molekulargewicht von 29,1 kDa entspricht dem theoretischen von 27,09 kDa. In der Abbildung ist zu erkennen, dass der Hauptpeak von SasC-His-3 bei der erwarteten Retentionszeit liegt. SasC-His-3 liegt größtenteils als Monomer und zu einem sehr geringen Anteil als Oligomer ($t_R = 1,42$ min; 74,9 kDa) vor.

In Abb. 4.31 D ist zu erkennen, dass SasC-His-4 in zwei Peaks eluiert, welche beide vor der theoretischen t_R liegen. Beide Peaks sind sehr niedrig sind und schlecht voneinander zu trennen (nicht distinkt). Die Reinheit liegt für $t_R = 1,38$ min bei 35,1% (Messung 1) und 33,4% (Messung 2). Das errechnete Molekulargewicht liegt hier bei 90,4 kDa. Für den zweiten Peak bei $t_R = 1,53$ min liegt die Reinheit bei 48,7 bzw. 48,9%. Für diese Eluat wurde ein Molekulargewicht von 44,5 kDa errechnet. Die Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass SasC-His-4 zu ähnlichen Anteilen als Dimer oder als Tetramer vorliegt, da das theoretische Molekulargewicht des Monomers bei 23,82 kDa liegt.

Ein Teil der SasC-His-DUF1542-Proteine (Abb. 4.31 E) eluieren bei 1,12 min, was vor der theoretischen Retentionszeit liegt, ein weiterer Teil bei einer t_R von 1,57 min, welche nach der theoret. t_R liegt. Die Reinheit beider Eluate beträgt 26,3 bzw. 34,4 %. Für den Peak bei $t_R = 1,12$ min wurde ein Gewicht von 36,9 kDa (Messung 1) bzw. 40,5 kDa (Messung 2) bestimmt. Diese Werte könnten auf einen Abbau von SasC-His-DUF1542 hinweisen. Das SasC-His-DUF1542-Monomer besitzt ein theoret. Molekulargewicht von 68,15 kDa. Ein Komplex von 308,9 kDa ($t_R = 1,12$ min) würde einem Oligomer aus 4-5 SasC-His-DUF1542-Molekülen entsprechen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die SasC-His-Proteine in unterschiedlichem Ausmaß Oligomere bilden.

4.4.2 SasC-His-1 und SasC-His-NT zeigen starke Interaktion mit immobilisierten Proteinen unter schwach ionischen Bedingungen

Die Daten der *Biospecific Interaction Analysis* (BIA) werden als sog. Sensorgramme (Auftragung des SPR-Signals gegen die Zeit) dargestellt (Abb. 4.32 - 4.35). Die grafische Auswertung der SPR-Messung wurde von der Firma Biaffin durchgeführt. Aus diesen lassen sich u. a. Eigenschaften der Wechselwirkungen von Biomolekülen wie konzentrationsabhängige Bindungsaffinitäten ablesen. Alle hier getesteten Proteine (SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-3, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542) konnten erfolgreich unter sauren Bedingungen auf der CM-Dextran-Oberfläche des Sensorchips immobilisiert werden. Auf Chip 1 wurden SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-3 und auf Chip 2 SasC-His-NT, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 kovalent gekoppelt. Die Regeneration mit 1 M Ethanolamin erfolgte ohne Verlust der Bindungsaktivität. Die Liganden SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-3, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 wurden in zwei Konzentrationen (50 und 500 nM) getestet.

Die erste Versuchsreihe wurde unter schwach ionischen Bedingungen durchgeführt. Die Messwerte sind in Tabelle 4.8 und die Sensorgramme in den Abbildungen 4.32 und 4.33 zusammengefasst.

Aus den Werten und Graphen lässt sich eine deutliche Interaktion bei SasC-His-1 an SasC-His-NT und SasC-His-1 ablesen. So wird bei Bindung von SasC-His-1 an immobilisiertes SasC-His-NT eine $RU_{500\text{ nM}}$

Tabelle 4.8: **Messwerte der SPR bei niedriger Ionenstärke von 150 mM NaCl.** Die Bindungsstärke von SasC-His-Proteinen wurden an immobilisiertes SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-3, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 gemessen. SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-3 wurden auf Chip 1 immobilisiert und an Messtag 2 gemessen; SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 wurden auf Chip 2 gebunden und an Messtag 1 analysiert. R_{\max} : theoretisch maximal erreichbare *response unit* [RU]; RU: Intensität des SPR-Signals einer Bindung; $RU_{500\text{ nM}}$: *response units* bei einer Analytenkonzentration von 500 nM. Die Stöchiometrie gibt das Verhältnis des Bindungssignals zur Dichte der Proteine auf der Oberfläche an.

Immobilisiertes Protein	Ligand	R_{\max}	$RU_{500\text{ nM}}$	Stöchiometrie
		theoretisch		in [%]
Immobilisiertes Protein	SasC-His-NT			
	SasC-His-NT	900	14,45	1,6
	SasC-His-1	250	35,4	14,2
	SasC-His-3	350	5,8	1,7
	SasC-His-4	300	2,0	0,7
	SasC-His-DUF1542	900	-1,6	0,0
	SasC-His-1			
	SasC-His-NT	1225	13,05	1,1
	SasC-His-1	337	33	9,8
	SasC-His-3	470	4,7	1,0
	SasC-His-4	410	2,5	0,6
	SasC-His-DUF1542	1225	-0,1	0,0
	SasC-His-3			
	SasC-His-NT	850	4,1	0,5
	SasC-His-1	235	23,1	9,8
SasC-His-3	325	1,0	0,3	
SasC-His-4	280	-0,3	-0,1	
SasC-His-DUF1542	850	-1,0	0,0	
SasC-His-4				
SasC-His-NT	1575	0,9	0,1	
SasC-His-1	435	32,5	7,5	
SasC-His-3	600	0,1	0,0	
SasC-His-4	520	0,3	0,1	
SasC-His-DUF1542	1575	-1,8	0,0	
SasC-His-DUF1542				
SasC-His-NT	985	-3,6	-0,4	
SasC-His-1	270	17,9	6,6	
SasC-His-3	375	-2,6	-0,7	
SasC-His-4	330	0,2	0,1	
SasC-His-DUF1542	985	-1,0	0,0	

= 35,4 gemessen. Auch für die homotypischen Interaktion mit immobilisiertem SasC-His-1 und eine heterotope Interaktion mit SasC-His-4 ist der Wert ähnlich hoch. Die Bindung an immobilisiertes SasC-His-3 und SasC-His-DUF1542 zeigen deutlich niedrigere Signalintensitäten. Das Bindungssignal ist bei 500 nM stets höher als bei 50 nM.

Für eine homotypische Interaktion von SasC-His-NT an immobilisiertes SasC-His-NT beträgt die $RU_{500\text{ nM}} = 14,45$ und für die Interaktion mit immobilisiertem SasC-His-1 noch 13,05. Die niedrigen Werte für Interaktionen von freiem SasC-His-NT mit den anderen immobilisierten Proteinen liegen sehr viel niedriger (4,1; 0,9; -3,6 für SasC-His-3, SasC-His-4 bzw. SasC-His-DUF1542), was auf keine Interaktion zwischen diesen Proteinen hinweist.

Werden SasC-His-3, SasC-His-4 oder SasC-His-DUF1542 als Liganden hinzugegeben, weist nur SasC-His-3 bei hoher Konzentration von 500 nM eine schwache Interaktion mit gebundenem SasC-His-NT und SasC-His-1 auf. SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 zeigen keine Interaktion mit immobilisierten Partnern.

Insgesamt wird das stärkste SPR-Signal von der Interaktion von SasC-His-1 an immobilisiertes SasC-His-NT erzeugt. Bei einer Ligandenkonzentration von 500 nM wird hier, bei einer theoretisch maximal erreichbaren Signalintensität von $RU_{\text{max theoret.}}=250$, ein Wert von $RU_{500\text{ nM}}=35,4$ erreicht, was eine Stöchiometrie von 14,2 % ergibt. Das bedeutet, dass 14,2 % der immobilisierten Proteine (hier SasC-His-NT) einen SasC-His-1-Liganden gebunden haben. SasC-His-1 zeigt durchgehend die stärkste Bindung an die immobilisierten Proteine, wiedergegeben durch den höchsten Anteil an abgesättigten Partnern.

Die Messungen wurden mit Chip 2 wiederholt. Auch hier wurden die höchsten Signale bei Bindung von SasC-His-1 oder SasC-His-NT an immobilisiertes SasC-His-NT gemessen (siehe 4.8, B 2. Messung). Für SasC-His-1 konnte eine Bindung an immobilisiertes SasC-His-4 ($RU_{500\text{ nM}}=31,1$) nachgewiesen werden.

Die Werte der Wiederholungsmessung bestätigen die Ergebnisse der ersten Messung.

Die Bindungskurven sind konzentrationsabhängig. Die höchsten Signalintensitäten erreicht die Bindung von SasC-His-1 an das jeweilige immobilisierte Protein, wenn der Ligand in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt wird. Zusammenfassend zeigen die SPR-Messungen, dass Zugabe von 50 nM SasC-His-1 oder 500 nM SasC-His-NT zu starken Bindungssignalen an immobilisiertes SasC-His-NT und SasC-His-1 führen. Allerdings ist der prozentuale Anteil an gesättigten immobilisierten Partnern für SasC-His-NT sehr viel geringer als für den Liganden SasC-His-1. SasC-His-NT zeigt mit gebundenem SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 keinerlei messbare Interaktion.

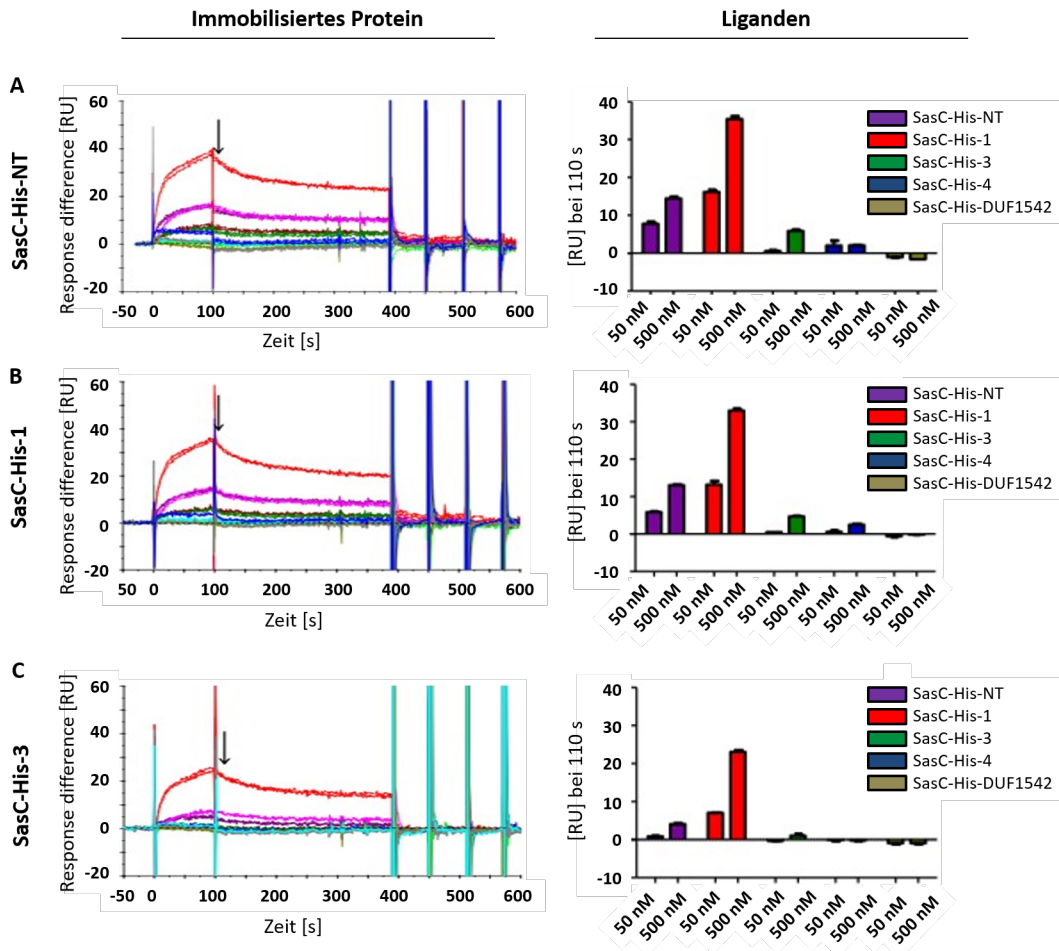


Abb. 4.32: SPR-Messung von immobilisierten SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-3 mit verschiedenen Liganden bei 150 mM NaCl. Linkes Bild: Sensorgramme der SPR-Messungen; rechtes Bild: Intensität der Interaktion in *resonance units* [RU] bei 110s (Pfeil links). **A Immobilisiertes SasC-His-NT.** SasC-His-1 zeigt die stärkste Interaktion mit immobilisiertem SasC-His-NT. 500 nM SasC-His-NT führen zu einem ähnlich hohen Signal wie 50 nM SasC-His-1. **B Immobilisiertes SasC-His-1.** Die Bindung von SasC-His-1 und SasC-His-NT an immobilisiertes SasC-His-1 sind vergleichbar hoch wie an immobilisiertes SasC-His-NT. **C Immobilisiertes SasC-His-3.** SasC-His-1 zeigt das stärkste Bindungssignal. SasC-His-NT bindet nur schwach. Die Messungen wurden unter schwach ionischen Bedingungen in Anwesenheit von 150 mM NaCl durchgeführt.

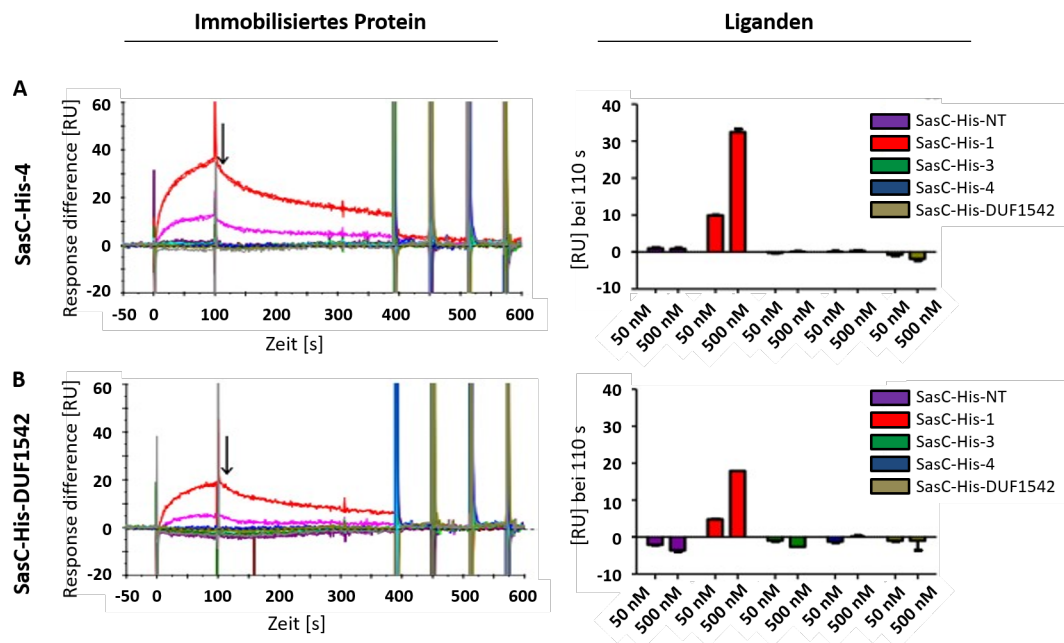


Abb. 4.33: SPR-Messung von immobilisierten SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 mit verschiedenen Liganden bei 150 mM NaCl. Linkes Bild: Sensorgramme der SPR-Messungen; rechtes Bild: Intensität der Interaktion in *resonance units* [RU] bei 110 s (Pfeil links). **A Immobilisiertes SasC-His-4.** Nur SasC-His-1 zeigt eine Interaktion mit immobilisiertem SasC-His-4. **B Immobilisiertes SasC-His-DUF1542.** SasC-His-1 zeigt schwache Bindung an SasC-DUF1542. Die anderen Liganden zeigen keinerlei Interaktion mit immobilisiertem SasC-His-4 oder SasC-His-DUF1542. Die Messungen wurden unter schwach ionischen Bedingungen in Anwesenheit von 150 mM NaCl durchgeführt.

4.4.3 Erhöhung der Ionenstärke führt zu schwächerer Bindung von SasC-His-1 und SasC-His-NT an die immobilisierten Proteine

Um mögliche unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden die Analysen unter Bedingungen mit erhöhter Ionenstärke (300 mM NaCl) wiederholt. Erhaltene Messwerte sollten demnach nur die Intensitäten spezifischer Protein-Protein-Interaktionen wiedergeben. Für alle immobilisierten Proteine sank die Signalintensität der Interaktionen. In Tabelle 4.9 sind die Werte der SPR-Messung bei erhöhter Ionenstärke zusammengefasst.

Aus den Werten aus Tabelle 4.9 geht auffällig hervor, dass das Bindungssignal des am stärksten interagierenden Proteins SasC-His-1 an die immobilisierten Proteine im Vergleich zu den Werten in Tabelle 4.8 stark erniedrigt ist. So beträgt die RU_{\max} für die Bindung von SasC-His-1 an immobilisiertes SasC-His-NT 13,7 und an SasC-His-1 9,1. Eine schwache Bindung konnte für SasC-His-1 an immobilisiertes SasC-His-4 ($RU_{\max} = 5,0$) nachgewiesen werden. Unter niedrigeren Ionenstärken (siehe Tab. 4.8) betragen die RU_{\max} -Werte 35,4 (an immobilisiertes SasC-His-NT) bzw. 33 (an immobilisiertes SasC-His-1). Für SasC-His-1 an immobilisiertes SasC-His-NT bedeutet dies eine Signalabnahme von 38,7% bzw. eine Abnahme um 27,5% für die Bindung von SasC-His-1 an SasC-His-1. Das zweitstärkste SPR-Signal liefert die Interaktion von SasC-His-NT an sich selbst oder an SasC-His-1. Unter erhöhten ionischen Bedingungen ist das SPR-Signal um 57,4% bzw. um 43,6% schwächer. Ein schwaches SPR-Signal konnte für SasC-His-1 an SasC-His-4 detektiert werden ($RU_{\max} = 5,0$). Eine Interaktion von Liganden mit SasC-His-3 oder SasC-His-DUF1542 konnte nicht detektiert werden.

Unter erhöhten ionischen Bedingungen zeigen die Bindungskurven von SasC-His-1 und SasC-His-NT an immobilisiertes SasC-His-NT (Abb. 4.34 A) bzw. SasC-His-1 (Abb. 4.34 (B)) das stärkste Signal.

Insgesamt ist auch die Konzentrationsabhängigkeit (50 nM zu 500 nM) der Signalintensität von SasC-His-1 unter erhöhten ionischen Bedingungen schwächer als bei niedrigeren Ionenstärken. SasC-His-NT und SasC-His-1 liefern vergleichbar starke SPR-Signale. SasC-His-3 zeigt noch schwache Interaktion mit immobilisiertem SasC-His-NT (Tabelle 4.9). Für immobilisiertes SasC-His-3, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 konnte mit keinem der Liganden eine Interaktion mehr nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die in den Abb. 4.32 und 4.33 dargestellten Bindungskurven unspezifischer Natur waren.

Auch in den Wiederholungsmessungen von Chip 2 wurden die spezifischen Bindungssignale durch erhöhte Ionenstärke stark verringert. Nur für SasC-His-NT ($RU_{500 \text{ nM}}=12,5$) und SasC-His-1 ($RU_{500 \text{ nM}} = 26,9$) konnten noch Interaktionen mit immobilisiertem SasC-His-NT detektiert werden. Die erhöhte Ionenkonzentration löst unspezifische Bindungen und reduziert das SPR-Signal möglicher spezifischer Bindungen. Eine spezifische stabile Interaktion von SasC-His-1 an SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-4 konnte nachgewiesen werden.

Tabelle 4.9: Messwerte der SPR-Analyse bei erhöhter Ionenstärke von 300 mM NaCl. SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-3, SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 wurden auf einem CH5-Chip immobilisiert und die Bindungsstärke der SasC-His-Analyten an diese gemessen. SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-3 wurden auf Chip 1 immobilisiert und an Messtag 2 gemessen; SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 wurden auf Chip 2 gebunden und an Messtag 1 analysiert. Eine Erhöhung der Ionenstärke führt zu geringeren Signalintensitäten und schwächeren Bindungen. R_{\max} : theoretisch maximal erreichbare *response unit* (RU); $RU_{500\text{nM}}$: *response units* bei einer Analytenkonzentration von 500 nM. Die Stöchiometrie gibt das Verhältnis des Bindungssignals zur Dichte der Proteine auf der Oberfläche an.

Immobilisiertes Protein	SasC-His-NT	Ligand	R_{\max} theoretisch	$RU_{500\text{nM}}$	Stöchiometrie in [%]
		SasC-His-NT	900	8,3	0,9
		SasC-His-1	250	13,7	5,5
		SasC-His-3	350	2,9	0,8
		SasC-His-4	300	1,2	0,4
		SasC-His-DUF1542	900	0,1	0,0

Immobilisiertes Protein	SasC-His-1	Ligand	R_{\max} theoretisch	$RU_{500\text{nM}}$	Stöchiometrie in [%]
		SasC-His-NT	1225	5,7	0,5
		SasC-His-1	337	9,1	2,7
		SasC-His-3	470	1,8	0,4
		SasC-His-4	410	0,6	0,1
		SasC-His-DUF1542	1225	-0,6	0,0

Immobilisiertes Protein	SasC-His-3	Ligand	R_{\max} theoretisch	$RU_{500\text{nM}}$	Stöchiometrie in [%]
		SasC-His-NT	850	0,8	0,1
		SasC-His-1	235	1,8	0,8
		SasC-His-3	325	0,3	0,1
		SasC-His-4	280	0,2	0,1
		SasC-His-DUF1542	850	0,1	0,0

Immobilisiertes Protein	SasC-His-4	Ligand	R_{\max} theoretisch	$RU_{500\text{nM}}$	Stöchiometrie in [%]
		SasC-His-NT	1575	-0,1	0
		SasC-His-1	435	5,0	1,1
		SasC-His-3	600	-1,0	-0,2
		SasC-His-4	520	-1,3	-0,3
		SasC-His-DUF1542	1575	-2,0	0,0

Immobilisiertes Protein	SasC-His-DUF1542	Ligand	R_{\max} theoretisch	$RU_{500\text{nM}}$	Stöchiometrie in [%]
		SasC-His-NT	985	-0,4	0
		SasC-His-1	270	0,7	0,2
		SasC-His-3	375	-0,6	-0,2
		SasC-His-4	330	-0,9	-0,3
		SasC-His-DUF1542	985	-1,9	0,0

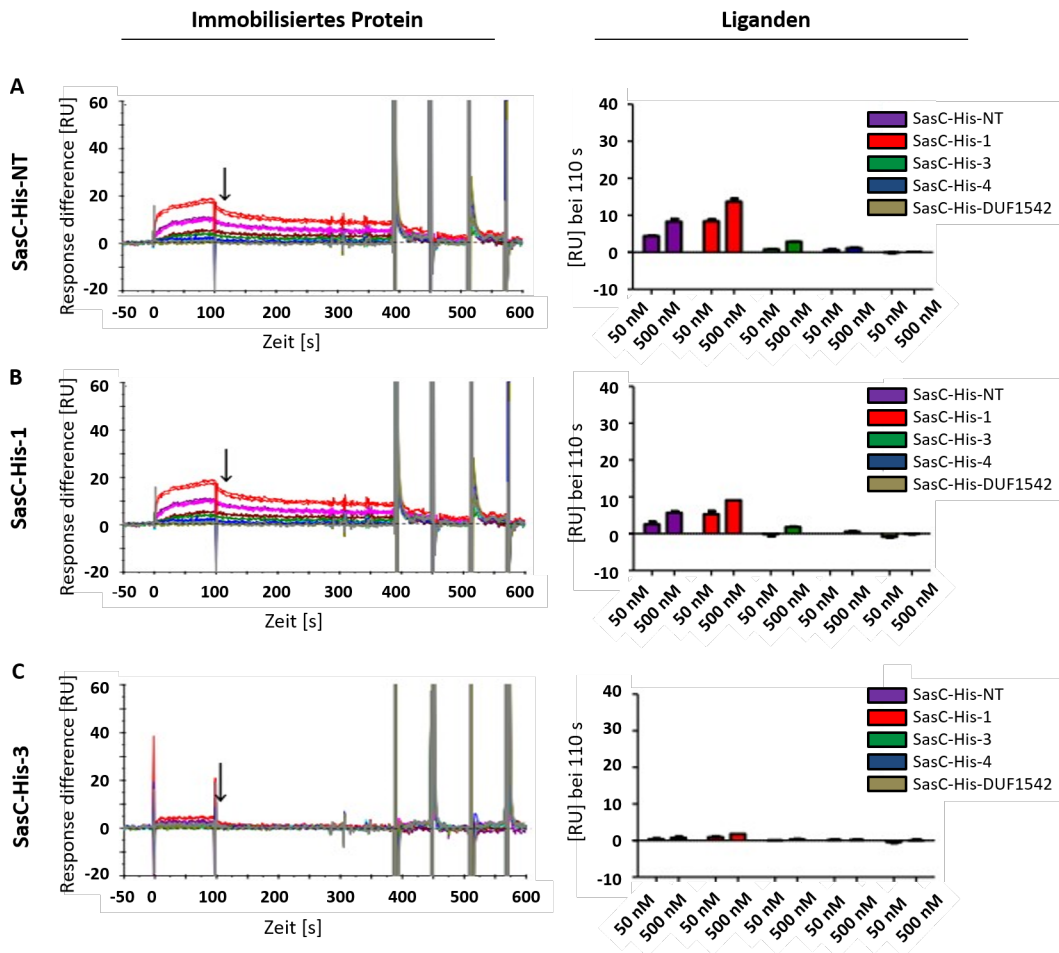


Abb. 4.34: SPR-Messung von immobilisierten SasC-His-NT, SasC-His-1 und SasC-His-3 mit verschiedenen Liganden bei 300 mM NaCl. Linkes Bild: Sensorgramme der SPR-Messungen; rechtes Bild: Intensität der Interaktion in *resonance units* [RU] bei 110 s (Pfeil links). **A Immobilisiertes SasC-His-NT.** Die Erhöhung der Ionenstärke auf 300 mM NaCl führt zu einer starken Abnahme des Bindungssignals der Liganden an immobilisiertes SasC-His-NT. **B Immobilisiertes SasC-His-1.** Die Signalintensität der Bindung von SasC-His-NT und SasC-His-1 an SasC-His-1 ist geringer als unter niedrig-ionischen Bedingungen. **C Immobilisiertes SasC-His-3.** Kein Ligand zeigte eine Interaktion. Die Liganden SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 zeigen keine Bindung an eines der immobilisierten Proteine.

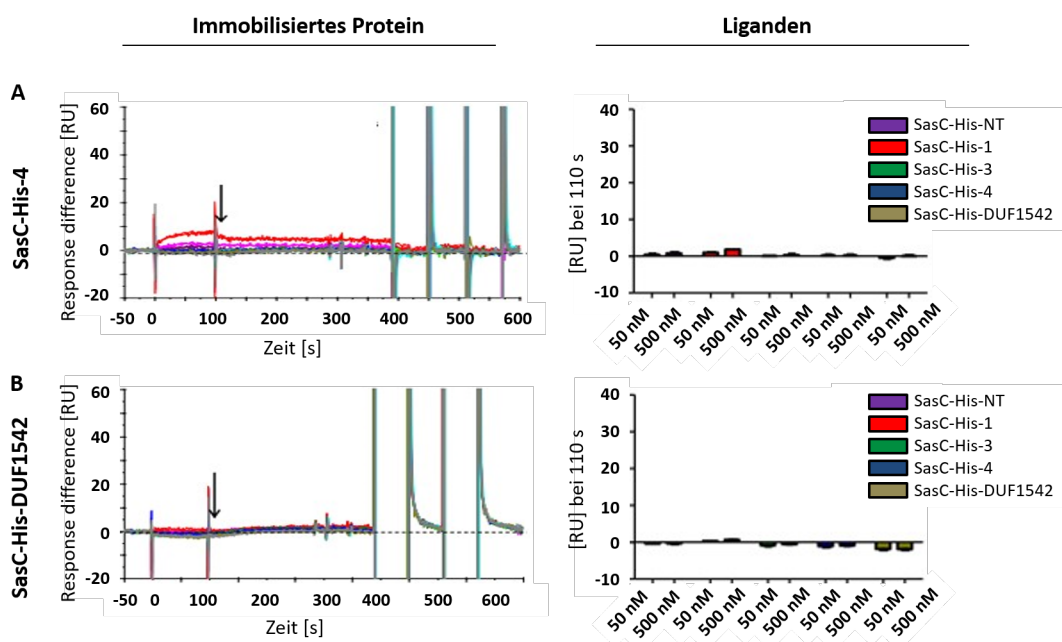


Abb. 4.35: SPR-Messung von immobilisierten SasC-His-4 und SasC-His-DUF1542 mit verschiedenen Liganden bei 300 mM NaCl. Linkes Bild: Sensorgramme der SPR-Messungen; rechtes Bild: Intensität der Interaktion in *resonance units* [RU] bei 110 s (Pfeil links). **A Immobilisiertes SasC-His-4. B Immobilisiertes SasC-His-DUF1542.** Keiner der Ligandenproteine zeigte eine Interaktion mit den immobilisierten Proteinen.

4.5 K_d -Bestimmung homo- und heterotypischer

SasC-His-Interaktionen mittels MicroScale Thermophoresis

Um potentielle Interaktionen der verschiedenen N-terminalen Domänen zu untersuchen, wurden die Bindungseigenschaften und Dissoziationskonstanten einiger ausgewählte SasC-His-Proteine bestimmt.

Dazu wurden verschiedene Konzentrationen eines als Liganden eingesetzten SasC-His-Proteins (SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-3, SasC-His-4, SasC-His-DUF1542) gegen ein fluoreszenzmarkiertes SasC-His-Protein*NT647 (SasC-His-NT, SasC-His-1, SasC-His-DUF1542) konstanter Konzentration titriert. In den Abb. 51-56 sind die grafischen Auswertungen der K_d -Bestimmungen verschiedener Interaktionspartner dargestellt. Es ist das Maß der Fluoreszenz F_{norm} (in %) gegen die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen des Ligandenproteins (logarithmische Skala; in [nM]) aufgetragen. Es ergibt sich eine dosisabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität.

Die Auswertung erfolgte automatisch mit der zum Gerät dazugehörigen NanoTemper Analysesoftware.

Für die K_d -Bestimmung wurden die Kurven von der NanoTemper Analysesoftware extrapoliert, da aufgrund einer zu geringen Konzentration der Liganden keine vollständige Sättigung des markierten Bindungspartners erreicht werden konnte. Zu Beginn der Dosisabhängigkeitskurve bei niedrigen Konzentrationen des Liganden liegen Ligand und markiertes Protein im ungebundenen Zustand (*unbound state*) vor, in welchem noch keine Interaktion stattgefunden hat. Die Abflachung der Bindungskurve im Bereich höherer Ligandenkonzentrationen steht für die Entstehung des gebundenen Zustands (*bound state*), in welchem beide Proteine beginnen miteinander zu interagieren. Eine vollständige Absättigung der Bindungspartner wird durch eine vollkommen flache Kurve repräsentiert. Alle markierten Proteine wurden in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt.

In Abb. 4.36 ist die Dosisabhängigkeit einer homotypischen Interaktion von SasC-His-NT*NT647 mit SasC-His-NT als Liganden dargestellt. Die Konzentration des Ligandenproteins wurde von 0,107 nM bis 3,5 μM variiert. Ab einer Konzentration von 100 nM beginnt die Kurve abzuflachen und Interaktion stattzufinden. Es konnte keine Sättigung erreicht werden. Die Analysesoftware berechnete einen vorläufigen K_d -Wert von $1,1 \times 10^{-6}$ M für eine Interaktion von SasC-His-NT mit sich selbst. In diesem Ansatz konnten auch SasC-His-NT-Aggregate detektiert werden. Um zu überprüfen, ob die Aggregatbildung die Interaktion und damit den K_d -Wert beeinflusst, wurde die SasC-His-NT-Verdünnungsreihe, welche als Ligand eingesetzt wurde, zentrifugiert und die Messung mit dem Überstand wiederholt (Daten nicht gezeigt). Beide Messungen ergaben einen vergleichbaren K_d -Wert, was impliziert, dass SasC-His-NT-Aggregate die MST-Messung nicht beeinflussen haben.

Für die Messung der homotypische Interaktion von SasC-His-1 (Abb. 4.37) wurde die Konzentration des SasC-His-1-Liganden von 0,107 nM bis 3,5 μM variiert. Auch für diese Partner beginnt eine Interaktion ab einer Ligandenkonzentration von 100 nM stattzufinden. Der errechnete K_d -Wert beträgt ebenfalls $1,1 \times 10^{-6}$ M. Auch hier wurde der Sättigungsgrad im *bound state* nicht erreicht. In Abb. 4.38 ist zu erkennen, dass keine Interaktion von SasC-His-DUF1542 mit sich selbst stattfindet. Die Messwerte sind dosisunab-

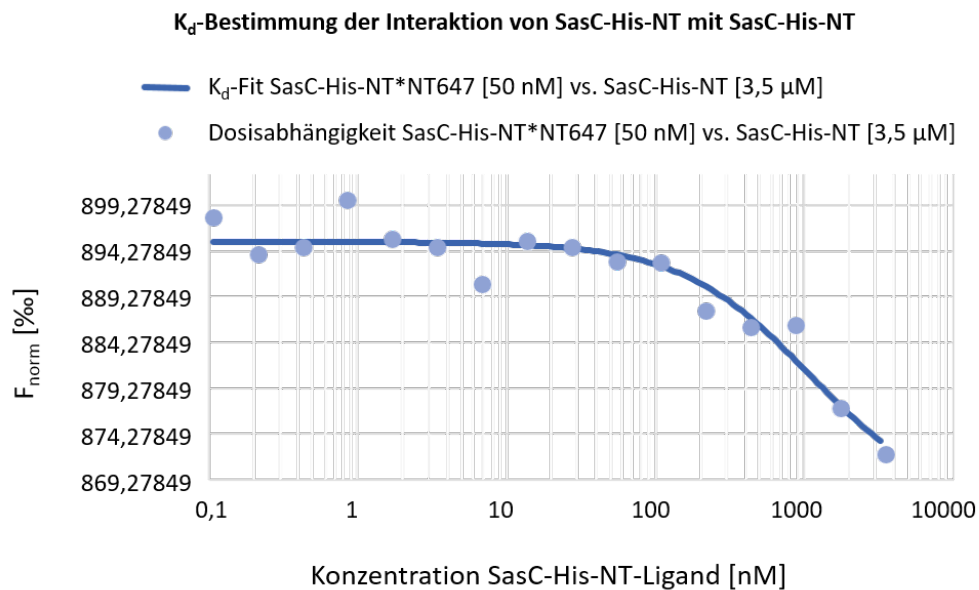


Abb. 4.36: K_d -Wert-Bestimmung einer homotypische SasC-His-NT*NT647/SasC-His-NT-Interaktion. Eine dosisabhängige Messung der Fluoreszenzänderung ergab einen theoret. K_d -Wert von $1,1 \times 10^{-6}$.

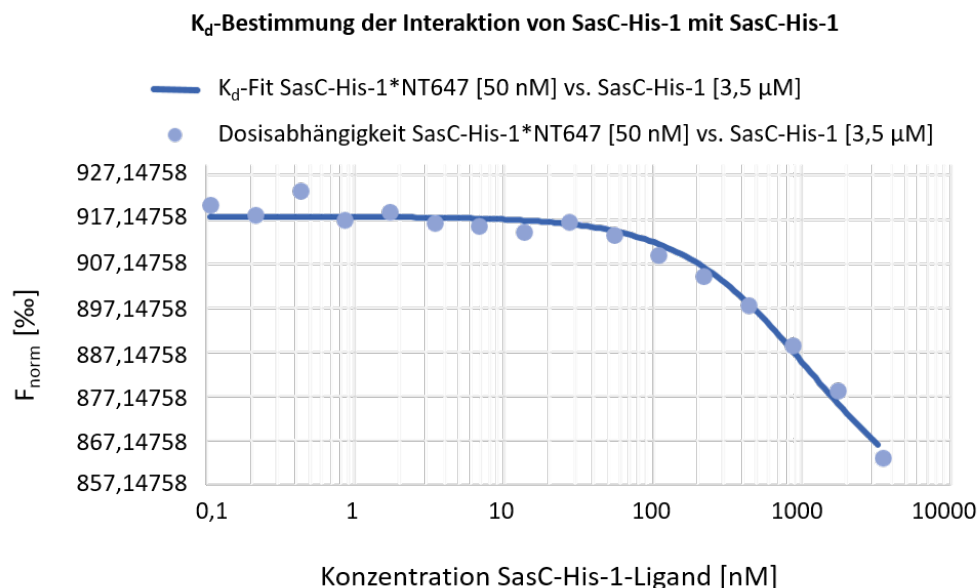


Abb. 4.37: K_d -Wert-Bestimmung einer homotypische SasC-His-1*NT647/SasC-His-1-Interaktion. Eine dosisabhängige Messung der Fluoreszenzänderung ergab einen theoret. K_d -Wert von $1,1 \times 10^{-6}$ M.

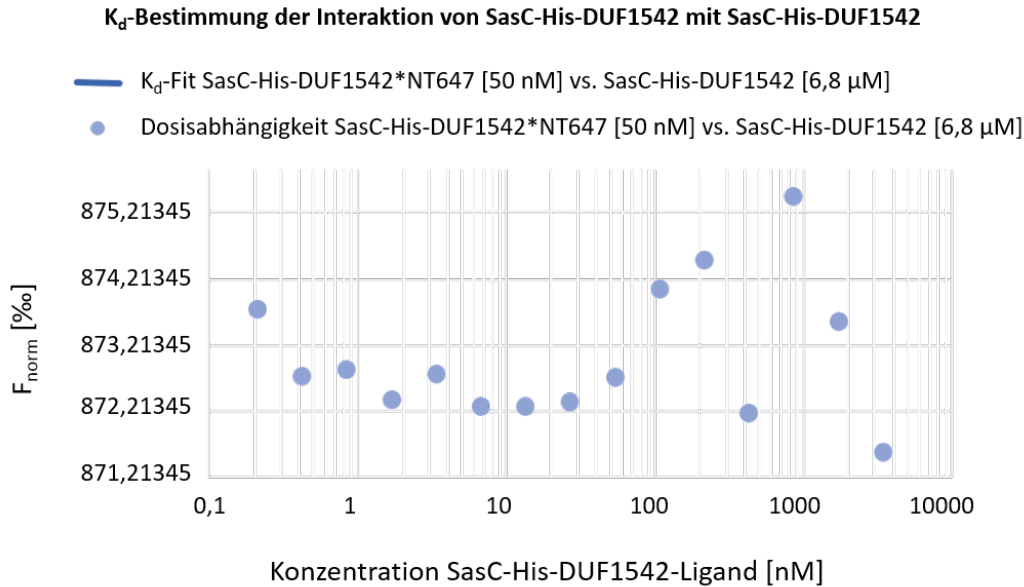


Abb. 4.38: **K_d -Wert-Bestimmung einer homotypische SasC-His-DUF1542*NT647/SasC-His-DUF1542-Interaktion.** Für His-DUF1542 konnte keine homotypische Bindung nachgewiesen werden. Die einzelnen Messwerte lassen sich nicht in Korrelation zur Konzentration des Liganden setzen.

hängig und zufällig gestreut. Die eingesetzten Konzentrationen des SasC-His-DUF1542-Liganden lagen zwischen 0,208 nM und 6,8 μ M.

In den folgenden Abb. 4.39 bis 4.41 sind die Ergebnisse der untersuchten potentiellen heterotypischen Interaktionen grafisch dargestellt. Als fluoreszenzmarkiertes Protein wurde in allen Fällen SasC-His-1 mit einer Konzentration von 50 nM eingesetzt, da dieses bereits in vorhergegangenen Experimenten Interaktionsverhalten zeigte. So konnten sowohl in den SEC-Versuchen SasC-His-1-Oligomere nachgewiesen werden, als auch in den BS³-Experimenten bzw. in der anfänglichen Reinigung, wo SasC-His-1 bereits als Dimer vorlag. In den BIAcore-Analysen zeigte SasC-His-1 starke Bindung an die immobilisierten Proteine und auch in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen ist eine Streuung der Partikelgrößen erkennbar, welche vermuten lässt, dass SasC-His-1 in multimeren Zuständen vorliegen kann.

Für eine Interaktion von SasC-His-NT gegen markiertes SasC-His-1 (Abb. 4.39) wurde ein K_d -Wert von $1,1 \times 10^{-6}$ M berechnet, welcher damit nur halb so groß ist, wie für alle anderen Interaktionen. Auch konnte in diesem Fall der Beginn der Sättigung erreicht werden. Für alle anderen MST-Experimente war die maximale Konzentration des Liganden nicht hoch genug um eine vollständige Absättigung des Bindungspartners zu erreichen.

Für die Messung der Interaktion von SasC-His-3 mit markiertem SasC-His-1 (Abb. 4.40) konnte ein K_d -Wert von 2×10^{-6} M errechnet werden. Dieser ist damit fast doppelt so hoch wie die K_d -Werte für die homotypischen Interaktion von SasC-His-NT (Abb. 4.36) oder SasC-His-1 (Abb. 4.37) und beträgt sogar das Vierfache des Wertes für die Interaktion von SasC-His-1*NT647 mit SasC-His-NT (Abb. 4.39).

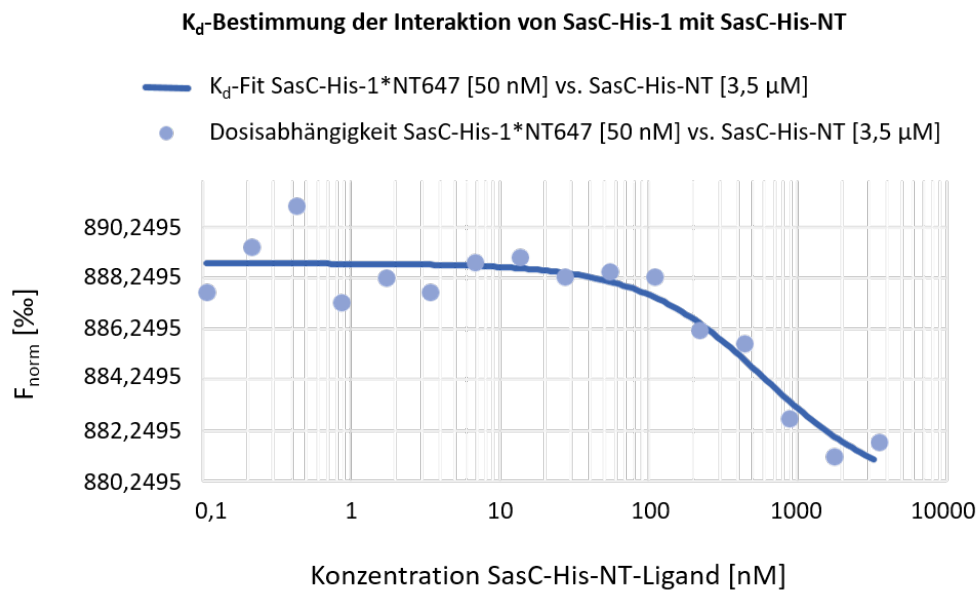


Abb. 4.39: K_d -Wert-Bestimmungen einer heterotypischen Interaktion von SasC-His-1*NT647 mit SasC-His-NT. Eine dosisabhängige Messung der Fluoreszenzänderung ergab einen theoret. K_d -Wert von $0,55 \times 10^{-6}$ M.

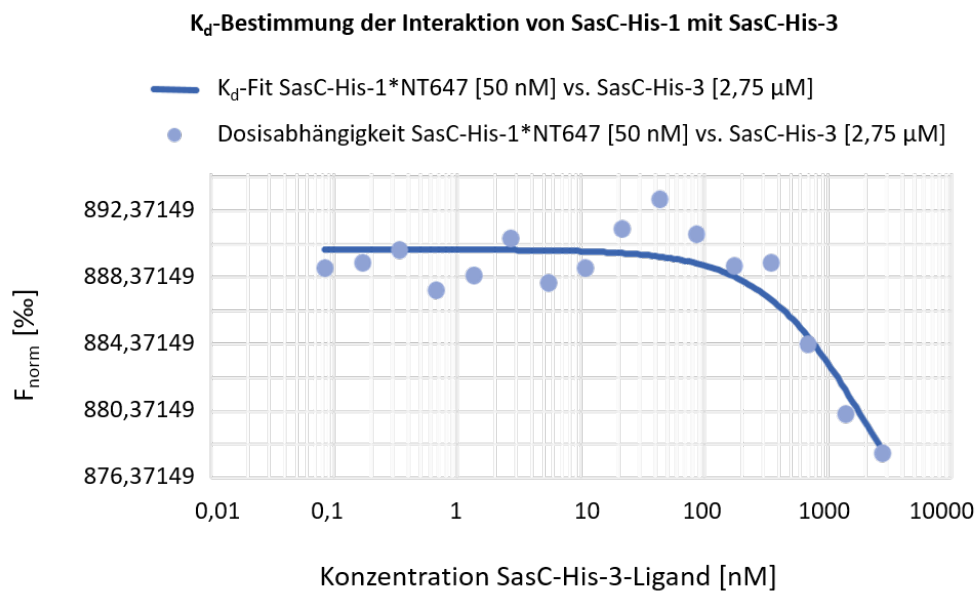


Abb. 4.40: K_d -Wert-Bestimmungen einer heterotypischen Interaktion von SasC-His-1*NT647 mit SasC-His-3. Eine dosisabhängige Messung der Fluoreszenzänderung ergab einen theoret. K_d -Wert von 2×10^{-6} M.

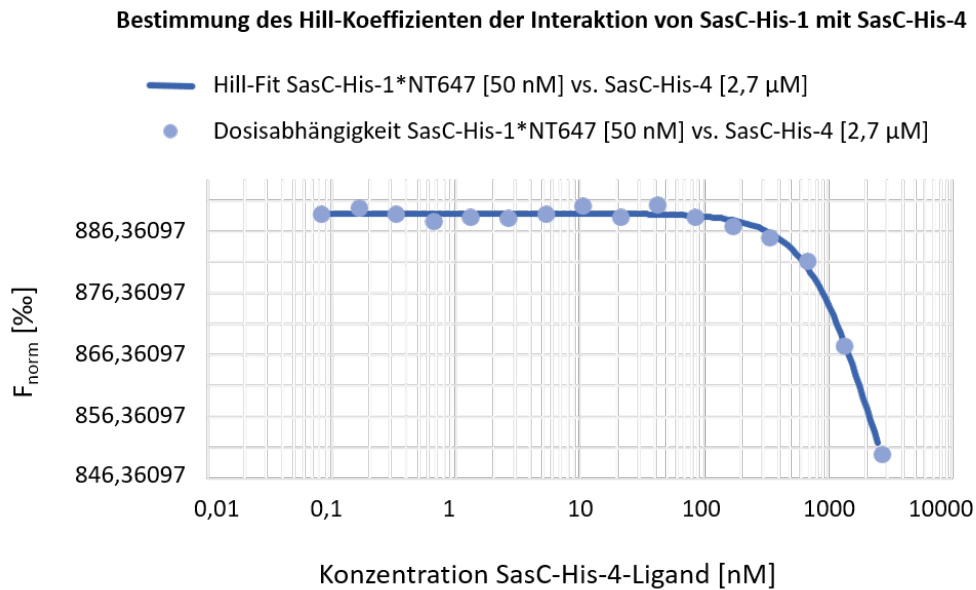


Abb. 4.41: **Bestimmung des Hill-Koeffizienten einer heterotypischen Interaktion von SasC-His-1*NT647 mit SasC-His-4.** Für die Bindung von SasC-His-1 und SasC-His-4 konnte kein K_d -Wert bestimmt werden. Die Ergebnisse lassen auf eine kooperative Bindung schließen. Der berechnete Hill-Koeffizient beträgt 1,6, bei einer EC_{50} von 2,2 μ M.

Eine Abflachung der Kurve beginnt erst ab einer Ligandenkonzentration von > 500 nM. Die Konzentration des Liganden wurde hier von 0,083 nM bis 2,75 μ M variiert. Im Vergleich zu den anderen MST-Messungen ist im Bereich des *unbound state* (0,1 nM bis 100 nM) eine höhere Streuung der Messwerte zu beobachten, bedingt durch geringe Konzentrationsunterschiede des markierten SasC-His-1.

Als letzte Kombination wurde die Interaktion von SasC-His-4 mit markiertem SasC-His-1 untersucht (Abb. 4.41). Die Konzentration des Liganden SasC-His-4 wurde von 0,083 nM bis 2,75 μ M variiert. Für diese Bindung konnte kein K_d -Wert berechnet werden. Da auch hier kein Sättigungsgrad erreicht wurde und die Software keinen K_d -Wert extrapolieren konnte, wurden die Daten mit dem sog. Hill-Algorithmus analysiert. Der Hill-Koeffizient beschreibt den Einfluss der Ligandenbindung an mehreren Bindestellen in einem Molekül. Ein Wert von 1 bedeutet, dass keine Interaktion zwischen den einzelnen Bindestellen stattfindet. Antagonismus oder negative Kooperativität wird durch einen Koeffizienten von <1 beschrieben. In diesem Fall verringert die Bindung des ersten Liganden die Affinität der anderen Bindestellen. Liefert der Hill-Koeffizient einen Wert >1 ist dies ein Hinweis auf eine positive Kooperativität, bei welcher durch Bindung eines Liganden die Affinität der anderen Bindestellen erhöht wird [220]. Für die Interaktion von SasC-His-4 mit SasC-His-1*NT647 wurde ein Hill-Koeffizient von 1,6 berechnet. Es findet die Bindung mehrerer SasC-His-4-Moleküle (hier durchschnittlich 1,6) an SasC-His-1 statt. Die effektive Konzentration EC_{50} , bei welcher 50 % der Ligandenmoleküle gebunden sind, wurde mit 2,2 μ M ermittelt. Die Bestimmungen wurden einmalig durchgeführt.

4.6 Phänotypische Analyse *sasC*- und *sasC*-Subklon exprimierender *Staphylokokkenstämme*

Um die SasC-abhängige Aggregation zu untersuchen, wurden in der AG Heilmann verschiedene Subklone des Proteins konstruiert (Abb. 4.42) und zur Expression in verschiedene *Staphylokokkenstämme* eingebracht. Die Aggregations- und Biofilmeigenschaften der Subklone 1 und 2 wurden von Schröder *et al.* untersucht [128]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Subklone mit in die Versuche integriert, wobei Subklon 1 (Sub 1) als positive Referenz diente, da die Aggregation-vermittelnden Domänen im N-terminalen Bereich liegen und Subklon 2 (Sub 2) als Negativkontrolle, da die DUF1542-Domänen nicht an der SasC-vermittelten Biofilmbildung beteiligt sind. Alle Subklone beinhalten das für den Transport erforderliche N-terminalen Signalpeptids mit einem YSIRK-Motiv und ein C-terminales LPXTG-Motiv zur Verankerung des Proteins in der Zellwand.

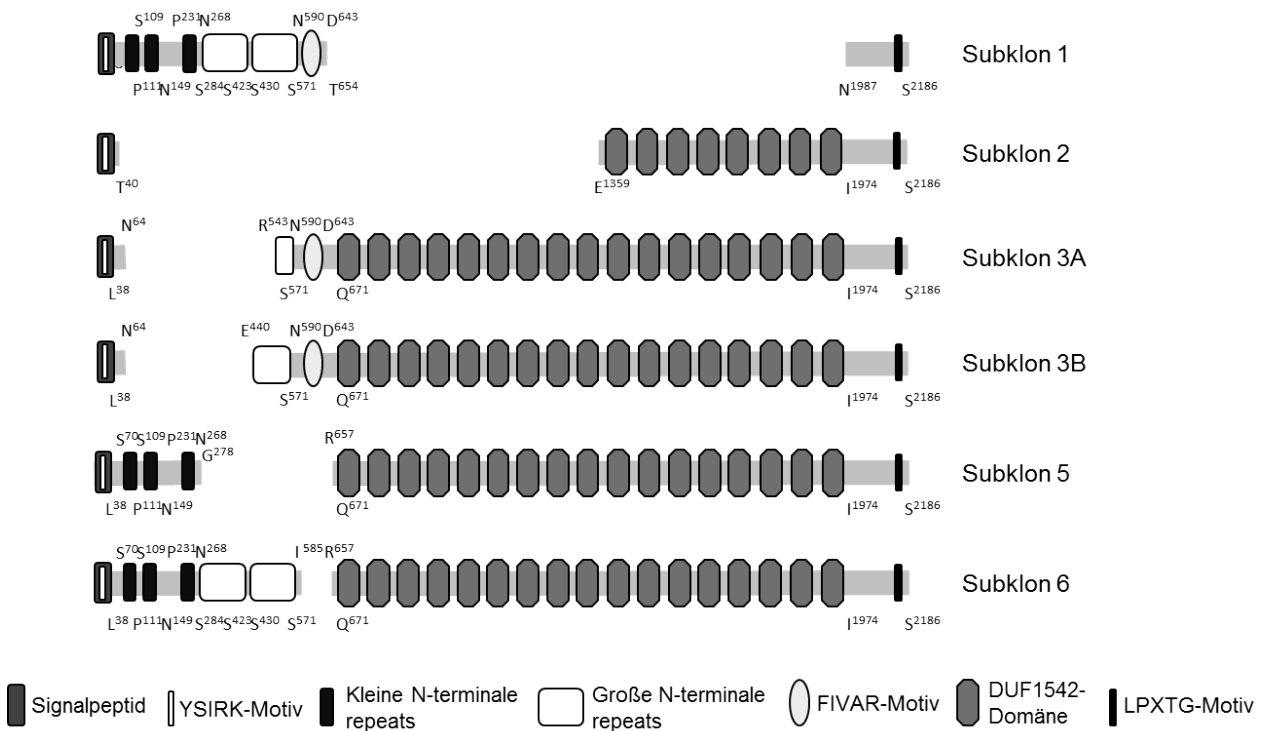


Abb. 4.42: **Schematische Darstellung der SasC-Subklone.** Sub 1 beinhaltet den gesamten N-terminalen Bereich und Sub 2 die DUF1542-Domänen 10-17. Die Subklone 3A, 3B, 5 und 6 unterscheiden sich im N-terminalen Bereich. Sub 3A fehlen alle SR und ein großer Teil des zweiten LR, Sub 3B fehlen ebenfalls die drei SR, aber nur ein kleinerer Teil des zweiten LR, Subklon 5 weist keines der LR auf. Sub 6 exprimiert alle SR und die LR, aber nicht die FIVAR-Domäne. (LR = *Large Repeat*, SR = *Small Repeat*; Abbildung nach Kommunikation mit C. Heilmann)

Den Subklonen 3A, 3B, 5 und 6 ist gemeinsam, dass sie alle DUF1542-Domänen besitzen und sich

Tabelle 4.10: Größe der von den *sasC*-Subklonen exprimierten Proteine

<i>sasC</i> -Subklon	[bp]	[kDa]
SasC	6560	238
Sub 1	2562	93
Sub 2	2606	96
Sub 3A	5013	183
Sub 3B	5379	196,6
Sub 5	5426	196
Sub 6	6347	230

nur im N-terminalen Bereich unterscheiden. So beinhaltet Subklon 3A (Sub 3A) die FIVAR-Domäne (N⁵⁹⁰ - D⁶⁴³) und einen Teil des zweiten LR (*Large Repeats*) von R⁵⁴³ - S⁵⁷¹. Subklon 3B (Sub 3B) besitzt ebenfalls die FIVAR-Domäne, aber einen größeren Teil des zweiten LR von E⁴⁴⁰ - S⁵⁷¹. In beiden Subklonen fehlen die drei SR (*Small Repeats*) und das komplette erste LR. Subklon 5 (Sub 5) hat alle drei SR von S⁷⁰ - N²⁶⁸, allerdings fehlen beide LR und die FIVAR-Domäne. Subklon 6 (Sub 6) besitzt alle drei SR und beide LR, aber nicht die FIVAR-Domäne. Durch die überlappende Konstruktion der Subklone sollte sichergestellt werden, dass keine Interaktion übersehen wird, indem möglicherweise ein dafür relevanter Abschnitt in den Grenzbereichen der Domänen abgeschnitten wurde. In Tabelle 4.5 sind die Größen der von den *sasC*-Subklonen exprimierten Proteine zusammengefasst. Das Gesamtprotein SasC hat ein Molekulargewicht von 238 kDa. Sub 1 und Sub 2 haben eine Größe von 93 bzw. 96 kDa, Sub 3A ist 183 kDa groß und Sub 3B 196,6 kDa. Sub 5 ist mit einem Molekulargewicht von 196 kDa nur geringfügig kleiner als Sub 3B. Sub 6 hat ein Molekulargewicht von 230 kDa, was aufgrund der fehlenden FIVAR-Domäne einen Größenunterschied von nur 8 kDa zum Gesamtprotein SasC ausmacht.

4.6.1 Expression von *sasC* und *sasC*-Subklonen in *S. carnosus* TM300, *S. aureus* 4074 und *S. aureus* SH1000

Um zu überprüfen, ob die SasC-Proteine richtiger Größe exprimiert werden, wurden Lysostaphinlysate der verschiedenen Staphylokokken-Stämme hergestellt, welche über eine SDS-PAGE analysiert wurden. Es wurde die Expression von *sasC* und *sasC*-Subklonen in *S. carnosus* TM300 (Abb. 4.43) und den *S. aureus*-Stämmen 4074 (Abb. 4.44 und 4.45) und SH1000 (Abb. 4.46) überprüft. Als Referenz diente der Subklon (pCXΔlip). Hier ist das Lipase-Gen in (pCX19) deletiert, welches in den anderen Subklonen durch das SasC-Fragment ersetzt wurde. In den Subklonen SH1000 SasC, Sub 1, Sub 2, Sub 3A, Sub 3B, Sub 5 und Sub 6 ist das Lipase-Gen durch SasC oder die verschiedenen SasC-Subklonfragmente ersetzt. In den Abb. 4.43 bis 4.46 ist unter A jeweils die SDS-PAGE der Lysostaphinlysate abgebildet, unter B der Western Blot, inkubiert mit anti-SasC-NT-Antiserum und unter C der Western Blot, welcher mit anti-SasC-DUF1542-Antiserum inkubiert wurden.

In *S. carnosus* TM300 werden Gesamt-SasC (238 kDa) und die Subklone 1 (93 kDa), 3A (183 kDa),

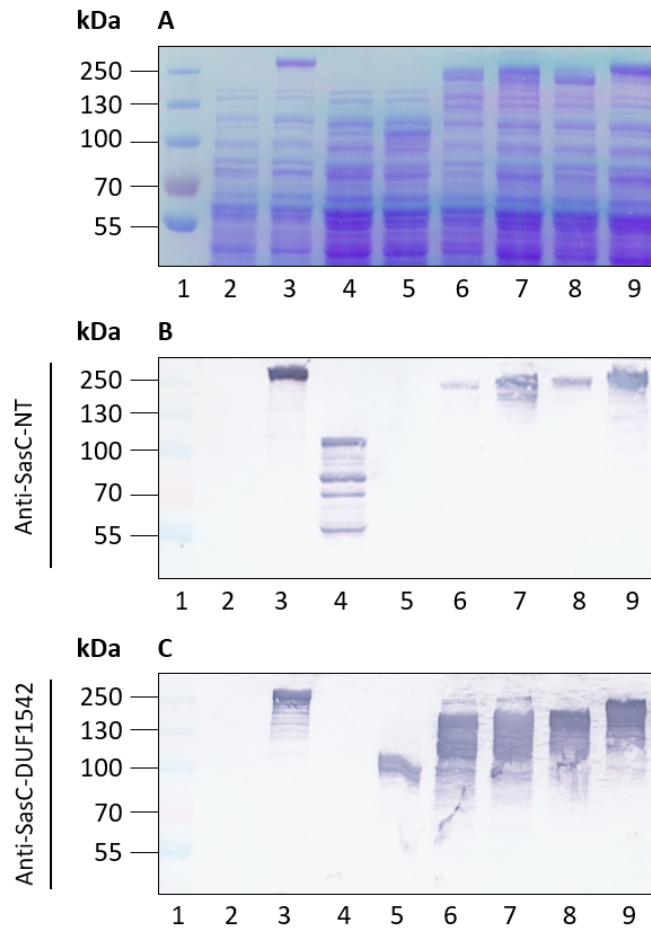


Abb. 4.43: Lysostaphinlysate der *sasC*-exprimierenden Subklone in *S. carnosus* TM300. **A** SDS-PAGE; **B** Western Blot mit anti-SasC-NT-Antiserum; **C** Western Blot mit anti-SasC-DUF1542-Antiserum. (1) Marker; (2) TM300 (pCX Δ lip); (3) TM300 (pSasC); (4) TM300 (pSub1); (5) TM300 (pSub2); (6) TM300 (pSub3A); (7) TM300 (pSub3B); (8) TM300 (pSub5); (9) TM300 (pSub6).

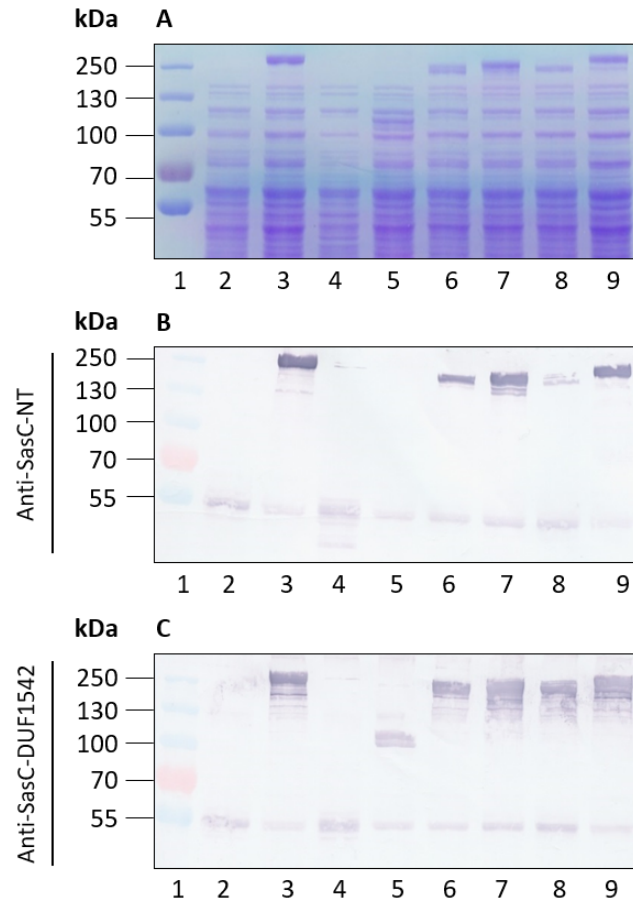


Abb. 4.44: **Lysostaphinlysate der *sasC*-exprimierenden-Subklone in *S. aureus* 4074. A SDS-PAGE; B Western Blot mit anti-SasC-NT-Antiserum; C Western Blot mit anti-SasC-DUF1542-Antiserum.** (1) Marker; (2) 4074 (pCX Δ lip); (3) 4074 (pSasC); (4) 4074 (pSub1); (5) 4074 (pSub2); (6) 4074 (pSub3A); (7) 4074 (pSub3B); (8) 4074 (pSub5); (9) 4074 (pSub6).

3B (196,6 kDa), 5 (196 kDa) und 6 (230 kDa) exprimiert und im Western Blot von dem anti-SasC-NT-Antiserum detektiert. Distinkte Banden, die mit der richtigen Größe korrelieren, sind zu erkennen. Bis auf Sub 1, welcher keine DUF1542-Domänen besitzt, werden alle Subklone und das Gesamt-SasC von dem anti-SasC-DUF-Antiserum detektiert. Sub 2 (96 kDa) wird nicht vom anti-SasC-NT-Antiserum detektiert, da er nur die DUF1542-Domänen 10-17 beinhaltet. Im Lysat von Sub 1 sind im Western Blot (Abb. 4.44, B) multiple Banden sichtbar, welche mutmaßlich aus abgebautem Protein bestehen. Beide Antiseren zeigen keine unspezifischen Reaktionen mit anderen Proteinen von *S. carnosus* TM300. In der ersten Spur ist das Lysat von TM300 (pCX Δ lip) aufgetragen. Dies ist der Leervektor und exprimiert kein *sasC* oder *sasC*-Subklon, so dass auch keine Reaktion mit einem der Antiseren stattfindet.

Auch in *S. aureus* 4074 werden Gesamt-SasC und *sasC*-Subklone richtiger Größe exprimiert (Abb. 4.44). Sub 1 (Abb. 4.45) wird nur sehr schwach exprimiert. Abbauprodukte wie bei TM300 (pSub1) sind

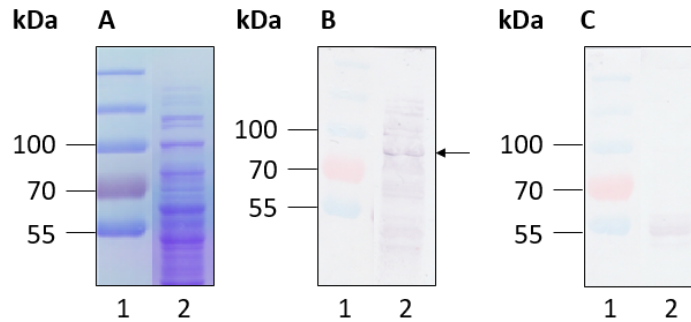


Abb. 4.45: **Lysostaphinlysat von *S. aureus* 4074 (pSub1)** **A SDS-PAGE.** **B Western Blot mit anti-SasC-NT-Antiserum.** **C Western Blot mit anti-SasC-DUF1542-Antiserum.** (1) Marker; (2) 4074 (pSub1).

nicht vorhanden. Beide Antiseren detektieren in allen Subklonen von 4074 ein Protein mit einer Größe von ca. 55 kDa, was mutmaßlich Protein A (SpA; UniProtKB; P38507) ist. Dieses Immunglobulin G-bindende Protein von *S. aureus* hat ein Molekulargewicht von 55,4 kDa und bindet die in den Antiseren enthaltenen Immunglobuline. Die putative Protein A-Bande ist ebenfalls in den Lysaten von *S. aureus* SH1000 (Abb. 4.46) vorhanden. In diesem Stamm weist Sub 1 erneut Banden mutmaßlicher Proteindegradation auf, reagiert jedoch erwartungsgemäß nicht mit dem anti-SasC-DUF-Antiserum, während Sub 2 nur von diesem detektiert wird. In den anderen Subklon-Lysaten werden Proteine der erwarteten Größe von beiden Antiseren detektiert. Nur im Lysat von SH1000 (pCX Δ lip) ist kein SasC oder SasC-Subklon enthalten.

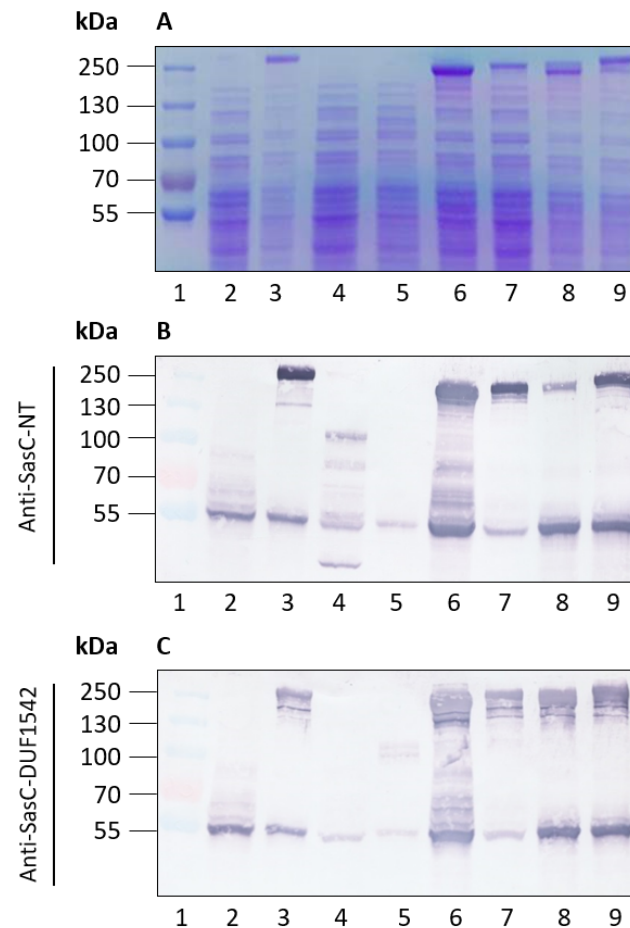


Abb. 4.46: Lysostaphinlysate der *sasC*-exprimierenden-Subklone in *S. aureus* SH1000. **A** SDS-PAGE. **B** Western Blot mit anti-SasC-NT-Antiserum. **C** Western Blot mit anti-SasC-DUF1542-Antiserum. (1) Marker; (2) SH1000 (pCX Δ lip); (3) SH1000 (pSasC); (4) SH1000 (pSub1); (5) SH1000 (pSub2); (6) SH1000 (pSub3A); (7) SH1000 (pSub3B); (8) SH1000 (pSub5); (9) SH1000 (pSub6).

Expression von *sasC*-Subklonen führt zu Aggregatbildung in *S. carnosus* TM300 und *S. aureus* SH1000

In Aggregationsassays konnte beobachtet werden, dass die Expression von *sasC*-Subklonen zur Bildung von Zellaggregaten in *S. carnosus* TM300 und *S. aureus* SH1000 in unterschiedlichem Ausmaß führt (Abb. 4.47). So führt Expression des vollständigen SasC-Proteins in beiden Stämmen zur Bildung von großen Zellaggregaten. Wie besonders in *S. carnosus* TM300 gut sichtbar, führt die Expression von (pSub1) zur Bildung von sehr großen Aggregaten, welche größer erscheinen als bei Expression von (pSasC). Bei Expression der Subklone (pSub3A), (pSub3B) sowie (pSub6) sind kleine Aggregate sichtbar. Expression von (pSub2) führt zu keinerlei Zellaggregation in *S. carnosus* TM300 oder *S. aureus* SH1000. Wird (pSub5) exprimiert, kommt es zu sehr schwacher Aggregation. Erwartungsgemäß zeigt, der mit dem Leervektor (pCX Δ lip) transformierte Stamm keine Zellaggregation. Insgesamt ist die Aggregatbildung der Subklone SasC und Sub 6 in SH1000 etwas schwächer als in TM300. Die Aggregate von Sub 3A und Sub 3B sind in SH1000 jedoch größer. In den Western Blots der Lysostaphinlysate der Stämme TM300 und SH1000 sind für Sub 1 multiple Banden sichtbar (Abb. 4.43; 4.46).

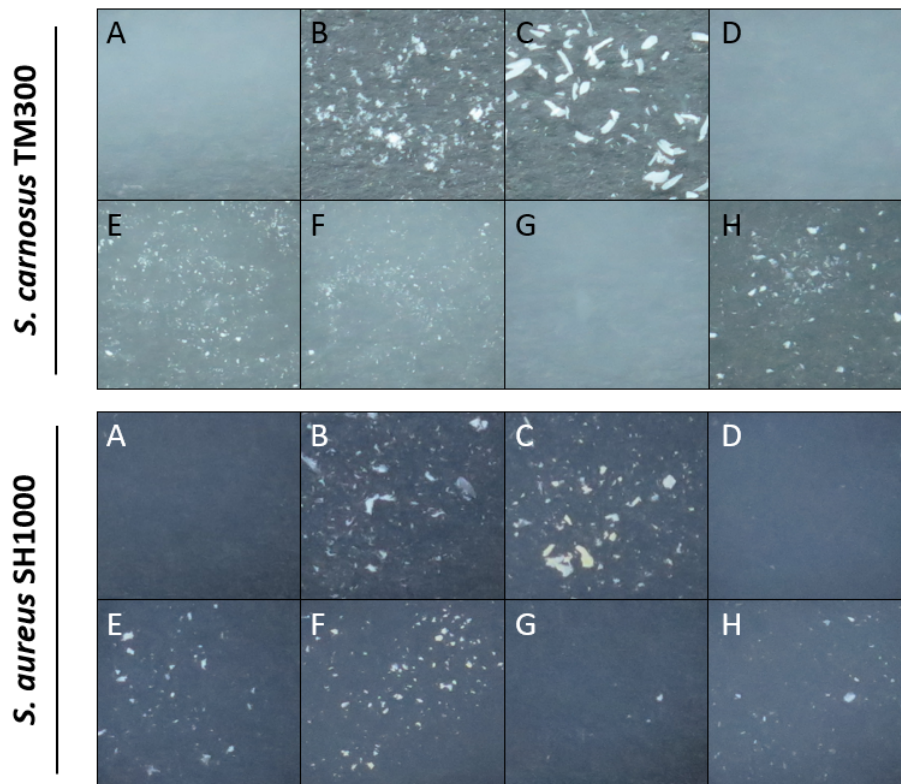


Abb. 4.47: Aggregation von *sasC*-exprimierenden *S. carnosus* TM300 und *S. aureus* SH1000. Oberes Panel: Aggregation von *sasC*-exprimierenden *S. carnosus* TM300. Unteres Panel: *sasC*-exprimierenden *S. aureus* SH1000. **A (pCXΔlip)**. Expression des Leervektors führt zu keinerlei Zellaggregation. **B (pSasC)**. Expression des Gesamtproteins führt zur Bildung von großen Zellaggregaten. **C (pSub1)**. Expression von (pSub1) führt zur Bildung von sehr großen Zellaggregaten. **D (pSub2)**. Es kann keine Aggregation beobachtet werden. **E (pSub3A)**. Sub 3A bildet kleine Zellaggregate. **F (pSub3B)**. Expression von (pSub3B) führt zu schwacher Aggregation. **G (pSub5)**. Bei Sub 5 können nur sehr kleine Aggregate beobachtet werden. **H (pSub6)**. Expression von (pSub6) führt zur Bildung von überwiegend kleinen Zellaggregaten.

Kompetitive Aggregationsassays mit anti-SasC-Antiseren und rekombinanten SasC-His-Fragmenten

Zugabe von anti-SasC-Antiseren oder rekombinanten SasC-His-Fragmenten beeinflusst das Aggregationsverhalten von *sasC*-exprimierenden TM300 und SH1000 nicht

Das Aggregationsverhalten von *sasC*-exprimierenden *S. carnosus* TM300 und *S. aureus* SH1000 wird nicht beeinflusst, wenn bakterielles Material (angezogen auf TSA, Cn10, 1% Xylose) in PBS, versetzt mit 1,5 μ M SasC-His-NT oder SasC-His-DUF1542, verschiedenen Konzentrationen von anti-SasC-NT-Antiserum (1:100; 1:1000; 1:10000) oder anti-SasC-DUF1542-Antiserum (1:100; 1:1000; 1:10000), resuspendiert wird.

In den Abbildungen 4.48 und 4.49 ist zu erkennen, dass bei Zugabe von anti-SasC-Antiserum oder rekombinantem SasC-His-Protein (pCX Δ lip)-exprimierende Stämme keine Aggregation zeigen und die starke Aggregation von (pSasC)- und (pSub1)-exprimierenden Stämmen nicht beeinflusst wird. Bei SH1000 Sub 2 ist in Anwesenheit von SasC-His-DUF1542 die Bildung von sehr feinen Zellaggregaten zu beobachten. Der Effekt war auch bei Wiederholung zu sehen, aber nicht bei TM300 Sub 2.

Wachstum auf anti-SasC-Antiseren verringert Aggregation von *S. aureus* SH1000

Sub 1 Um zu überprüfen, ob möglicherweise die Dauer der Exposition durch anti-SasC-Antiseren für einen Effekt auf das Aggregationsverhalten relevant ist, wurden *S. carnosus*- und *S. aureus* SH1000-Stämme auf TSA-Platten angezogen, auf welchen zuvor anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum aufgebracht wurde. In Abb. 4.50 ist zu sehen, dass nach Anzucht von *S. carnosus* TM300-Subklonen in Anwesenheit von anti-SasC-NT oder anti-SasC-DUF-Antiserum, keine Änderung der SasC-vermittelten Aggregation beobachtet werden konnte. Expression von (pSub1) führt zur Bildung von größeren Zellaggregaten als Expression von (pSasC). Expression des Leervektors und von (pSub2) führt zu keiner Aggregation unter den getesteten Bedingungen. Die Konzentration des Antiserums hatte keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten.

Werden *sasC*-exprimierende SH1000 auf Xyloseplatten angezogen, welche mit anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum präinkubiert wurden (Abb. 4.51), wird die Aggregation von Sub 1, bei Zugabe von anti-SasC-NT-Antiserum, stark beeinflusst. Die Zellaggregate waren viel kleiner als von Sub 1, der ausschließlich auf Xylose angezogen wurde. War anti-SasC-DUF-Antiserum vorhanden, so zeigte sich ein vergleichbarer Effekt. Die Zellaggregate sind ein wenig größer als solche, die sich bei Wachstum auf anti-SasC-NT-Antiserum bilden, doch wesentlich kleiner als die einer Kultur, die nur auf Xylose gewachsen ist. Der Effekt war für beide Subklone auch bei einer höheren Konzentration von Antiserum zu beobachten. Die Bildung und Form von Aggregaten von SH1000 SasC wurde nicht beeinflusst. Die Stämme SH1000 (pCX Δ lip) und Sub 2, welche unter Standardbedingungen keine Zellcluster ausbilden, wurden nicht beeinflusst. Der Versuch wurden für beide Stämme je einmal mit beiden Konzentrationen durchgeführt.

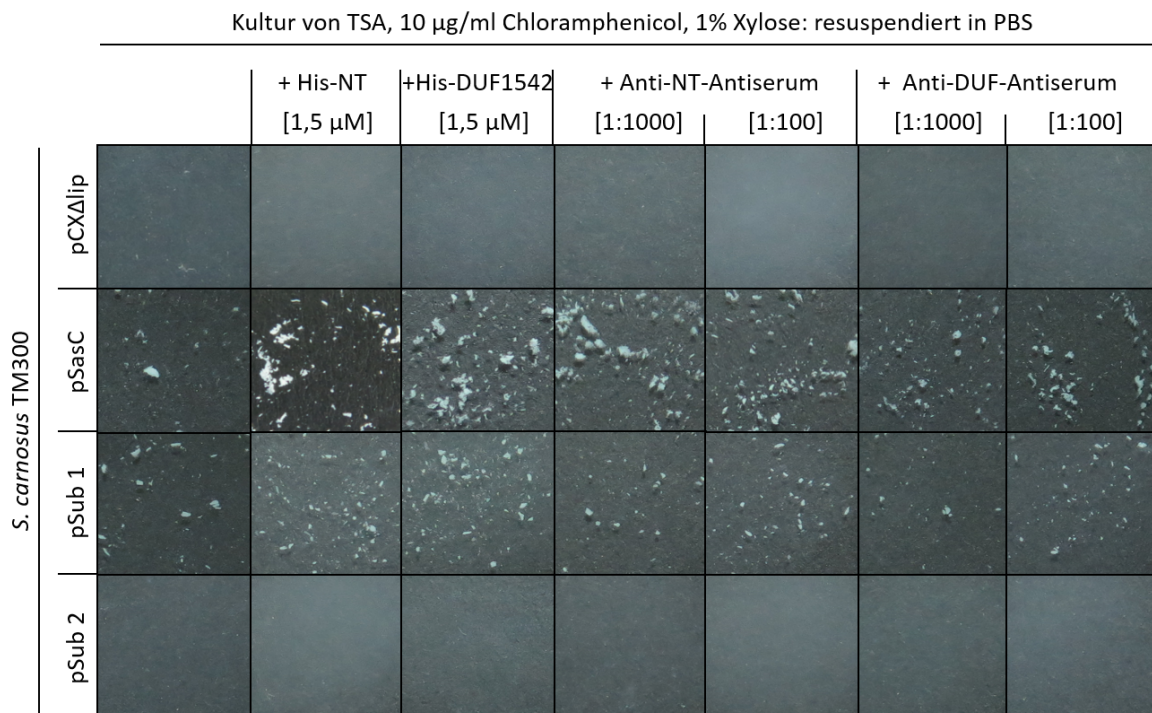


Abb. 4.48: **Aggregation von *sasC*-exprimierenden *S. carnosus* TM300 bei Inkubation mit anti-SasC-Antiseren oder rekombinanten oder SasC-His-Fragmenten.** Die Aggregation von TM300 (pCXΔlip; (pSasC); (pSub1) und (pSub2) wird durch Zugabe von anti-SasC-NT-Antiserum, anti-SasC-DUF1542-Antiserum oder SasC-His-NT bzw. SasC- His-DUF1542 nicht beeinflusst. Expression von (pSasC) und (pSub1) führt zur Bildung von großen Zellaggregaten, während Expression des Leervektors (pCXΔlip) oder von (pSub2) zu keiner Zellaggregation führt.

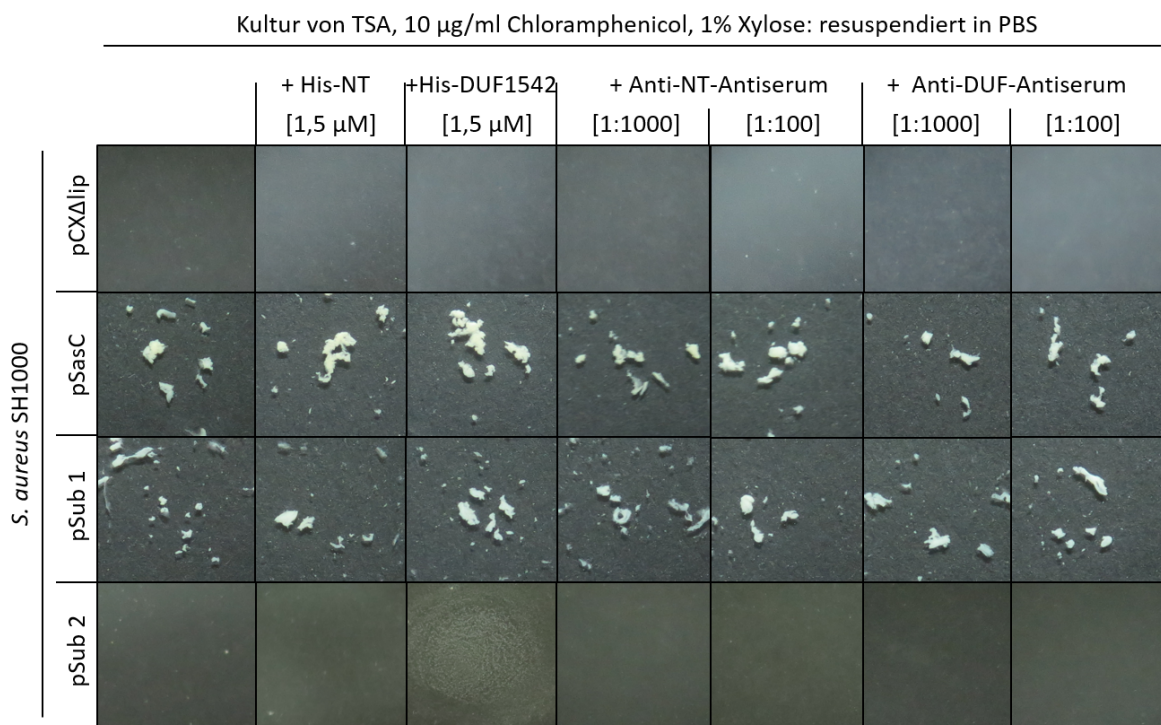


Abb. 4.49: **Kompetitiver Aggregationsassay von *sasC*-exprimierenden *S. aureus* SH1000 bei Inkubation mit anti-SasC-Antisera oder rekombinanten oder SasC-His-Fragmenten.** Die Aggregation von *S. aureus* SH1000 SasC und Sub 1 wird weder durch anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum noch durch SasC-His-NT oder SasC-His-DUF1542 beeinflusst. Bei Expression von (pSasC) und (pSub1) sind die typischen großen Zellaggregate klar zu erkennen. Expression von (pCXΔlip) führt zu keiner Aggregation. Sub 2 zeigte in Anwesenheit von 1,5 µM SasC-His-DUF1542 schwache Aggregatbildung. Unter allen anderen Bedingungen konnte kein solcher Effekt beobachtet werden.

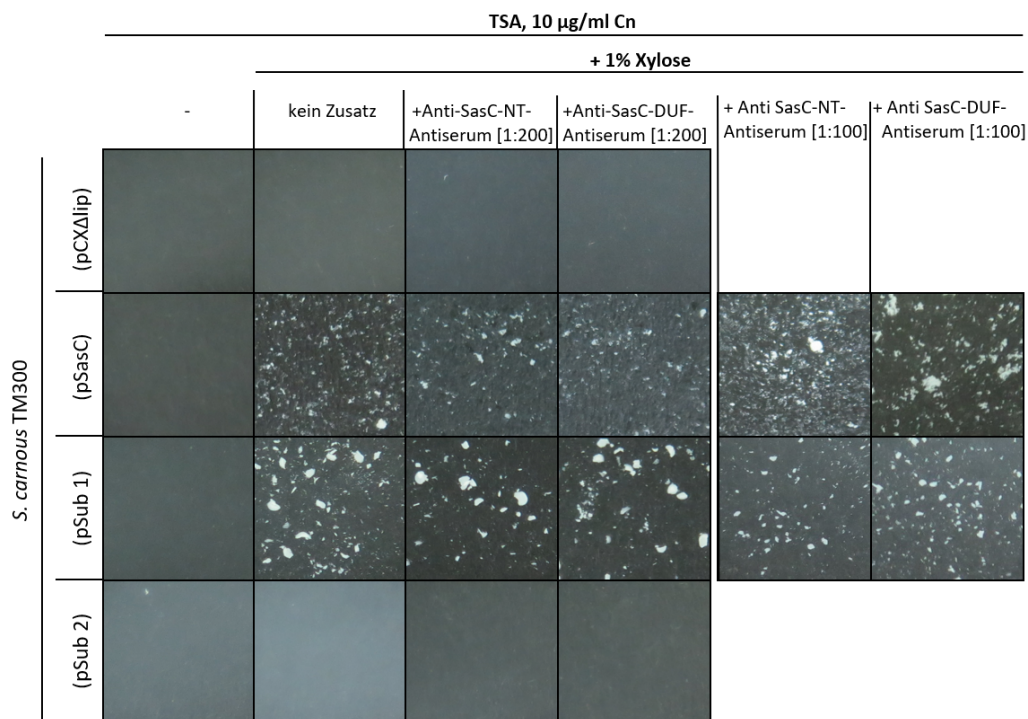


Abb. 4.50: **Kompetitiver Aggregationsassay von *sasC*-exprimierenden *S. carnosus* TM300 nach Wachstum auf anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum.** Wachstum von *S. carnosus* TM300 (pCXΔlip) und Sub 2 auf, mit anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum versetzten Agarplatten (+Cn10; +1% Xylose), führt zu keiner Änderung des Aggregationsverhaltens. Expression von (pSasC) und (pSub1) führt zur Bildung großer Zellaggregate. Bei den Subklonen (pCXΔlip) und Sub 2 konnte unter keiner Bedingung die Bildung von Zellaggregaten beobachtet werden.

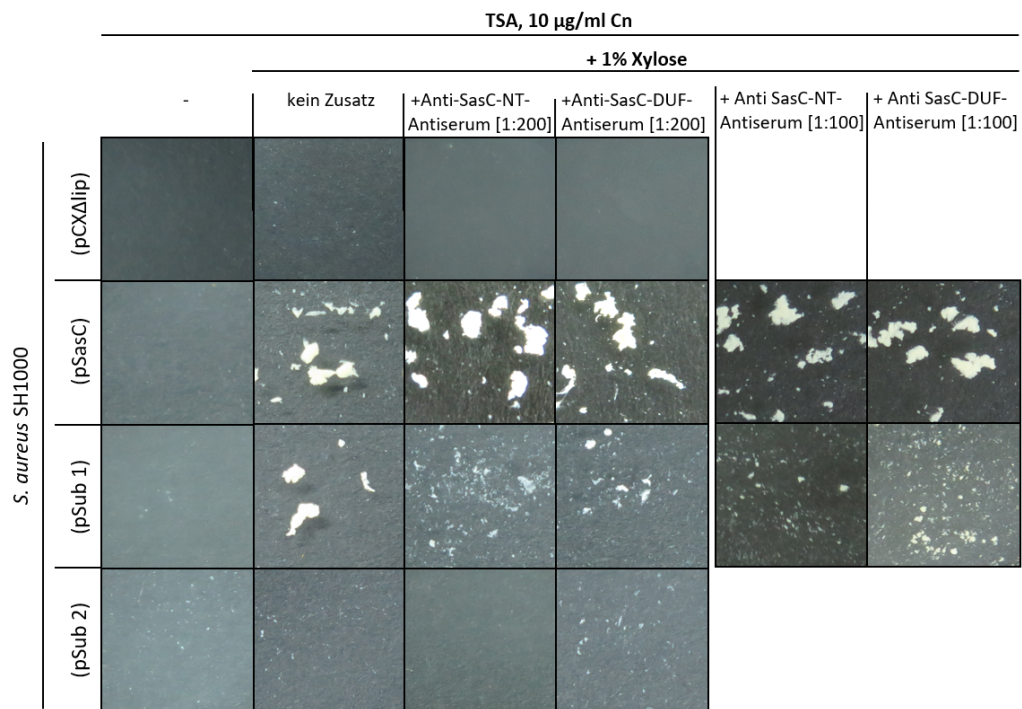


Abb. 4.51: **Kompetitiver Aggregationsassay von *sasC*-exprimierenden *S. aureus* SH1000 nach Wachstum auf anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF1542-Antiserum.** Wachstum von *S. aureus* SH1000 (pCXΔlip), SasC und Sub 2 auf, mit anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum versetzten Agarplatten, führt zu keiner Änderung des Aggregationsverhaltens. Die Aggregation von Sub 1 wird durch Inkubation mit anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum verringert.

4.6.2 Phänotypische Analysen der Biofilmbildung

Expression von *sasC*-Subklonen vermittelt Biofilmbildung in *S. aureus* SH1000

Mittels semi-quantitativer Biofilmassays wurde die Biofilmbildung der verschiedenen SasC-Subklone von *S. aureus* SH1000 gemessen. In Abb. 4.52 sind repräsentative Wells einer Mikrotiterplatte abgebildet und die grafische Auswertung dargestellt. *S. epidermidis* RP62A bildet einen homogen starken PIA-abhängigen Biofilm, welcher sich aufgrund seiner gleichmäßigen Intensität gut als Referenz eignet und nicht SasC-vermittelt ist. *S. carnosus* TM300 (pCX Δ lip) dient als Biofilm-Negativkontrolle, da dieser Stamm keinen Biofilm bildet. Dies ist aus Abbildung 4.52 gut ersichtlich. Panel A in Abb. 4.52 zeigt die Biofilmbildung von *S. aureus* SH1000 in der ersten Versuchsreihe, welche mit einem *plate reader* ausgewertet wurde. Panel B zeigt die zweite Versuchsreihe im Rahmen der Versuche zur kompetitiven Biofilmbildung, in welcher die Stärke der Biofilmbildung als Intensität in *arbitrary units* vom ChemiDocTM-System angegeben ist. Bei optischer Auswertung der Wells sind Unterschiede in der Intensität bei *S. carnosus* TM300 zu erkennen, welcher in Panel A intensiver wirkt. Im Vergleich ist der Biofilm von *S. aureus* SH1000 (pCX Δ lip) in Panel B stärker, was unerwartet ist.

Der Biofilm von Sub 2 erscheint in Panel B schwächer als der Biofilm der Negativkontrolle *S. aureus* SH1000 (pCX Δ lip). Zudem besitzt Sub 2 hier einen abweichenden Farbton. Warum die verschiedenen Wells innerhalb eines Assays in einer Mikrowellplatte unterschiedliche Färbtöne zeigen, ist unklar. Expression von (pSasC) führt zur Bildung von Biofilmstrukturen, welche auf intensive Zellaggregation zurückzuführen sind (siehe auch 4.53) und leicht während der Waschschriffe verloren gehen können. Sub 1, Sub 3A, Sub 3B, Sub 5 und Sub 6 bilden in beiden Versuchsreihen einen starken Biofilm aus. Optisch ist in Panel A Sub 6 schwächer als Sub 5, was aber in der grafischen Darstellung nicht wiedergegeben wird. Dieser Unterschied ist in Panel B nicht erkennbar.

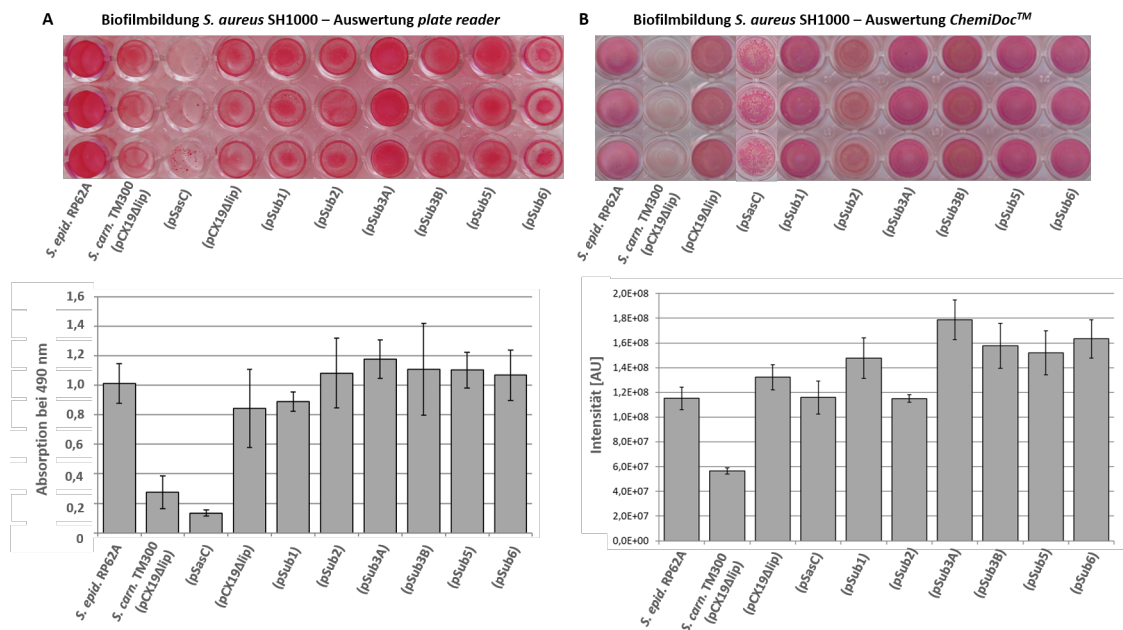


Abb. 4.52: **SasC-vermittelte Biofilmbildung in *S. aureus* SH1000.** **A Biofilmbildung mit *plate reader*-Auswertung.** Die Leervektorkontrolle *S. aureus* SH1000 (pCXΔlip), Sub 1, Sub 2 und Sub 6 bilden einen moderaten Biofilm. **B Biofilmbildung mit ChemiDoc™-Auswertung.** SH1000 (pCXΔlip) bildet einen sehr starken Biofilm, wie Sub 1, Sub 3A, Sub 3B, Sub 5 und Sub 6. Sub 2 bildet einen schwächeren Biofilm als alle anderen. In beiden Versuchsreihen zeigt Sub 3 A sehr starke Biofilmbildung. Expression von (p*SasC*) führt zu Bildung großer Zellaggregate, welche nur schlecht an die Oberfläche adhärieren. In den grafischen Darstellungen ist die Intensität der Biofilmfärbung aufgetragen. Darstellung von Mittelwerten aus 8 Wells aus $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.

Expression von (pSasC) führt zu starker Aggregation und schwacher Biofilmbildung

Durch die starke zelluläre Akkumulation bei Expression des Gesamtproteins SasC in *S. aureus* SH1000, gingen diese Aggregate beim Waschen des Biofilms verloren. Dies führte zu einer starken Verringerung der Biofilmbildung. In Abbildung 4.53 sind die Aggregate in Suspension, nach Abgießen des Mediums und nach der Färbung mit Safranin deutlich sichtbar. Sie haften nicht fest an der Oberfläche der Wells, weswegen der Biofilm im rechten Bild sehr unregelmäßig und verklumpt ist. Dies beeinträchtigt die Intensitätsmessung von (pSasC)-Biofilmen mit dem *microplate reader*. Aufgrund dieser Problematik wurden weitere Auswertungen mit *Image Lab* durchgeführt. Dadurch konnte die Unregelmäßigkeit der Biofilmintensitäten teilweise kompensiert werden. Die Intensität des Biofilms wird hier über die Gesamtfläche des Wells bestimmt.



Abb. 4.53: **Aggregation von (pSasC)-exprimierendem *S. aureus* SH1000.** Linkes Bild: Zellaggregate nach 24 h Wachstum in einer Mikrotiterplatte. Mittleres Bild: Nach Abgießen des Mediums vor dem Waschschrift. Rechtes Bild: gefärbter und getrockneter Biofilm. Die Aufnahmen wurden im Rahmen eines Biofilmassays gemacht.

Fibrinogen und Poly-L-Lysin beeinflussen die Biofilmbildung von *sasC*-exprimierenden *S. aureus* SH1000 auf Polystyrol

Trotz ausgeprägter interzellulärer Aggregation wurde bei SasC-exprimierenden SH1000 (pSasC) nur ein schwacher Biofilm gemessen, da die Aggregate bei der Versuchsdurchführung weggewaschen wurden.

Um die Stabilität des Biofilms zu verstärken, wurden die Wells der Mikrotiterplatte mit Fibrinogen oder Poly-L-Lysin beschichtet. Die Beschichtung sollte die Adhäsion der (pSasC)-exprimierenden Stämme an die Polystyroloberfläche verbessern, so dass die Aggregate resistenter gegenüber den Waschschrift werden. In Abbildung 4.54 ist zu erkennen, dass nur die Biofilmbildung von Sub 2 bei Beschichtung der Oberfläche mit Poly-L-Lysin deutlich verringert ist. Bei der Biofilmbildung der anderen Stämme konnte kein Unterschied beobachtet werden. Die Problematik der leicht abspülbaren Aggregate bei Expression von (pSasC) konnte mit diesem Ansatz nicht gelöst werden. Die Biofilmintensitäten (uncoated) sind die der Messung aus Abb. 4.52. Die grafische Auswertung erfolgte mittels *plate reader*.

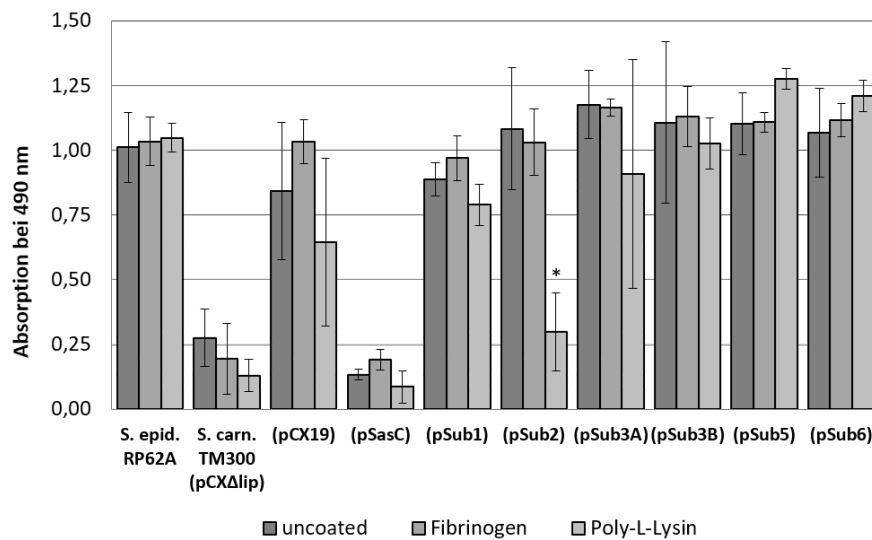


Abb. 4.54: **SasC-vermittelte Biofilmbildung von *sasC*-exprimierenden *S. aureus* SH1000 auf Fibrinogen- oder Poly-L-Lysin-beschichteten Oberflächen.** Grafische Darstellung der Biofilmin-tensitäten. Die Biofilmbildung von SH1000 Sub 2 ist auf Poly-L-Lysin stark verringert. Die Biofilmbildung der anderen Stämme wurde durch keine der beiden Substanzen beeinflusst. Darstellung von Mittelwer-ten aus je 8 Wells aus $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit "*/**/**" (p-Wert) gekennzeichnet.

Zugabe von anti-SasC-NT-Antiserum inhibiert SasC-abhängige Biofilmbildung in *S. aureus* SH1000

In Abb. 4.55 sind repräsentative Wells eines Biofilmassays abgebildet. Anti-SasC-NT-Antiserum wurde in Verdünnungen von 1:10000, 1:1000 oder 1:100 zu der Bakteriensuspension gegeben und mit dieser inkubiert. Als Kontrolle wurden Präimmunsereen eingesetzt. Als Biofilmkontrolle dient *S. epidermidis* RP62A, dessen Biofilmbildung unter allen hier getesteten Bedingungen unverändert stark bleibt. Die Rohdaten zeigen einen minimalen Unterschied von $1,16 \times 10^8$ AU (ohne Serumzugabe) zu $1,05 \times 10^8$ AU (anti-SasC-NT-Antiserum 1:100) oder $9,9 \times 10^7$ AU (Präimmunsereum 1:100), welcher nicht statistisch signifikant ist (siehe auch Abb. 4.56).

Der Biofilm von *S. aureus* SH1000 (pCXΔlip) wird durch die höchsten Konzentrationen beider Seren inhibiert. Expression von (pSasC) sollte erwartungsgemäß den stärksten Biofilm bilden, doch aufgrund der extrem starken Aggregation der Bakterien ist die Adhäsion der großen Zellaggregate geringer als bei vereinzelter Bakterien. Diese Aggregate wurden durch Waschen mit PBS weggespült, weswegen der Biofilm sehr schwach ausfällt.

Sub 1, der nur den N-Terminus von SasC exprimiert, bildet einen sehr starken Biofilm. Die Zugabe des Präimmunsereums in Verdünnungen von 1:10000 und 1:1000 hat keinen Effekt auf die Biofilmbildung. Antiserum in der niedrigsten Verdünnung führt jedoch zu einer schwachen Inhibierung der Biofilmbildung.

Beide Seren zeigen in höchster Konzentration einen stark inhibierenden Effekt. Auf die Biofilmbildung von Sub 2 haben beide Seren ab einer Verdünnung von 1:1000 einen sehr schwachen inhibierenden Effekt, der aber in der statistischen Auswertung nicht signifikant ist. Der sehr starke Biofilm von Sub 3A wird ebenfalls nur durch Zugabe der Seren in 1:100-Verdünnung beeinflusst. Der von Sub gebildete Biofilm wird durch Zugabe von Serum in der 1:100-Verdünnung vergleichbar stark inhibiert. Am deutlichsten ist der inhibierende Einfluss des anti-SasC-NT-Antiserums auf Sub 6 zu erkennen. Bereits bei einer Verdünnung von 1:1000 ist der Biofilm deutlich schwächer, während das Präimmunserum in dieser Konzentration keinen Effekt zeigt (siehe Abb. 4.56). Eingesetzt in einer 1:100-Verdünnung wird die Biofilmbildung durch das anti-SasC-NT-Antiserum vollständig inhibiert. Das Präimmunserum zeigt einen schwächeren inhibierenden Effekt.

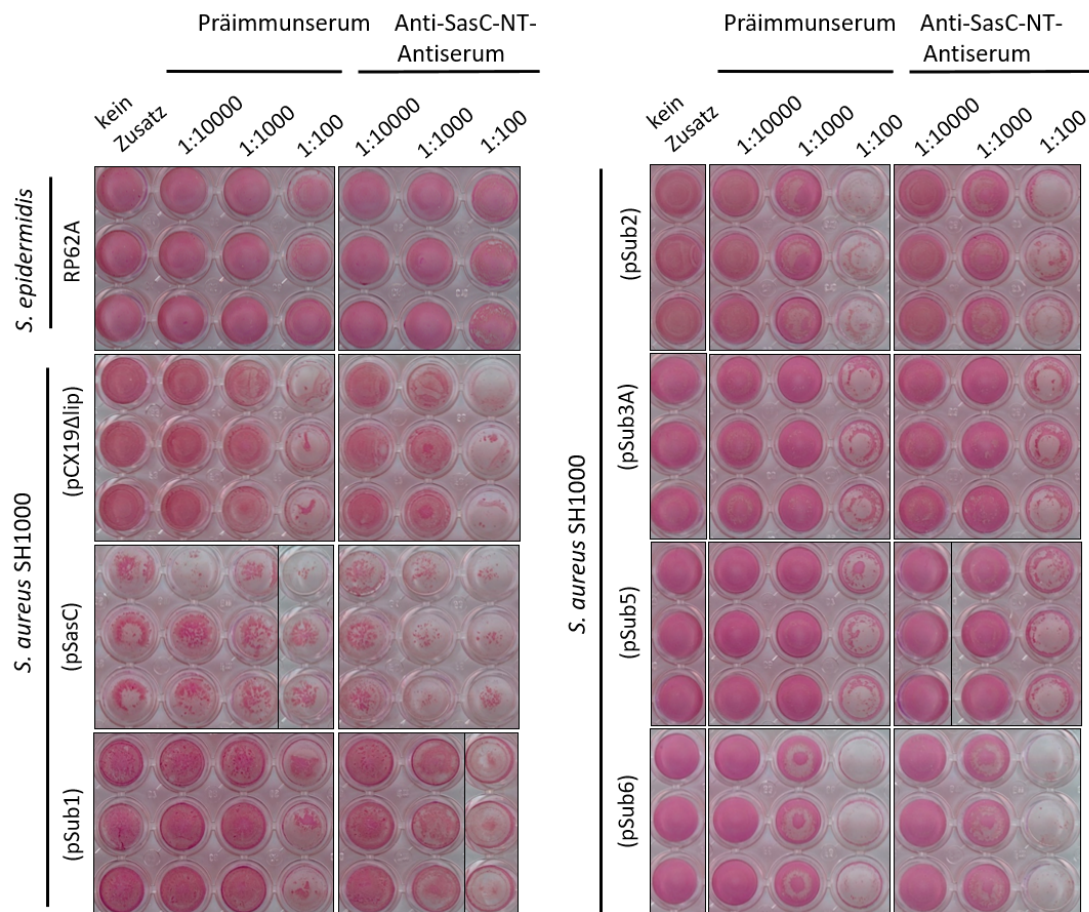


Abb. 4.55: **SasC-vermittelte Biofilmbildung in *S. aureus* SH1000 bei Zugabe von anti-SasC-NT-Antiserum.** Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* RP62A wird durch Zugabe von anti-SasC-NT-Antiserum oder Präimmunserum nicht beeinflusst. Bei den Subklonen Sub 1 und Sub 6 ist deutlich zu erkennen, dass bereits die höchste Verdünnung (1:10000) des anti-SasC-NT-Antiserums einen leicht inhibierenden Effekt auf die Biofilmbildung hat, aber nicht das Präimmunserum. Bei Expression von Gesamt-SasC und den Subklonen Sub 2, Sub 3A und Sub 5 hat Zugabe von Antiserum erst in höheren Konzentrationen einen inhibierenden Effekt auf die Biofilmbildung.

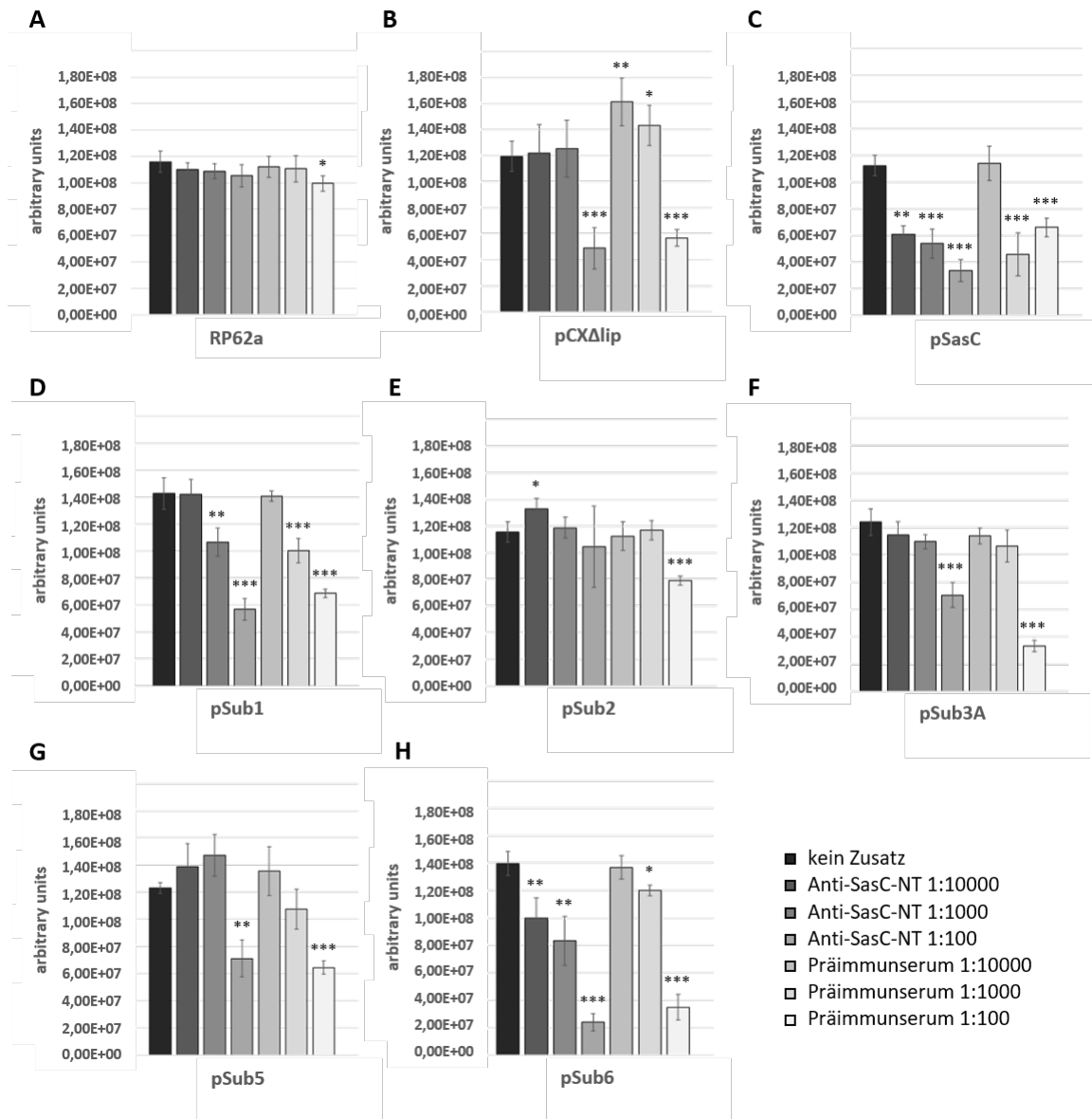


Abb. 4.56: Grafische Auswertung der Biofilm-Kompetitionsassays von *S. epidermidis* RP62A und *S. aureus* SH1000 SasC-Subklonen mit anti-SasC-NT-Antiserum. **A** *S. epidermidis* RP62A. Die Biofilmbildung von RP62A wird minimal durch hohe Konzentration von Serum beeinflusst. **B** SH1000 (pCXΔlip). Hohe Konzentrationen des Antiserums inhibieren die Biofilmbildung. **C** SH1000 (pSasC). Die niedrigste Konzentration des Antiserums führt bereits zu einer starken Reduktion der Biofilmbildung. **D** SH1000 (pSub1). Die Biofilmbildung wird durch mittlere Konzentrationen beider Seren inhibiert. **E** SH1000 (pSub2). Das Antiserum zeigt keinen Effekt. **F** SH1000 (pSub3A). Sub 3A reagiert sensibler auf das Präimmuneserum als auf das anti-SasC-NT-Antiserum. **G** SH1000 (pSub5). Nur hohe Konzentrationen des Antiserums zeigen einen inhibierenden Effekt. **H** SH1000 (pSub6). Bereits eine Verdünnung von 1:10000 des anti-NT-Antiserums führt zur Inhibierung der Biofilmbildung. Nicht alle Werte der quantitativen Auswertung sind optisch in den Wells zu erkennen. Darstellung von Mittelwerten von jeweils 8 Wells aus $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit "*/**/**" (p-Wert) gekennzeichnet.

Zugabe von rekombinantem SasC-His-DUF1542 inhibiert SasC-abhängige Biofilmbildung in *S. aureus* SH1000 SasC und Sub 1

In weiteren Wettbewerbsassays wurde rekombinantes SasC-His-NT oder SasC-His-DUF1542 zur Bakterien suspension gegeben. Als Kontrolle diente LEW-Puffer, um zu überprüfen ob eine Verdünnung der Zellsuspension zu einer Verringerung der Biofilmbildung führt. Die Werte der LEW-Kontrolle unterscheiden sich nicht von denen der Biofilme ohne Zusatz.

Abbildung 4.57 ist zu entnehmen, dass der SasC-unabhängige Biofilm von RP62A und der Biofilm von SH1000 Sub 2 durch Zugabe von rekombinanten Proteinen nicht beeinflusst wird. *S. carnosus* TM300 (pCX Δ lip) bildet keinen Biofilm. Zugabe von rekombinanten SasC-Proteinen verringert die Intensität gefärbter Strukturen in den Wells signifikant. Der unerwartet starke Biofilm von SH1000 (pCX Δ lip) (siehe auch 4.52, und der Biofilm bei Expression von (pSasC) oder (pSub1) wird durch Zugabe von SasC-His-DUF1542 stark reduziert.

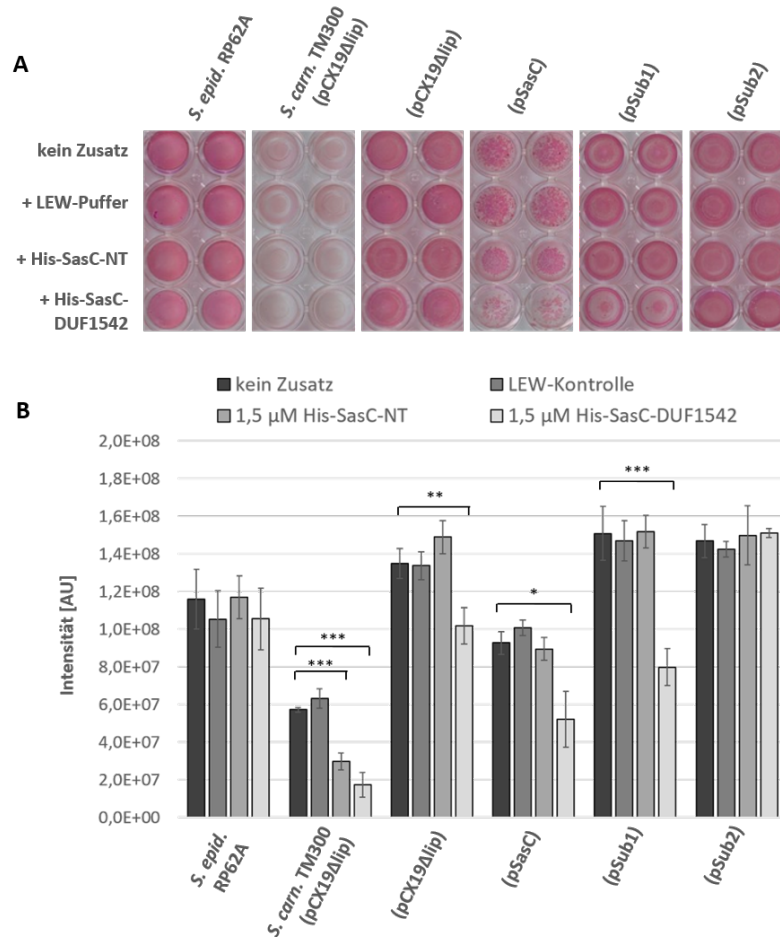


Abb. 4.57: **A Biofilm-Kompetitionsassays von *sasC*-exprimierenden *S. aureus*-Stämmen bei Zugabe von rekombinanten SasC-His-NT oder SasC-His-DUF542. A Biofilmbildung auf Polystyrol.** SasC-His-NT und SasC-His-DUF1542 beeinflussen die Biofilmbildung von *S. epidermidis* RP62A und *S. aureus* SH1000 (pSub2) nicht. Beide haben einen inhibierenden Effekt auf *S. carnosus* TM300 (pCXΔlip). SasC-His-NT hat keinen Effekt, doch SasC-His-DUF1542 zeigt bei SH1000 (pSasC), (pCXΔlip) und (pSub1) einen inhibierenden Effekt. **B Grafische Auswertung.** Darstellung von Mittelwerten aus 4 Wells aus $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit */**/***(p-Wert) gekennzeichnet. Die Biofilmbildung wurde mittels ChemiDoc™ ausgewertet.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das an der Biofilmbildung beteiligte Oberflächenprotein SasC von *S. aureus* genauer charakterisiert. Dieses ist an der interzellulären Akkumulation während der Biofilmbildung beteiligt. Die funktionsvermittelnde(n) Domäne(n) konnte(n) bereits in früheren Arbeiten im N-terminalen Bereich lokalisiert werden [128]. Mit Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden die N-terminalen Subdomänen *in vitro* und *in vivo* auf homotypische und heterotypische Interaktionen untersucht. Für *in vitro*-Interaktionsstudien konnten die N-terminalen Subdomänen rekombinant exprimiert und mittels Affinitätschromatographie nativ gereinigt werden. Für die *in vivo*-Studien wurden verschiedene *sasC*-epximierende *S. aureus*- und *E. coli*-Stämme verwendet.

Strukturelle Analyse SasC wird von Foster *et al.* als strukturell uncharakterisiert klassifiziert [59]. Doch es weist typische Merkmale anderer Oberflächenproteine Gram-positiver Bakterien auf. Ein LPXTG-Motiv für die kovalente Verankerung in der Zellwand, eine funktionsvermittelnde N-terminale Domäne, eine Anzahl von Repeats und einem N-terminalen Sortiersignal mit einem YSIRK-Motiv für den Transport durch die Zellwand. Bioinformatische Analysen haben innerhalb der N-terminalen Region von SasC drei kleine (SR), zwei große Repeats (LR) und eine FIVAR-Domäne identifiziert. Weiterhin besteht SasC aus 17 DUF1542-Domänen. Oberflächliche strukturelle Ähnlichkeiten der DUF1542-Domänen mit beispielsweise den B-Repeats von Aap/SasG können durch Sequenzhomologien aber nicht bestätigt werden [128]. Eine große Gruppe von Oberflächenproteinen bildet die MSCRAMM-Proteinfamilie. Die Mitglieder dieser Familie sind über einen gemeinsamen Liganden-Bindemechanismus („*dock-lock-latch*“-Mechanismus) charakterisiert, der von *IgG-like-folded* Subdomänen der sog. A-Region dieser Proteine vermittelt wird [59]. Die bioinformatische Analyse mittels des strukturvorhersagenden Programms ANTHEPROT offenbarte keine Abfolge von β -Faltblättern, welche eine Struktur wie einen *IgG-like-fold* zur Folge hätten. Den größten Anteil stellen mit 56,13 % *random coils* dar, welchen keine eindeutige Sekundärstruktur zugeordnet wird (Anhang A1.3.). Auch fehlt SasC die Konsensussequenz TYTFTDYVD, die bisher bei allen Mitgliedern der MSCRAMM-Proteinfamilie nachgewiesen wurde [59, 75, 96]. So kann SasC noch keiner der beschriebenen Familien von Oberflächenproteinen zugeordnet werden.

Expression N-terminaler Subdomänen In den Expressionstests zur Detektion der in dieser Arbeit neu konstruierten nicht-überlappenden N-terminalen Subdomänen konnte keines als His-Fusionprotein nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung des für die Ligationen verwendeten Vektors (pQE30Xa) offenbarte eine Deletion im Bereich des *lac*-Operators direkt nach der Promotorregion. Doch auch nach

erneuter Klonierung und Bestätigung der Sequenz wurde kein Fusionsprotein im Western Blot mittels anti-His-Antikörper detektiert. Dass die neu klonierten Fragmente exprimiert werden, haben die Expressionstests im Rahmen der BACTH-Experimente gezeigt. Hier wurden diese SasC-Fusionsproteine detektiert - wenn auch nicht über einen His-tag, sondern über anfusionierte Proteinuntereinheiten des Enzyms zyklischen Adenylatcyclase.

Für *in vitro*-Interaktionsstudien wurden die SasC-Fusionsproteine aus Abb. 4.2 verwendet.

Reinigung und Größenbestimmung rekomanter SasC-Fragmente Die mittels SDS-PAGE bestimmten Größen der gereinigten rekombinanten Proteine SasC-His-NT, SasC-His-DUF1542 und SasC-His-1 weichen teilweise von den theoretischen Molekulargewichten von 66 kDa für SasC-His-NT (bestimmt: 100 kDa), 67 kDa für SasC-His-DUF1542 (bestimmt: 90 kDa) und 18,23 kDa für SasC-His-1 (bestimmt: 36 kDa) ab. Unterschiede zwischen bestimmten und theoretischen Molekulargewichten können darauf zurückzuführen sein, dass die Erhitzung der Proben vor dem Auftragen nicht ausreichend war, um eine vollständige Denaturierung zu erreichen. Aggregation der Proteine [170] oder auch die Aminosäurezusammensetzung an sich kann zu einem unerwarteten Laufverhalten führen. Die Größe von SasC-His-1 auf der SDS-PAGE weist darauf hin, dass das Protein als Dimer vorliegt. Dies konnte mittels SEC nicht bestätigt werden, doch zeigen die AFM-Aufnahmen verschiedene Proteingrößen. Ein unerwartetes Migrationsverhalten während der SDS-PAGE kann durch posttranslationale Modifizierungen [221] oder einen hohen Anteil an hydrophilen Resten verursacht werden [67]. Speziell konnte dies für rekombinante Abschnitte der A-Region einiger MSCRAMM-Proteine beobachtet werden [88, 96, 99]. Liegen Proteine beispielsweise als Homodimere oder Homomultimere mit identischen Molekulargewichten vor, so wird die Quartärstruktur unter den reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE aufgebrochen und man erhält eine einzige Monomerbande. Bei einer nativen PAGE bleiben die Disulfidbrücken intakt und das Molekulargewicht des fraglichen Homodimers oder Homomultimers kann bestimmt werden. Unter den hier getesteten Bedingungen konnten die Proteine mittels nativer PAGE nicht getrennt werden. Auf diesem Weg konnte auch keine Größenbestimmung durchgeführt werden, da die Proteine nicht über das Gel aufgetrennt wurden, sondern am oberen Rand verblieben.

Banden anderer *E. coli*-Proteine kontaminierten teilweise die Elutionsfraktionen, so dass die Wasch- und Elutionsbedingungen durch Zugabe von Detergenzien und/oder Änderung des pH-Wertes optimiert werden mussten. Bei ca. 40 kDa ist in der SDS-PAGE oftmals eine schwache Bande zu erkennen, welche durch Waschstufen nicht entfernt werden konnte. Eine Bande vergleichbarer Größe wurde in der AG Heilmann bereits zuvor massenspektrometrisch analysiert und als *E. coli* Lactose-Operon-Repressor-Protein LacI identifiziert. Dieses DNA-bindende Protein besitzt ein Molekulargewicht von 38,59 kDa (UniProtKB; P03023; pers. Kommunikation). Wiederholt bei 60 kDa und 70 kDa auftretende Banden sind mutmaßliche Wirtsproteine von *E. coli*, die nicht vollständig entfernt werden konnten. Vergleichbare Banden wurden bereits zuvor in der AG Heilmann massenspektrometrisch als *E. coli* Chaperonin GroL (60 kDa; UniProt P0A6F5) und DnaK-Chaperon (70 kDa, UniProt P0A6Y8) identifiziert. Weitere Banden, die nicht mit

Massenspektrometrie analysiert wurden, stellen möglicherweise weitere *E. coli*-Wirtsproteine oder auch Abbauprodukte der SasC-Proteine dar.

Protein-Protein-Interaktionsstudien *in vitro* mit rekombinanten SasC-Fragmenten

Die Untersuchung der SasC-vermittelten zellulären Akkumulation auf homotypische oder heterotypische Interaktionen erfolgte über Western Liganden-Blots, *crosslinking*-Experimente mit BS³, BIAcore-Analysen, Rasterkraftmikroskopie und MicroScale Thermophorese-Experimenten. Obwohl homotypische Protein-Interaktionen mit vergleichbaren *in vitro*-Interaktionsstudien bereits für die Oberflächenproteine IsdC [222], SasG [116] und SdrC [218] erfolgreich charakterisiert wurden, führten die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen.

Gut zu erkennen ist diese Widersprüchlichkeit bei SasC-His-1. Mit SasC-His-1 werden zwei der drei kleinen Repeats (SR) rekombinant exprimiert. Es läuft als mutmaßliches Homodimer auf einer SDS-PAGE und zeigt in den Interaktionsstudien mit BS³ eine zinkunabhängige homotypische Interaktion. In Western Liganden-Blots wird nur in Anwesenheit von Zink eine starke Interaktion von SasC-His-1 mit sich selbst beobachtet. In rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen und in der SEC konnten keine monomere oder dimere Form von SasC-His-1 nachgewiesen werden. Die Bildung von Oligo- und Multimeren (in AFM und SEC) lässt allerdings eine Beteiligung der SR an der Vermittlung der Aggregation vermuten. Die BIAcore-Daten zeigen eine starke kovalent stabile Interaktion von SasC-His-1 mit sich selbst als auch mit SasC-His-NT. Über MicroScale Thermophorese wurde ein K_d -Werte für eine homotypische Interaktion von SasC-His-1 mit $1,1 \times 10^{-6}$ M bestimmt. Für eine Interaktion von SasC-His-1 mit SasC-His-NT wurde ein theoretischer K_d -Wert von $0,55 \times 10^{-6}$ M ermittelt, was dafür spricht, dass eine weitere Subdomäne die Bindeaffinität der beiden Interaktionspartner erhöht. Die Bindung der Ligandenbindedomäne N2N3 von SdrC, einem Mitglied der MSCRAMM-Proteinfamilie, an seinen Liganden β -Neurexin weist einen K_d -Wert von $2,5 \pm 0,5 \times 10^{-7}$ M auf, was einer hochaffinen Bindung entspricht [74]. Im Vergleich dazu hat die Bindung von ClfA mit Fibrinogen einen K_d -Wert von $0,51 \pm 0,19 \times 10^{-6}$ M [89] und Bindung von Biotin an Avidin einen K_d -Wert von 10^{-15} M [223]. SasC-His-1 besteht aus zwei SR, die, trotz fehlender Sequenzhomologie, in ihrer Funktion möglicherweise den Subdomänen N1, N2, N3 anderer Oberflächenproteine (z. B. SdrC) oder der A-Domäne von SasG ähneln und zwei potentielle Ligandenbindestellen darstellen. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die von SasC-His-1 exprimierten zwei SR mit sich selbst interagieren, aber innerhalb des N-Terminus noch einen weiteren Interaktionspartner haben. Dies könnten die LR sein, da die MST-Versuche auch auf eine Interaktion, genauer eine kooperative Bindung, von SasC-His-1 mit SasC-His-4 hinweisen.

SasC-His-3 enthält die FIVAR-Domäne, ein komplettes LR und einen Teil des zweiten LR. Es hat ein Molekulargewicht von 25,23 kDa. Obwohl in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen neben SasC-His-3-Monomeren auch dimere und oligomere Partikel zu erkennen waren, konnten mittels BIAcore-Analysen und Western Liganden-Blots keinerlei Interaktionen von SasC-His-3 mit sich selbst oder mit anderen SasC-His-Proteinen nachgewiesen werden. Möglicherweise haben Gefrier-Auftau-Zyklen oder zu lange La-

gerung bei Raumtemperatur vor der AFM-Messung zu Proteinaggregation geführt. Der theoretische K_d -Wert für eine heterotypische Interaktion von SasC-His-1 mit SasC-His-3 wurde in den SPR-Experimenten mit $2,2 \times 10^{-6}$ M berechnet, womit die Bindeaffinität dieser Partner sehr viel niedriger ist, als die von SasC-His-1 und SasC-His-NT. In den BS^3 -*crosslinking*-Versuchen wurde SasC-His-3-Dimerbildung beobachtet, jedoch stabilisiert dieses chemische irreversible *crosslinking* auch schwache oder transiente Interaktionen, die in einer SPR-Analyse nicht nachweisbar wären. Auf der anderen Seite geschieht eine SPR-Analyse nur über wenige Minuten, wobei Reaktionen (Interaktionen) mit langsamer Kinetik nicht erfasst werden würden. Die Subklone 3A und 3B, die zum Teil dieselben Subdomänen wie SasC-His-3 exprimieren, zeigen starke Aggregation und bilden einen starken Biofilm, was die Annahme unterstützt, dass die LR und/oder die FIVAR-Domäne zur Interaktion beitragen.

Teile beider LR werden von SasC-His-4 exprimiert. Einige Ergebnisse der *in vitro*-Interaktionsstudien weisen darauf hin, dass die LR ebenfalls an der SasC-vermittelten Akkumulation beteiligt sind. Es konnten Dimere und Multimere mittels BS^3 -*crosslinking* und Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden. Dass in der SEC kein Monomer eluierte, liegt möglicherweise daran, dass das Protein entweder vorher im Puffer aggregierte oder weil es im nativen Zustand in verschiedenen homo-oligomeren Formen vorliegt. Dies würde auch erklären, warum SasC-His-4 in der nativen PAGE als „Schmier“ im oberen Bereich des Gels zu finden ist. Die Diskrepanz, dass dagegen in der SDS-PAGE nur SasC-His-Monomere detektiert wurden, würde dann darauf zurückzuführen sein, dass nicht-kovalente Bindungen der Homooligomere durch das Detergenz SDS aufgebrochen werden. Die Interaktionen der Monomere sind zudem möglicherweise nur sehr schwach und würden von BS^3 stabilisiert werden. Ein Indiz auf eine heterotypische Interaktion von SasC-His-4 mit SasC-His-1 lieferte die MST-Analyse, die auf eine positive kooperative Bindung zwischen SasC-His-4 und SasC-His-1 hinweist. Der hier ermittelte Hill-Koeffizient beschreibt, dass bei einer Sättigung von 50 % der verfügbaren Bindestellen durchschnittlich 1,6 SasC-His-4-Moleküle an ein SasC-His-1-Molekül binden. Kooperativität bei Makromolekülen mit zwei oder mehr Bindestellen bedeutet, dass die Affinität einer Bindestelle für den Liganden durch die Ligandenbindung der anderen Bindestellen beeinflusst wird [220] und ist beispielsweise für die Bindung von Sauerstoffmolekülen an Hämoglobin besonders gut untersucht [224, 225]. Eine Untersuchung der homotypischen Interaktion von SasC-His-4 mittels MST könnte weitere Informationen liefern. Dies konnte jedoch im Rahmen der zeitlich begrenzten Gerätedemonstration nicht durchgeführt werden.

Bei SasC-His-DUF1542 konnte bei Behandlung mit BS^3 eine Multimerbildung und in den Western Liganden-Blots Interaktion mit allen getesteten SasC-His-Proteinen beobachtet werden. Da die Interaktionen der DUF1542-Domänen in den Western Liganden-Blots nur zinkabhängig auftraten bzw. verstärkt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass diese als Artefakte zu betrachten sind und kein zuverlässiger Hinweis auf eine spezifische Interaktion sind. Dagegen spricht, dass SasC-His-DUF1542 in den *crosslinking*-Experimenten Multimerbildung zeigte, während das als Kontrolle verwendete Protein DHFR bei Zugabe von BS^3 nicht mit sich selbst interagierte. Bei den Banden bei 50 kDa handelt es sich vielleicht um Abbauprodukte von SasC-His-DUF1542. Auch die AFM-Aufnahmen weisen auf eine Multimerbildung

der DUF1542-Domänen hin, wodurch eine Beteiligung der DUF1542-Domänen an der SasC-vermittelten zellulären Aggregation nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. In den kompetitiven Aggregationsassays waren sehr kleine Zellaggregate zu erkennen, wenn *S. aureus* SH1000 Sub 2 mit rekombinantem SasC-His-DUF1542 in PBS resuspendiert wurde. Sub 2 exprimiert nur einige der DUF1542-Domänen. Eine Interaktion der DUF1542-Domänen mit einem der anderen SasC-His-Proteine konnte weder mittels SPR, noch mit MST bestätigt werden. Die Ergebnisse von Schröder *et al.* zeigen deutlich, dass die DUF1542-Domänen, zumindest nicht alleine, die SasC-abhängige Zellaggregation vermitteln können [128], aber da es sich bei den Versuchen von Schröder *et al.* um einen völlig anderen Ansatzpunkt bei der Untersuchung handelt, sind abweichende Ergebnisse zwar unerwartet, aber dennoch möglich. Es sollte berücksichtigt werden, dass DUF-Domänen auch in essentiellen Proteinen (auch in *S. aureus*) nachgewiesen wurden [226]. In der Pfam-Datenbank sind ca. 3600 sog. DUF-Domänen hinterlegt, deren Funktion noch unbekannt ist [227, 228]. Auch sind DUF1542-Domänen in Embp zu finden, wo sie längliche starre Strukturen ausbilden [129].

SasC-His-2 ließ sich nur in geringen Mengen reinigen. Das Fragment enthält das dritte SR, das gesamte erste LR und einen Teil der zweiten LR. SasC-His-3 und SasC-His-4 überlappen zwar partiell mit SasC-His-2, können aber die Kombination aus SR und LR nicht wiedergeben. In den Western Liganden-Blots war vermutlich aufgrund einer zu niedrigen Konzentration des immobilisierten SasC-His-2 keine Interaktion zu beobachten.

Die von SasC-His-5 exprimierte FIVAR-Domäne konnte nicht in ausreichender Reinheit und Menge isoliert werden. Einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieser Domäne an der SasC-vermittelten Aggregation liefern die Ergebnisse der Aggregations- und Biofilmassays von Sub 6, der das Gesamtprotein mit Ausnahme der FIVAR-Domäne exprimiert und zu stark reduzierter Aggregation und verringerter Biofilmbildung führt. Dies weist auf eine starke Beteiligung dieser Domäne hin. Neben der mutmaßlichen zuckerbindenden Funktion der FIVAR-Domäne haben Christner *et al.* zeigen können, dass in dem membrandurchspannenden Protein Embp die FIVAR-Domäne die Bindung an immobilisiertes Fibronectin vermittelt [129]. Aus diesem Grund wäre eine potentielle Interaktion von SasC mit Fibronectin und Polysaccharidmolekülen (z. B. PIA) noch zu untersuchen.

Die Auswertung der Western Liganden-Blots erfolgte rein qualitativ. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schwankte zudem stark (siehe 4.4). Durch die Subjektivität bei der Beurteilung der Intensität der Farbreaktion und der Stärke des Hintergrundes (unspezifische Färbung der Membran durch lange Inkubation) war eine Unterscheidung zwischen einem schwachen und keinem Signal oft nicht eindeutig, was ein Grund für die Unterschiede der Ergebnisse der einzelnen Versuche ist. Für immobilisiertes SasC-His-NT kann zudem ein sehr schwaches Signal auch aus der unspezifischen Erkennung von SasC-His-NT durch Streptavidin resultieren (4.13). Auch zeigt insbesondere immobilisiertes SasC-His-4 eine Reaktion mit allen Liganden; interagiert selber aber nicht mit allen Partnern, wenn biotinyliert hinzugegeben. Dies erschwert eine eindeutige Aussage über die Ergebnisse der Liganden-Blots. Zur Identifizierung unspezifischer Effekte sollten weitere Kontrollexperimente durchgeführt werden; wie ein Western

Liganden-Blot ohne Zugabe des primären „Antikörpers“, sprich des biotinylierten Proteins, um die Stärke des Hintergrundsignals auf der Membran besser einschätzen zu können. Auch Versuche mit Zugabe von nicht-biotinylierten Proteinen können weitere Hinweise geben. Dass die kovalente Kopplung von Biotin einen unspezifischen Effekt hervorruft ist unwahrscheinlich, da Biotin ein sehr kleines Molekül ist, dessen Einsatz und Funktionalität gut dokumentiert ist.

Ein möglicher Grund, dass die BS³-Versuche auf der einen und die AFM-, SPR- und MST-Versuche auf der anderen Seite, teilweise widersprüchliche Resultate liefern, ist, dass bei einem irreversiblen chemischen *crosslinking* auch schwache oder transiente Bindungen stabilisiert werden. Diese wären dann in einer SPR-Analyse nicht nachweisbar, da die Affinität zu niedrig ist. Schwache homotypische Interaktionen sind beispielsweise von den N2N3-Subdomänen von SdrC bekannt [229]. Für eine zuverlässige Aussage sollten die MST-, AFM- und BIAcore-Analysen wiederholt werden.

Eine zinkabhängige Interaktion konnte mit den hier verwendeten Methoden für keine der rekombinanten SasC-Subdomänen eindeutig nachgewiesen werden. So führte BS³-*crosslinking* in Anwesenheit von 10 mM Zink zu keiner Änderung der Bandenmuster (im Vergleich zu alleiniger BS³-Zugabe). Dass dies auf eine zu hohe Zinkkonzentration (hier 10 mM) zurückzuführen ist, ist eher unwahrscheinlich, da Geoghegan *et al.* für *in vitro*-Interaktionsstudien zur Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens der B-Domänen von SasG mittels SPR ebenfalls 10 mM Zink einsetzen. Für *in vivo*-Biofilminhibierungsassays verwendete die Gruppe dagegen nur 40 µM [116]. Die Ionenabhängigkeit der Interaktion ist eine naheliegende Vermutung, da bereits für mehrere Oberflächenproteine eine Abhängigkeit von Protein-Protein-Interaktionen, Ligandenbindung und Biofilmbildung von bivalenten Kationen nachgewiesen wurde. Beispielsweise aggregieren die B-Repeats von SdrD und von Bhp kalziumabhängig [97] und die FnBP-vermittelte Biofilmmak-kumulation (10 µM Zink) [81] sowie die Dimerisierung von SasG-Molekülen sind zinkabhängige Mechanismen [116, 117]. Conrady *et al.* haben den Einfluss von Ca²⁺, Sr²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ und Zn²⁺ untersucht, doch nur in Anwesenheit von 10 mM Zink konnte eine Dimerisierung der G5-Domänen von Aap beobachtet werden. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung wurde durch Zugabe von physiologischen Konzentrationen an Zink (15-20 µM) - nach Inhibierung durch einen Chelator - wiederhergestellt [117]. Um die Spezifität mutmaßlicher zinkabhängiger Interaktionen der SasC-Subdomänen zu überprüfen, könnten zusätzlich Chelatoren (z. B. EDTA) zu den Ansätzen bei Versuchen mit rekombinanten Proteinen als auch in kompetitiven Biofilmassays hinzugefügt werden. Ändert sich das Interaktionsmuster daraufhin, so handelt es sich um einen zinkabhängigen Mechanismus.

Protein-Protein-Interaktionsstudien *in vivo* Um das Interaktionsverhalten unter *in vivo*-Bedingungen zu untersuchen, wurden die einzelnen N-terminalen Subdomänen in ein bakterielles Two Hybrid-System kloniert [216, 230]. Western Blot-Analysen von Zellysaten aus *E. coli* XL-1 Blue bestätigten die Anwesenheit der F1-, F2-, F3-, F4- und F5-Fusionsproteine. Und auch im Reporterstamm *E. coli* BTH101 konnte die Expression der T18- und T25-SasC-NT sowie der T18- und T25-SasC-DUF1-6-Fusionsproteine (keine Co-Transformation) bestätigt werden.

Die SasC-NT-Fusionsproteine wurden nicht vom anti-SasC-NT-Antiserum erkannt - möglicherweise waren die Proteine (Antikörper) des verwendeten Aliquots durch Gefrier-Auftau-Zyklen beeinträchtigt oder denaturiert, was mit Verlust der Funktionalität einhergeht. Zusätzliche Banden, die hier wiederholt auf den Western Blots der BTH101-Zelllysate zu erkennen waren und zu Antiserum-spezifischen Bandenmustern führten, können auf die polyklonale Natur der Antiseren (Kreuzreaktion; unspezifische Bindung), oder auch auf Abbauprodukte der Zielproteine zurückzuführen sein. Der anti-T18-Antikörper, der gegen ein Epitop zwischen den Aminosäureresten 373 und 400 von *B. pertussis* gerichtet ist und in der Literatur bereits erfolgreich in BACTH-Versuchen verwendet wurde [219], detektierte keines der Fusionsproteine.

Durch Co-Transformation in die Stämme DHM1 und BTH101 konnte die Interaktion der *zip*-fusionierten Untereinheiten (die als Positivkontrolle dienten) durch die Blau- bzw. Pinkfärbung der Kolonien nachgewiesen werden, was die Funktionalität des Gesamtkonzepts des Versuches bestätigte. Trotz der Expression der Fusionsproteine in den Reporterstämmen konnte keine Komplementierung der Adenylatzyklaseaktivität durch Interaktion der SasC-Fusionsproteine in Co-Transformanten beobachtet werden. In Western Blots von Zelllysaten von co-transformierten DHM1-Zellen konnten keine Fusionsproteine nachgewiesen werden. Auch Zugabe verschiedener Konzentrationen von Zink, Nickel, Mangan, Kalzium und Magnesium führte zu keiner nachweisbaren Interaktion in den Reporterstämmen. Dass *in vivo* keine Interaktion der SasC-Fragmente nachgewiesen werden konnte, kann mehrere Ursachen haben. Zum Einen unterscheiden sich die Fragmente von denen, die *in vitro* eingesetzt wurden, so dass ein abweichendes Interaktionsverhalten möglich ist. Zum Anderen sind möglicherweise Voraussetzungen für eine Interaktion der Subdomänen im Rahmen des BACTH nicht erfüllt. So könnten zwischen den Subdomänen liegende Sequenzen für eine Interaktion relevant sein, die in den hier verwendeten Fragmenten (Abb. 4.11) nicht enthalten sind. Die *in vivo*-Experimente mit dem BACTH sollten mit den *sasC*-Fragmenten aus Abb. 4.2 wiederholt werden, um diese Hypothese zu überprüfen.

Ebenfalls ist denkbar, dass ein noch nicht identifizierter weiterer Ligand oder Co-Faktor für eine stabile SasC-Interaktion bzw. Interaktion der rekombinanten Subdomänen verantwortlich oder nötig ist. Einige Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor und Thrombospondin, und Plättchen konnten als SasC-Interaktionspartner bereits ausgeschlossen werden [128]. Die Interaktion mit anderen potentiellen Liganden wie Fibronectin oder auch Zuckerverbindungen ist noch zu überprüfen.

***sasC*-abhängige Aggregation in Labor- und klinischen Stämmen** In dieser Arbeit wurden Aggregationsassays im nicht-pathogenen Laborstamm *S. carnosus* TM300 und in *S. aureus* SH1000 durchgeführt, der als Modellstamm gut etabliert ist [209].

In klinisch relevanten *S. aureus*-Stämmen, ist eine große Variationsbreite von CWAs vorhanden [59]. Die Konsequenz ist, dass die parallele Expression von Virulenzfaktoren mit redundanter Funktion dazu führt, dass bei Verlust oder Inaktivierung des einen Faktors ein anderer Faktor dies kompensieren kann [27]. So zeigt nur eine Doppel-Knockout-Mutante von beiden FnBPs eine stark verringerte Fn-Bindeaktivität

[231] und auch die Proteine Aaa und Atl sind in ihren adhäsiven Eigenschaften redundant [166].

Expression von (pSasC) in *S. aureus* SH1000 oder *S. carnosus* TM300 führt zur Bildung großer Zellaggregate, welche leicht gewaschen werden und die Biofilmbildung reduziert erscheinen lassen. In den einzelnen Schritten der Versuchsdurchführung sind die großen Aggregate sehr gut sichtbar. Sub 1 zeigt ebenfalls starke Aggregatbildung, doch der Biofilm ist gegenüber den Waschschrritten stabil. In den Lyso-staphinlysaten sind multiple Banden bei Sub 1 zusehen. Sie werden von anti-SasC-NT-Serum detektiert, was auf eine Proteindegradation schließen lässt.

Dass die Hydrophobizität eines Proteins die initialen Adhäsionseigenschaften an abiotische Oberflächen beeinflusst, wurde bereits 1985 von Pascual *et al.* beschrieben, die zeigten, dass Adhäsions-positive Stämme eine höhere Hydrophobizität haben als Adhäsions-negative Stämme [232]. SasC besteht aus 25,1 % hydrophilen Aminosäuren [128]. Sub 1 besitzt anteilig mehr hydrophobe Aminosäuren, die die Adhäsion [128] und einen stabileren Biofilm begünstigen, was in den Biofilmassays bestätigt wurde. Expression der *sasC*-Subklone in *S. carnosus* TM300, der keinerlei Adhäsionsfaktoren exprimiert [33] und *S. aureus* SH1000, führt zu Aggregation in unterschiedlichem Ausmaß. Fehlen alle SR und die LR nur teilweise, wie in Sub 3A und Sub 3B, ist die Aggregation schwächer als bei Sub 1, aber stärker als bei Sub 5. Hier fehlen die LR vollständig und die Aggregation ist stark beeinträchtigt. Dies widerspricht einerseits den Ergebnissen der *in vitro*-Versuche, in welchen rekombinante SR (SasC-His-1) eine starke homotypische Interaktion zeigen, andererseits wird dadurch die Hypothese unterstützt, dass die LR zur Vermittlung der Interaktion beitragen.

In Sub 6 fehlt nur die FIVAR-Domäne, was zu verringerter Aggregation führt und ebenfalls eine Beteiligung der FIVAR-Domäne indiziert. Es ist zu berücksichtigen, dass die Aggregationsstudien mit den Subklonen (als Oberflächenproteine exprimiert) und die *in vitro*-Interaktionsstudien mit gereinigten rekombinanten Proteinen (SasC-Subdomänen) durchgeführt wurden, was verschiedene Ergebnisse liefern kann. Möglicherweise spielen hier strukturelle Faktoren eine Rolle, wie sie bei Aap/SasG zu finden sind. Bei Aap/SasG ermöglichen erst die B-Repeats die korrekte Lokalisierung der ligandenbindenden A-Domäne im Raum. Nur unter diesen Umständen kann Aap/SasG-abhängige Adhäsion und Akkumulation vermittelt werden [116].

In verschiedenen kompetitiven Aggregationsassays wurde der Einfluss von anti-SasC-NT-, anti-SasC-DUF-Antiserum und rekombinanten Proteinen auf die Aggregation von SasC-Subklonen untersucht. Keine der hier getesteten Bedingungen beeinflusste die Aggregatbildung bei Resuspension der bakteriellen Materials in Puffer.

Wurde SH1000 Sub 1 auf einer Agarplatte angezogen, die mit Antiserum (anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF) präinkubiert wurde, so wurde die Aggregation inhibiert. Bei Expression von (pSasC) in SH1000 trat dieser Effekt nicht auf. Das lässt auf den ersten Blick vermuten, dass es ein spezifischer Effekt, vermittelt durch den N-Terminus (Sub 1), ist. Zwar beinhaltet SasC ebenfalls den kompletten N-Terminus, doch womöglich wird hier der Effekt durch das Vorhandensein der DUF1542-Domänen (auch Sub 2) verhindert, eventuell durch sterische Hinderung. So ist für die DUF1542-Domänen aus Ehb

bekannt, dass diese längliche Strukturen ausbilden [129, 132], die zumindest bei Ehb zur Ligandenbindung beitragen können. Da aber auch das anti-SasC-DUF-Antiserum diesen Effekt bei SH100 Sub 1 hervorruft; die Aggregation der *S. carnosus*-Subklone aber nicht beeinflusst wird, spielt möglicherweise noch ein zusätzlicher Effekt eine Rolle, der auf andere Oberflächenproteine von *S. aureus*, die *S. carnosus* nicht aufweist, wirkt.

***sasC*-abhängige Biofilmbildung in Laborstämmen und klinischen Stämmen** Die Biofilmassays wurden mit *S. aureus* SH1000 durchgeführt.

Als Referenzstamm für eine starke Biofilmbildung wurde *S. epidermidis* RP62A verwendet, der einen PIA-abhängigen Biofilm bildet [52]. Biofilme von *ica*-positiven *S. epidermidis* sind dadurch charakterisiert, dass sie nicht von DNase I [54] oder Trypsin, jedoch von β -1,6-Hexosaminidase DspB degradiert werden [127]. Durch Zugabe von anti-SasC-NT-Antiserum sollte der Biofilm von RP62A nicht beeinflusst werden sollte, was bestätigt wurde. PIA-abhängige Biofilme unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und ihrer Morphologie von proteinogenen, wie z. B. Aap- oder Embp-abhängige Biofilme unterscheiden sich morphologisch. In PIA-Biofilmen sind die Bakterien in ein Netzwerk von extrazellulären Fasern eingebettet. In Aap- und Embp-vermittelten Biofilmen besteht die Matrix vorwiegend aus dichten Zellaggregaten [27, 233]. Wie schon von Büttner *et al.* beschrieben, wurde auch in dieser Arbeit beobachtet, dass PIA-abhängige Biofilme (hier: von RP62A) gegenüber Waschschrritten stabiler sind als proteinogene Biofilme [27]. Die Stärke der Biofilmbildung variiert zwischen den *sasC*-exprimierenden Subklonen stark. Subklone, die mindestens die FIVAR-Domäne und einen Teil der LR exprimieren (Sub 1, Sub 3A, Sub 3B), bilden einen sehr starken Biofilm aus. Fehlen hingegen diese Subdomänen, wie bei Sub 5 und Sub 6, ist die Biofilmbildung schwächer. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit dem Aggregationsverhalten der Subklone. Auffällig ist, dass SH1000 (pCX Δ lip) und Sub 2 einen mittelstarken Biofilm bilden. Auch unter Verwendung von frisch ausgefrorenen Subklonen und Anzucht auf frischem Medium konnten die bei Schröder *et al.* beschriebenen Unterschiede in der Biofilmbildung zwischen SasC/Sub 1 und Sub 2 nicht wiederholt werden [128]. Aus der Literatur ist beispielsweise bekannt, dass Anzucht in TSB signifikant die PIA-abhängige Biofilmbildung beeinflusst [27, 234]. Dass ein ähnlicher noch nicht identifizierter Effekt auf proteinogene Biofilme hier wirkt, ist unwahrscheinlich, da die Experimente von Schröder *et al.* ebenfalls in TSB durchgeführt wurden.

Um die Biofilmbildung besser zu beurteilen zu können sollte generell die Adhäsion von *S. aureus* an die Polystyroloberfläche verstärkt werden. Eine unbehandelte Polystyroloberfläche ist hydrophob mit wenig polaren Gruppen, welche die Adhäsion von Zellen bzw. Proteinen erschwert. Zugabe von ECM-Molekülen wie Fibrinogen oder synthetischen Molekülen wie Poly-L-Lysin führt zur Zunahme der Anzahl hydrophiler Gruppen auf der Oberfläche, welche zelluläre Adhäsion verstärken können, wenn diese über hydrophobe/hydrophile Interaktion stattfindet. Eine Verstärkung der Biofilmbildung wurde durch Beschichtung nicht beobachtet, doch der Biofilm von *S. aureus* SH1000 Sub 2 wurde durch Poly-L-Lysin-Beschichtung signifikant reduziert. Sub 2 bildete bei den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit einen unerwartet

starken Biofilm, was in der vorangegangenen Arbeit von Schröder *et al.* nicht beobachtet wurde. Der Grund dafür ist unbekannt. Der reduzierende Effekt von Poly-L-Lysin muss aus diesem Grund hinterfragt werden, da er bei einer geringeren (was erwartet wurde) Biofilmbildung von Sub 2 möglicherweise nicht hätte beobachtet werden können.

In dieser Arbeit wurden Biofilm-Kompetitionsassays mit anti-SasC-NT-Antiserum und rekombinanten SasC-Proteinen durchgeführt, wobei erwartet wurde, dass Antikörper, die gegen das zu untersuchende Molekül gerichtet sind, die Biofilmbildung durch das betreffende Molekül inhibieren. So konnten Geoghegan *et al.* bereits zeigen, dass die SasG-vermittelte Biofilmbildung durch Zugabe von rekombinanten B-Domänen des Proteins inhibiert wurde [116]. Und Barbu *et al.* haben gezeigt, dass die SdrC-vermittelte interzelluläre Aggregation durch Zugabe eines anti-SdrC_{N2N3}-Antikörpers oder Zugabe von rekombinanten SdrC_{N2N3}-Subdomänen inhibiert wird [218].

Bereits eine Verdünnung des anti-SasC-NT-Antiserums von 1:10000 im Kulturmedium führte zu einer Reduktion der Biofilmbildung von SH1000 (pSasC) um 40%. Die Kontrolle mit dem entsprechenden Präimmenserum zeigte keinen Effekt. Interessanterweise reagierte Sub 1, welches ebenfalls vollständig den N-Terminus, aber nicht die DUF1542-Domänen exprimiert, nicht spezifisch auf das Antiserum. *In vitro*-Analysen mittels MST und SPR haben allerdings Hinweise auf eine heterotypische Interaktion von SasC-His-1 mit SasC-His-NT geliefert. Aus der Literatur ist bekannt, dass für die Biofilm-vermittelnde Funktion einiger Oberflächenproteine die korrekte Ausrichtung essentiell ist. So bilden in Embp bilden die DUF1542-Domänen eine starre stabförmige Struktur aus [168] und die B-Repeats von Aap/SasG sorgen für eine korrekte Ausrichtung der Ligandenbindedomäne [108, 117]. Möglicherweise sind auch bei SasC die DUF1542-Domänen für die korrekte Orientierung des Proteins auf der Zelloberfläche nötig und fehlende DUF1542-Domänen resultieren in einer schlechten Zugänglichkeit der mutmaßlichen Ligandenbindedomäne(n) innerhalb des N-Terminus. Doch bildet Sub 1 einen starken Biofilm und der N-Terminus ist offenbar zugänglich. In diesem Zusammenhang sollte der kompetitive Aggregationsassay mit Wachstum auf anti-SasC-NT-Antiserum nochmals betrachtet werden. Dort inhibiert Wachstum auf anti-SasC-NT- oder anti-SasC-DUF-Antiserum die Aggregation von Sub 1 gleichermaßen, möglicherweise aufgrund verschiedener Serumeffekte. Diese sind wahrscheinlich auch für die Biofilminhibierung verantwortlich.

Die Biofilmbildung von Sub 3A und Sub 5 wird vermutlich durch unspezifische Serumeffekte beeinflusst, da die Biofilmbildung beider Subklone durch gleiche Konzentrationen des Präimmenserums gehemmt wird. Sub 3 A und Sub 5 ist gemeinsam, dass das erste LR vollständig und das zweite LR entweder teilweise oder ebenfalls vollständig fehlt. Da sie alle die DUF1542-Domänen exprimieren, scheint nicht eine gestörte Proteinstruktur die Ursache dafür zu sein. Besonders, da Sub 3A eine sehr starke Aggregation und Biofilmbildung zeigt. Diese Ergebnisse untermauern die Annahme aus den *in vitro*-Versuchen, dass die LR an der Aggregations-vermittelnden Funktion beteiligt sind. Bei SasC und Sub 6 ist der inhibierende Effekt des Antiserums spezifisch, da er bereits in der niedrigsten Konzentration zu beobachten ist, wohingegen das Präimmenserum keinen Effekt zeigt. Sub 6, dem ausschließlich die FIVAR-Domäne fehlt, reagiert sehr sensitiv auf das Antiserum. Auch wenn das alleinige Fehlen der FIVAR-Domäne die Bio-

filmbildung reduziert, scheint die Proteinstruktur zu gewährleisten, dass die Antikörper des Serums die aggregationsvermittelnde Domäne inhibieren. Kristallisationsstudien mit zwei FIVAR-GA-Repeats von EbhA aus *S. aureus* haben eine längliche Struktur (aus Tripel- α -Helices) des Proteins aufgezeigt [235, 236]- ebenso wie die FIVAR-GA-Domänen von Embp (unveröffentlicht, Büttner, Perbandt und Rohde [27]). Weitere vorläufige Strukturanalysen von repetitiven FIVAR-Domänen [27] und DUF1542-Domänen [168] weisen auf eine längliche stäbchenförmige Gesamtkonformation von Embp hin [27]. Der inhibierende Effekt von hohen Konzentrationen des Antiserums (Verdünnung 1:100) auf alle Subklone ist mutmaßlich auf unspezifische Effekte der Serumkomponenten zurückzuführen, da auch das Präimmuserum in dieser Verdünnung einen solchen Effekt hervorruft.

Weitere Kompetitionsassays haben gezeigt, dass Zugabe von 1,5 μ M SasC-His-DUF1542 die Biofilmbildung beeinflusst, wenn die Inkubation während der bakteriellen Anzucht stattfindet. Ähnliches konnte von Barbu *et al.* für die SdrC-vermittelte Biofilmbildung (Zugabe von bis zu 2,4 μ M rekombinantes Protein) gezeigt werden [218]. *S. carnosus* TM300 (pCX Δ lip) bildet keinen Biofilm, allerdings scheint die Zugabe von Proteinen die schwache Adhäsion an Polystyrol noch weiter zu verringern. Bei *S. carnosus* TM300 wird die Adhäsion nicht über spezifische Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, sondern über hydrophobe Wechselwirkungen. Durch Zugabe der rekombinanten SasC-Proteine werden diese Interaktionen möglicherweise gestört. Zugabe von SasC-His-NT zeigt bei keinem der hier getesteten Stämme einen Effekt. Eine Inhibierung wäre für SasC und Sub 1 zu erwarten gewesen, da in Anwesenheit von SasC-His-NT die N-terminal vermittelte interzelluläre Aggregation zwischen den Bakterien beeinträchtigt sein sollte. Ein Effekt, der auch bei den Dimerisierungsstudien der B-Repeats von SasG beobachtet wurde [116].

Diese Beobachtungen sind nur teilweise konsistent mit den Ergebnissen der Kompetitionsassays mit anti-SasC-NT-Antiserum, da auch dieses keinen spezifischen inhibierenden Effekt auf das Aggregationsverhalten und die Biofilmbildung von Sub 1 hatte. Jedoch wurde die Biofilmbildung von SasC durch Zugabe von anti-SasC-NT-Antiserum verringert. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise nicht nur Domänen des N-Terminus von SasC an der Biofilmbildung bzw. der Inhibierung dieser, involviert sind. Interessanterweise wirkt SasC-His-DUF1542 stark inhibierend auf die SasC- und Sub 1-vermittelte Biofilmbildung. Da Sub 1 keine SasC-DUF1542-Domänen exprimiert, und weder SasC-His-NT noch SasC-His-DUF1542 einen Effekt auf die Biofilmbildung von Sub 2 haben, kann ein Effekt auf andere (möglicherweise ebenfalls DUF-Domänen enthaltende Proteine) nicht ausgeschlossen werden. Durch Wiederholung des Versuchs mit einem anderen His-*tagged*-Protein, welches nicht in der Biofilmbildung beteiligt ist (z. B. DHFR) könnten SasC-spezifische Effekte entweder bestätigt oder ausgeschlossen werden.

Ingesamt kann aus den Aggregations- und Biofilmassays geschlossen werden, dass ein inhibierender Effekt von Antiseren oder rekombinanten Proteinen nicht auftritt, wenn diese nach der Anzucht dazugegeben werden. Findet die Inkubation aber während der Anzucht der Kultur statt, sind spezifische Effekte zu beobachten. Die grafische Auswertung der Biofilme ist durch die teilweise inhomogene Struktur der Biofilme in einigen Fällen nicht repräsentativ. Verschiedene Farbtöne werden vom dem Biorad Imager als

exprimiert von:	N-Terminus komplett	Kleine Repeats (SR)	Große Repeats (LR)	DUF1542-Domänen	FIVAR-Domäne
<i>in vitro</i> -Studien	SasC-His-NT	SasC-His-1, (SasC-His-2)	(SasC-His-2), SasC-His-3; SasC-His-4	SasC-His-DUF1542	(SasC-His-5)
<i>in vivo</i> -Studien	Sub 1	Sub 5, Sub 6	Sub 3A, Sub 3B, Sub 6	Sub 2	Sub 3A, Sub 3B
N-Terminus komplett	spezifisch	spezifisch	spezifisch	keine	
Kleine Repeats (SR)		spezifisch; mglw. primäre Interaktionspartner	spezifisch; sekundäre Interaktionspartner	keine	
Große Repeats (LR)			spezifisch; sekundäre Interaktionspartner	keine	
DUF1542-Domänen				unspezifisch	vermutlich spezifisch, Interaktionspartner
FIVAR-Domäne					unbekannt; mglw. ECM-Moleküle

Tabelle 5.1: **Ergebnisse der Interaktionsstudien.** Unter Berücksichtigung aller verwendeten Methoden ist eine spezifische homotypische Interaktion der SR sehr wahrscheinlich. Als zweite Stufe ist eine heterotypische SR-LR-Interaktion oder eine homotypische Interaktion der LR möglich. Für die SasC-DUF1542-Domänen ist eine Interaktion nicht wahrscheinlich. Beobachtete Interaktionen sind höchstwahrscheinlich unspezifisch. Eine Beteiligung der FIVAR-Domäne ist ebenfalls möglich. Ob diese über Interaktion mit anderen N-terminalen Subdomänen von SasC oder mit Liganden der ECM erfolgt, ist unbekannt.

Veränderung der Intensität gewertet. Dadurch werden Unterschiede abgebildet, welche in der Safraninfärbung teilweise nicht zu erkennen sind. Dies ist hier besonders bei *S. aureus* SH1000 (pCXΔlip) zu beobachten. Optisch ist kein Unterschied in der Biofilmentensität bei Zugabe von SasC-His-DUF1542 zu erkennen, doch die grafische Auswertung vermittelt den Eindruck einer signifikanten Reduktion. Beide Messmethoden haben Schwächen und spiegeln die optische Auswertung/Färbung nicht immer wider. Weswegen beide zur Auswertung herangezogen werden sollten. Die Bedingungen des semi-quantitativen Biofilmassays entsprechen nicht zwangsläufig den *in vivo*-Bedingungen während einer Infektion [4]. Für SasC ist zudem bekannt, dass die Expression *in vitro* geringer als *in vivo* ist [128].

In Tabelle 5.1 sind die Ergebnisse der Interaktionsstudien zusammengefasst und hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit (spezifisch oder unspezifisch) einer Interaktion, unter Berücksichtigung aller verwendeten Methoden, bewertet.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Interaktionsstudien indizieren, dass an der SasC-vermittelten Biofilmbildung SR, sowie zumindest anteilig die LR und die FIVAR-Domäne beteiligt sind. Auch wenn die Experimente die Aggregations-vermittelnden Domänen von SasC nicht ohne zweifelsfrei identifizierten, ermöglichen die Ergebnisse die Aufstellung einiger Hypothesen. Zum Einen die Notwendigkeit der korrekten räumlichen Lokalisierung und Ausrichtung des SasC-Proteins auf der Zelloberfläche. Diese strukturelle Positionierung gewährleistet die Ligandenbindung und damit die SasC-vermittelte Interaktion. Zum Anderen, dass nicht nur eine Subdomäne die Interaktion vermittelt, sondern noch mindestens ein weiterer Faktor beteiligt ist. Ob dies eine weitere Subdomäne von SasC, ein anderer Ligand auf benachbarten Zellen oder ein Ligand innerhalb der Biofilmmatrix ist, bleibt zu

untersuchen. Diese potentiellen Liganden können beispielsweise Proteine der extrazellulären Matrix (z. B. Fibronectin) oder Polysaccharide wie PIA (Bindung durch die FIVAR-Domäne) sein. Fibrinogen, von Willebrand-Faktor, Thrombospondin und Thrombozyten konnten als Liganden bereits ausgeschlossen werden [128]. In Abb. 5.1 ist ein hypothetisches Modell der SasC-vermittelten Aggregation dargestellt.

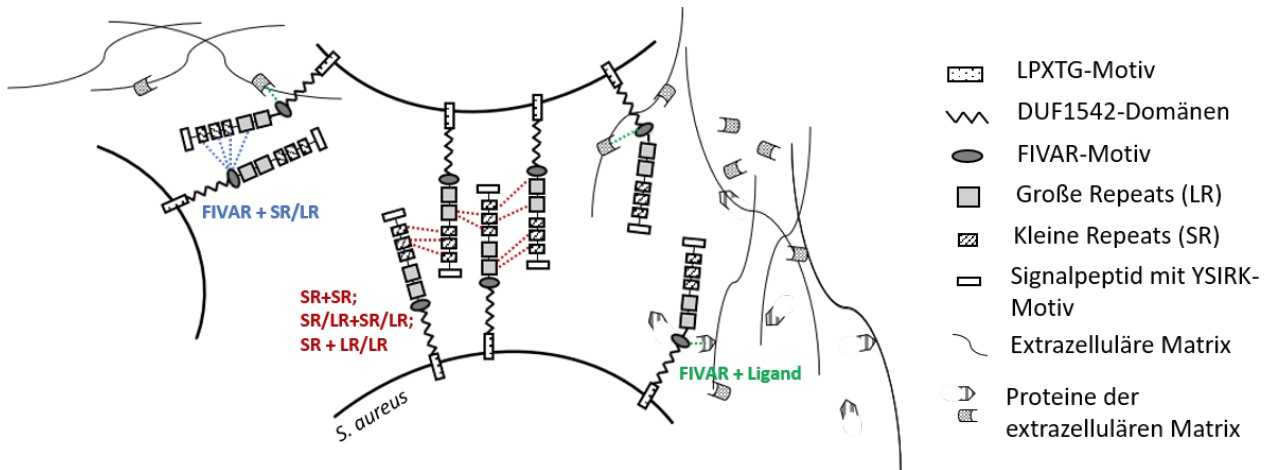


Abb. 5.1: **Hypothetisches Modell der SasC-vermittelten Biofilmbildung.** Neben homotypischen Interaktionen (rot) der SR oder der LR, ist möglicherweise auch eine heterotypische Interaktion zwischen den SR und den LR, an der SasC-vermittelten Aggregation beteiligt. Eine Interaktion der FIVAR-Domäne mit anderen N-terminalen Subdomänen (blau) oder mit Molekülen der extrazellulären Matrix (grün) ist ebenfalls denkbar.

Die Annahmen werden durch verschiedene Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit unterstützt: rekombinantes SasC-His-1 (2 SR) zeigt eine starke Interaktion mit SasC-His-NT und eine etwas schwächere homotypische Interaktion mit sich selbst. Dies lässt vermuten, dass innerhalb des N-Terminus noch ein weiterer Interaktionspartner der SR zu finden ist. Dieser könnte(n) die LR sein, die von SasC-His-3 (und FIVAR) und SasC-His-4 exprimiert werden. Mittels SPR konnte eine schwache Interaktion von SasC-His-3 nachgewiesen werden, die MST-Untersuchungen zeigten jedoch nur eine geringe Affinität zwischen diesen beiden Partnern. Subklon 5, welcher alle SR exprimiert, zeigt nur sehr schwache Aggregation und Biofilmbildung, was darauf schließen lässt, dass das dritte SR für die Interaktion von SasC-His-1 mit SasC-His-NT nicht ausschlaggebend ist. Interaktionsstudien mit SasC-His-1 und SasC-His-5, welcher die FIVAR-Domäne exprimiert, könnten Aufschluss geben. Ein Unterschied in der dreidimensionalen Proteinstruktur zwischen SasC-His-1 und der Präsentation der Ligandenbindedomäne(n) von Sub 5 auf der Zelloberfläche könnte die Ursache sein. Gestützt wird diese Hypothese auch durch das Interaktionsverhalten von SasC-His-3, welches die FIVAR-Domäne und einen Teil des zweiten LR aufweist. Die Ergebnisse der *in vitro*-Studien werden durch das Aggregations- und Biofilmbildungsverhalten von Sub 3A, welcher diese Domänen exprimiert, bestätigt. Eine spezifische Interaktion von SasC-His-3 konnte jedoch nicht mit allen *in vitro*-Studien bestätigt werden. Chemisches *crosslinking* mit BS³ führt zu spezifischer SasC-His-3-Dimerbildung. Messungen im BIAcore und mittels AFM konnten dies nicht bestätigen. Vielleicht

besitzt rekombinantes SasC-His-3 die Fähigkeit zur Interaktion, jedoch nur mit geringer Bindeaffinität. In jedem Fall muss berücksichtigt werden, dass *in vitro*-Versuche mit rekombinanten Proteinen sich von der *in vivo*-Situation unterscheiden können. Zur Verifizierung der hier beobachteten Ergebnisse, sollten insbesondere die MST-, SPR- und AFM-Studien wiederholt werden, da diese nur einmalig durchgeführt werden konnten. Zudem sollten SasC-His-2 und SasC-His-5 sowie weitere potentielle Liganden in weiterführenden Studien als Interaktionspartner der hier untersuchten N-terminalen Subdomänen überprüft werden.

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die hier durchgeführten Experimente haben zur molekularen Charakterisierung des *S. aureus surface protein C* beigetragen, wobei die Komplexität und Schwierigkeit der Verwendung sehr unterschiedlicher Methoden deutlich wurde. Eine eindeutige Identifizierung der an der SasC-vermittelten Interaktion beteiligten Domänen war nicht möglich. Durch Kombination verschiedener Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen konnten Hypothesen aufgestellt und Muster identifiziert werden. Diese können in späteren Arbeiten weiter verfolgt und überprüft werden. Zur weiteren Charakterisierung und genauen Identifizierung der an der Aggregation und Biofilmbildung beteiligten Subdomänen, sollten die vielversprechenden *in vitro*-Versuche, wie die BIAcore-Analysen wiederholt werden. Bedingungen wie verschiedene Konzentrationen der Interaktionspartner und Zugabe von Ionen sollten in diesem Rahmen ausgetestet werden. Interessant wäre ebenso die Untersuchung der Proteinfragmente SasC-His-2 und SasC-His-5. *Solid Phase Assays* [218] können zur Untersuchung der Selbstaggregation der rekombinanten Subdomänen herangezogen werden. Damit könnten die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Mittels *Phage Display* können auch potentielle Liganden von SasC aus der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Polysaccharide zur Interaktion mit der FIVAR-Domäne, identifiziert werden. Dabei werden in einer sog. Phagenbibliothek SasC-Proteinfragmente auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert und nach ihrer Bindeaffinität zu verschiedenen Molekülen (Liganden) selektiert. Weitere Informationen zur Natur der Interaktion von SasC-Subdomänen und zur dreidimensionalen Struktur kann die Röntgenkristallografie liefern. Dies wurde bereits für die Cadherin-ähnlichen Domänen von SraP [148] und die B-Repeats von Aap [107] erfolgreich durchgeführt. Auch mittels Elektronenmikroskopie können mögliche strukturelle Eigenschaften, die für die Vermittlung der interzellulären Aggregation, Voraussetzung sind, untersucht werden. Diese strukturellen Analysen können die aufgestellte Hypothese der notwendigen sterischen Orientierung für die Interaktion überprüfen.

Die detaillierte Charakterisierung von Faktoren, die primäre Anheftung und Biofilmmak-kumulation vermitteln, ist essentiell für das Verständnis von Biofilm-assoziierten Infektionen und der Entwicklung von neuen Therapien. Eine zukünftige Herausforderung besteht auch in der Übertragung der künstlichen *in vitro*-Analysen auf ein Experimentdesign, welches den Bedingungen *in vivo* entspricht [27]. Dass SasC während einer Infektion exprimiert wird und anti-SasC-Antikörper nachgewiesen werden konnten [136], untermauert seine Bedeutung als Pathogenitätsfaktor in *S. aureus*-assoziierten Infektionen. Weiterführende Studien zur Abhängigkeit der *sasC*-Expression von globalen Regulationssystemen und Umweltbedingungen können die klinische Relevanz von SasC genauer definieren.

7 Literatur

1. George Garrity, Boone, D. R. & Castenholz, R. W. *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1–721 (2001).
2. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. *Brock Mikrobiologie (11. Auflage)* 1203 (2009).
3. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* **27**, 870–926 (2014).
4. Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 207–228 (2008).
5. Steward, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* (2001).
6. Marshall, J. H. & Wilmoth, G. J. Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *Journal of Bacteriology* **147**, 900–913 (1981).
7. Kim, B.-S., Yi, H., Chun, J. & Cha, C.-J. Genome sequence of type strain of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Gut Pathogens* **6**, 6 (2014).
8. Kloos, W. E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annual Review of Microbiology* **34**, 559–592 (1980).
9. Lowy, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine* **339**, 520–532 (1998).
10. Otto, M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology* **17**, 32–37 (2014).
11. Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D. & Model, P. Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *The EMBO journal* **12**, 4803–4811 (1993).
12. Huesca, M., Peralta, R., Sauder, D. N., Simor, A. E. & McGavin, M. J. Adhesion and virulence properties of epidemic Canadian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain 1: identification of novel adhesion functions associated with plasmin-sensitive surface protein. *The Journal of Infectious Diseases* **185**, 1285–1296 (2002).
13. Ziebuhr, W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib Microbiol* **8**, 102–7 (2001).

14. Grundmann, H. *et al.* The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: results of a second structured survey. *Euro surveillance* **19** (2014).
15. Turnidge, J. & Grayson, M. L. Optimum Treatment of Staphylococcal Infections. *Drugs* **45**, 353–366 (1993).
16. Liu, G. Y. Molecular Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection. *Pediatr Res* **65**, 71–77 (2009).
17. *Surveillance Report of the European Centre for Disease Prevention and Control - Antimicrobial resistance surveillance in Europe* Techn. Ber. (2015), 63.
18. Jones, R. N. *Resistance patterns among nosocomial pathogens: Trends over the past few years* 2001.
19. Bhakdil, S. & Tranum-Jensen, J. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **55**, 733–751 (1991).
20. Löffler, B. *et al.* *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS pathogens* **6**, e1000715 (2010).
21. Cheng, A. G. *et al.* Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathogens* **6**, 19–20 (2010).
22. Thomer, L., Schneewind, O. & Missiakas, D. Multiple ligands of von willebrand factor-binding protein (vWbp) promote *Staphylococcus aureus* clot formation in human plasma. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 28283–28292 (2013).
23. Vanassche, T. *et al.* The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Infectious Diseases* **208**, 92–100 (2013).
24. Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G. & Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **284**, 1318–1322 (05/1999).
25. Lentino, J. R. Prosthetic Joint Infections: Bane of Orthopedists, Challenge for Infectious Disease Specialists. *Clinical Infectious Diseases* **36**, 1157–1161 (2003).
26. Huebner, J. & Goldmann, D. a. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annual review of medicine* **50**, 223–236 (1999).
27. Büttner, H., Mack, D. & Rohde, H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **5**, 1–15 (2015).

-
28. Mack, D. *et al.* Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 399–408 (2007).
 29. Christensen, G. D. *et al.* Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of Internal Medicine* **96**, 1–10 (1982).
 30. Schoenfelder, S. M. K. *et al.* *Success through diversity - How Staphylococcus epidermidis establishes as a nosocomial pathogen* 2010.
 31. Ziebuhr, W. *et al.* Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents* **28**, 14–20 (2006).
 32. Otto, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol* **34**, 201–214 (2012).
 33. Rosenstein, R. *et al.* Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 811–822 (2009).
 34. Schneewind, O. & Missiakas, D. M. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 1123–1139 (2012).
 35. Heilmann, C. *et al.* Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**, 2769–2778 (2003).
 36. Biswas, R. *et al.* Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiology Letters* **259**, 260–268 (2006).
 37. Marraffini, L. A., DeDent, A. C. & Schneewind, O. Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 192–221 (2006).
 38. Shockman, G. D. & Barrett, J. F. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **37**, 501–527 (1983).
 39. Snowden, M. A. & Perkins, H. R. Peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*: An apparent random polymerisation process. *European Journal of Biochemistry* **191**, 373–377 (1990).
 40. Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 149–167 (2008).
 41. Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W. & Götz, F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant. The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determi-

- nant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **55**, 778–787 (2005).
42. Weidenmaier, C. *et al.* Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *The Journal of infectious diseases* **191**, 1771–1777 (2005).
43. Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F. & Peschel, A. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infection and Immunity* **69**, 3423–2426 (2001).
44. Ziebuhr, W. *et al.* A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular microbiology* **32**, 345–356 (1999).
45. Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K. & Schneewind, O. An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2002).
46. Heilmann, C. & Götz, F. Cell-Cell Communication and Biofilm Formation in Gram-Positive Bacteria. *Bacterial signalling*, 7–22 (2010).
47. Brown, M. R. W., Allison, D. G. & Gilbert, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth rate related effect? *J Antimicrob Chemother* **22**, 777–780 (1998).
48. Donlan, R. & Costerton, J. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 167–19 (2002).
49. Otto, M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine* **64** (2013).
50. O’Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology* **54**, 49–79 (2000).
51. Heilmann, C. in *Bacterial adhesion. Adv Exp Med Biol 715. D. Linke, A. Goldmann, eds. Springer Science + Business Media, B.V.* 105–23 (2011).
52. Mack, D. The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear [beta]-1,6-linked glycosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178**, 175–183 (1996).
53. Dunne, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 155–166 (2002).

-
54. Heilmann, C. *et al.* Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology* **20**, 1083–1091 (1996).
 55. Caiazza, N. C. & Toole, G. a. O. Alpha-Toxin Is Required for Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Alpha-Toxin Is Required for Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* **185**, 3214–3217 (2003).
 56. Cohen, T. S. *et al.* *S. aureus* blocks efferocytosis of neutrophils by macrophages through the activity of its virulence factor alpha toxin. *Scientific Reports* **6**, 35466 (2016).
 57. Song, L. *et al.* Structure of Staphylococcal α -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore. *Science* **274**, 1859–1865 (12/1996).
 58. Walker, B., Krishnasastri, M., Zorn, L. & Bayley, H. Assembly of the oligomeric membrane pore formed by staphylococcal - hemolysin examined by truncation mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 21782–21786 (1992).
 59. Foster, T. J., Geoghegan, J., Ganesh, V. K. & Höök, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 49–62 (2014).
 60. Hammer, N. & Skaar, E. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annual Review of Microbiology* **65**, 129–47 (2011).
 61. Mazmanian, S. K. Passage of Heme-Iron Across the Envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**, 906–909 (2003).
 62. Bischoff, M. *et al.* Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus* SigB Regulon. *Journal of Bacteriology* **186**, 4085–4099 (2004).
 63. McAleese, F. M., Walsh, E. J., Sieprawska, M., Potempa, J. & Foster, T. J. Loss of Clumping Factor B Fibrinogen Binding Activity by *Staphylococcus aureus* Involves Cessation of Transcription, Shedding and Cleavage by Metalloprotease. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 29969–29978 (2001).
 64. Rohde, H. *et al.* Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular Microbiology* **55**, 1883–1895 (2005).
 65. Navarre, W. W. & Schneewind, O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **63**, 174–229 (1999).
 66. Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H. & Schneewind, O. *Staphylococcus aureus* Sortase, an Enzyme that Anchors Surface Proteins to the Cell Wall. *Science* **285**, 760–763 (07/1999).

67. Roche, F. M. *et al.* Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* **149**, 643–654 (2003).
68. Hartford, O., Francois, P., Vaudaux, P. & Foster, T. J. The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Molecular microbiology* **25**, 1065–76 (1997).
69. Schwarz-Linek, U. *et al.* Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem β -zipper. *Nature* **423**, 177–181 (2003).
70. Bowden, M. G. *et al.* Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **151**, 1453–1464 (2005).
71. Heilbronner, S. *et al.* Genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* N920143 allows identification of putative colonization and virulence factors. *FEMS Microbiology Letters* **322**, 60–67 (2011).
72. DeDent, A., Bae, T., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal* **27**, 2656–2668 (2008).
73. Clarke, S. R. & Foster, S. J. Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in Microbial Physiology* **51**, 187–224 (2006).
74. Barbu, E. M. *et al.* β -neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC. *PLoS Pathogens* **6** (2010).
75. Ponnuraj, K. *et al.* A "dock, lock, and latch" structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell* **115**, 217–228 (2003).
76. Ganesh, V. K. *et al.* A structural model of the *Staphylococcus aureus* ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics. *PLoS Pathogens* **4** (2008).
77. Bowden, M. G. *et al.* Evidence for the "dock, lock, and latch" ligand binding mechanism of the staphylococcal microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) SdrG. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 638–647 (2008).
78. Jönsson, K., Signäs, C., Müller, H.-P. & Lindberg, M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus* - The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *European Journal of Biochemistry* **202**, 1041–1048 (1991).

-
79. Wann, E. R., Gurusiddappa, S. & Höök, M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 13863–13871 (2000).
 80. Deivanayagam, C. C. S. *et al.* A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: Crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *EMBO Journal* **21**, 6660–6672 (2002).
 81. Geoghegan, J. A., Monk, I. R., O’Gara, J. P. & Foster, T. J. Subdomains N2N3 of fibronectin binding protein a mediate *Staphylococcus aureus* biofilm formation and adherence to fibrinogen using distinct mechanisms. *Journal of Bacteriology* **195**, 2675–2683 (2013).
 82. Keane, F. M. *et al.* Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **63**, 711–23 (2007).
 83. Roche, F. M. *et al.* The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 38433–38440 (2004).
 84. Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K. T. & Herrmann, M. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium. *The role of bacterial SSecretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules”(SERAM) in disturbing host defense systems* 2005.
 85. Burke, F. M., Di Poto, A., Speziale, P. & Foster, T. J. The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site. *FEBS Journal* **278**, 2359–2371 (2011).
 86. O’Neill, E. *et al.* A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of Bacteriology* **190**, 3835–3850 (2008).
 87. Sinha, B. *et al.* Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cellular Microbiology* **1**, 101–117 (1999).
 88. Eidhin, D. N. *et al.* Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **30**, 245–257 (1998).
 89. McDevitt, D. *et al.* Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *European journal of biochemistry / FEBS* **247**, 416–424 (1997).
 90. O’Brien, L. *et al.* Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: Roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Molecular Microbiology* **44**, 1033–1044 (2002).

91. Vaudaux, P. E. *et al.* Use of adhesion- defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. *Infection and Immunity* **63**, 585–590 (1995).
92. Geoghegan, J. A. *et al.* Molecular characterization of the interaction of staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) ClfA and Fbl with fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 6208–6216 (2010).
93. Siboo, I. R., Cheung, A. L., Bayer, A. S. & Sullam, P. M. Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets. *Infection and Immunity* **69**, 3120–3127 (2001).
94. O'Brien, M. M., Walsh, E. J., Massey, R. C., Peacock, S. J. & Foster, T. J. *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: Implications for nasal colonization. *Cellular Microbiology* **4**, 759–770 (2002).
95. McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. & Foster, T. J. Identification of the ligand- binding domain of the surface - located fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **16**, 895–907 (1995).
96. McCrea, K. W. *et al.* The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **146**, 1535–1546 (2000).
97. Josefsson, E., O'Connell, D., Foster, T. J., Durussel, I. & Cox, J. A. The binding of calcium to the B-repeat segment of SdrD, a cell surface protein of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **273** (1998).
98. Corrigan, R. M., Miajlovic, H. & Foster, T. J. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiology* **9**, 22 (2009).
99. Davis, S. L., Gurusiddappa, S., McCrea, K. W., Perkins, S. & Höök, M. SdrG, a Fibrinogen-binding Bacterial Adhesin of the Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules Subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, Targets the Thrombin Cleavage Site in the B β Chain. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 27799–27805 (2001).
100. Sharp, J. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic. *PLoS ONE* **7** (2012).
101. Arrecubieta, C., Lee, M.-H., Macey, A., Foster, T. J. & Lowy, F. D. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *The Journal of biological chemistry* **282**, 18767–18776 (2007).
102. Tung, H. *et al.* A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem.J.* **345 Pt 3**, 611–619 (2000).

-
103. Vazquez, V. *et al.* Fibrinogen is a ligand for the *Staphylococcus aureus* Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) Bone sialoprotein-binding protein (Bbp). *Journal of Biological Chemistry* **286**, 29797–29805. arXiv: 1512.00567 (2011).
 104. Zong, Y. *et al.* A Collagen Hug Model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *The EMBO Journal* **24**, 4224–4236 (2005).
 105. Deivanayagam, C. C. S. *et al.* Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure Fold Des* **8**, 67–78 (2000).
 106. Kang, M. *et al.* Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 20520–20531 (2013).
 107. Conrady, D. G., Wilson, J. J. & Herr, A. B. Structural basis for Zn²⁺-dependent intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 202–11 (2013).
 108. Gruszka, D. T. *et al.* Staphylococcal biofilm-forming protein has a contiguous rod-like structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1011–1018 (2012).
 109. Bateman, A., Holden, M. T. G. & Yeats, C. The G5 domain: A potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics* **21**, 1301–1303 (2005).
 110. Corrigan, R. M., Rigby, D., Handley, P. & Foster, T. J. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology* **153**, 2435–2446 (2007).
 111. Hussain, M., Herrmann, M., Von Eiff, C., Perdreau-Remington, F. & Peters, G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infection and Immunity* **65**, 519–524 (1997).
 112. Banner, M. A. *et al.* Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *Journal of Bacteriology* **189**, 2793–2804 (2007).
 113. Schaeffer, C. R. *et al.* Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. *Infection and Immunity* **83**, 214–226 (2015).
 114. Roche, F. M., Meehan, M. & Foster, T. J. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology* **149**, 2759–2767 (2003).

115. Conlon, B. P. *et al.* Role for the A domain of unprocessed accumulation-associated protein (Aap) in the attachment phase of the *Staphylococcus epidermidis* biofilm phenotype. *Journal of Bacteriology* **196**, 4268–4275 (2014).
116. Geoghegan, J. a. *et al.* Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **192**, 5663–5673 (2010).
117. Conrady, D. G. *et al.* A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19456–19461 (2008).
118. Bleiziffer, I. *et al.* The Plasmin-Sensitive Protein Pls in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Is a Glycoprotein. *PLoS Pathogens* **13** (2017).
119. Savolainen, K., Paulin, L., Westerlund-Wikström, B., Korhonen, T. K. & Kuusela, P. Expression of pls, a gene closely associated with the mecA gene of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, prevents bacterial adhesion in vitro. *Infection and Immunity* **69**, 3013–3020 (2001).
120. Hilden, P., Savolainen, K., Tynnela, J., Vuento, M. & Kuusela, P. Purification and characterisation of a plasmin-sensitive surface protein of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem* **236**, 904–910 (1996).
121. Hussain, M. *et al.* Expression of Pls (plasmin sensitive) in *Staphylococcus aureus* negative for pls reduces adherence and cellular invasion and acts by steric hindrance. *The Journal of infectious diseases* **200**, 107–117 (2009).
122. Jensen, K. A normally occurring staphylococcus antibody in human serum. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **44**, 421–428 (1958).
123. Nguyen, T., Ghebrehiwet, B. & Peerschke, E. I. B. *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: A novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infection and Immunity* **68**, 2061–2068 (2000).
124. Gómez, M. I. *et al.* *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nature Medicine* **10**, 842–848 (2004).
125. Merino, N. *et al.* Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **191**, 832–843 (2009).
126. Maresso, A. W., Chapa, T. J. & Schneewind, O. Surface protein IsdC and sortase B are required for heme-iron scavenging of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **188**, 8145–8152 (2006).

-
127. Rohde, H. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**, 1711–20 (2007).
 128. Schroeder, K. *et al.* Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS ONE* **4** (2009).
 129. Christner, M. *et al.* The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular Microbiology* **75**, 187–207 (2010).
 130. Jularic, M. *Molekulare Charakterisierung des Staphylococcus aureus-Oberflächenproteins SasC und Rolle in der Zell-Zell-Interaktion* Diss. (2016).
 131. Lupas, A., Van Dyke, M. & Stock, J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science (New York, N.Y.)* **252**, 1162–4 (1991).
 132. Clarke, S. R., Harris, L. G., Richards, R. G. & Foster, S. J. Protein of *Staphylococcus aureus* Analysis of Ehb , a 1 . 1-Megadalton Cell Wall-Associated Fibronectin-Binding Protein of *Staphylococcus aureus*. **70**, 6680–6687 (2002).
 133. Williams, R. J., Henderson, B., Sharp, L. J. & Nair, S. P. Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis* Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity* **70**, 6805–6810 (2002).
 134. Komatsuzawa, H. *et al.* Tn551-mediated insertional inactivation of the fntB gene encoding a cell wall-associated protein abolishes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* **45**, 421–431 (2000).
 135. Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. & Gotz, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Molecular Microbiology* **24**, 1013–1024 (1997).
 136. Clarke, S. R. *et al.* Identification of in vivo-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *J.Infect.Dis.* **193**, 1098–108 (2006).
 137. Fournier, B. & Hooper, D. C. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **182**, 3955–3964 (2000).
 138. Liang, X. *et al.* Global regulation of gene expression by ArlRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **187**, 5486–5492 (2005).

139. Cheung, A. L., Nishina, K. A., Trotonda, M. P. & Tamber, S. *The SarA protein family of Staphylococcus aureus* 2008. arXiv: NIHMS150003.
140. Luong, T. T., Dunman, P. M., Murphy, E., Projan, S. J. & Lee, C. Y. Transcription Profiling of the mgrA Regulon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* **188**, 1899–910 (2006).
141. Rice, K. C. *et al.* The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 8113–8118 (2007).
142. Gill, S. R. *et al.* Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J. Bacteriol.* **187**, 2426–2438 (2005).
143. Zhang, Y. Q. *et al.* Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Molecular Microbiology* **49**, 1577–1593 (2003).
144. Cucarella, C. *et al.* Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* **183**, 2888–2896 (2001).
145. Cucarella, C. *et al.* Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and Immunity* **70**, 3180–3186 (2002).
146. Patti, J. M. *et al.* Critical residues in the ligand-binding site of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding adhesin (MSCRAMM). *Journal of Biological Chemistry* **270**, 12005–12011 (1995).
147. Siboo, I. R., Chaffin, D. O., Rubens, C. E. & Sullam, P. M. Characterization of the accessory sec system of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **190**, 6188–6196 (2008).
148. Yang, Y. H. *et al.* Structural Insights into SraP-Mediated *Staphylococcus aureus* Adhesion to Host Cells. *PLoS Pathogens* **10** (2014).
149. Clarke, S. R. *et al.* The *Staphylococcus aureus* Surface Protein IsdA Mediates Resistance to Innate Defenses of Human Skin. *Cell Host and Microbe* **1**, 199–212 (2007).
150. Miajlovic, H. *et al.* Direct interaction of iron-regulated surface determinant IsdB of *Staphylococcus aureus* with the GPIIb/IIIa receptor on platelets. *Microbiology* **156**, 920–928 (2010).

-
151. Zapotoczna, M., Jevnikar, Z., Miajlovic, H., Kos, J. & Foster, T. J. Iron-regulated surface determinant B (IsdB) promotes *Staphylococcus aureus* adherence to and internalization by non-phagocytic human cells. *Cellular Microbiology* **15**, 1026–1041 (2013).
 152. Dryla, A., Gelbmann, D., Von Gabain, A. & Nagy, E. Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Molecular Microbiology* **49**, 37–53 (2003).
 153. Visai, L. *et al.* Immune evasion by *Staphylococcus aureus* conferred by iron-regulated surface determinant protein IsdH. *Microbiology* **155**, 667–679 (2009).
 154. Valle, J. *et al.* Bap, a Biofilm Matrix Protein of *Staphylococcus aureus* Prevents Cellular Internalization through Binding to GP96 Host Receptor. *PLoS Pathogens* **8** (2012).
 155. Siboo, I. R., Chambers, H. F. & Sullam, P. M. Role of SraP, a serine-rich surface protein of *Staphylococcus aureus*, in binding to human platelets. *Infection and Immunity* **73**, 2273–2280 (2005).
 156. Peschel, A., Vuong, C., Otto, M. & Gotz, F. The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2845–2847 (2000).
 157. Fedtke, I. *et al.* A *Staphylococcus aureus* ypfP mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity. *Molecular Microbiology* **65**, 1078–1091 (2007).
 158. Fischer, W. Physiology of Lipoteichoic Acids in Bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **29**, 233–302 (1988).
 159. Hirschhausen, N. *et al.* A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cellular Microbiology* **12**, 1746–1764 (2010).
 160. Heilmann, C., Gerke, C. & Perdreau-remington, F. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infection and Immunity* **64**, 277–282 (1996).
 161. Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M. & O’Gara, J. P. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infection and Immunity* **79**, 1153–1165 (2011).
 162. Heilmann, C., Hartleib, J., Hussain, M. S. & Peters, G. The multifunctional *Staphylococcus aureus* autolysin Aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin. *Infection and Immunity* **73**, 4793–4802 (2005).

163. Buist, G., Steen, A., Kok, J. & Kuipers, O. P. *LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans* 2008.
164. Downer, R., Roche, F., Park, P. W., Mecham, R. P. & Foster, T. J. The Elastin-Binding Protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) Is Expressed at the Cell Surface as an Integral Membrane Protein and Not as a Cell Wall-Associated Protein. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 243–250 (2002).
165. Shuttleworth, H., CJ, D., Jones, S., T, A. & NP, M. Nucleotide sequence analysis of the gene for protein A from *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (NCTC8530) and its enhanced expression in *Escherichia coli*. *Gene* **58**, 283–95 (1987).
166. Hirschhausen, N., Schlesier, T., Peters, G. & Heilmann, C. Characterization of the modular design of the autolysin/adhesin aaa from *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **7** (2012).
167. Chavakis, T. *et al.* *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nature Medicine* **8**, 687–93 (2002).
168. Linke, C. *et al.* The Extracellular Protein Factor Epf from *Streptococcus pyogenes* is a Cell Surface Adhesin that Binds to Cells Through an N-Terminal Domain Containing a Carbohydrate-Binding Module. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 38178–38189 (2012).
169. Mack, D., Haeder, M., Siemssen, N. & Laufs, R. Association of biofilm production of coagulase -negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J.Infect.Dis.* **174**, 881–4 (1996).
170. Gerke, C. *et al.* Characterization of the N -Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. *J Biol Chem* **273**, 18586–18593 (1998).
171. Götz, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* **43**, 1367–1378 (2002).
172. Rupp, M. E., Fey, P. D., Heilmann, C. & Götz, F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *The Journal of Infectious Diseases* **183**, 1038–1042 (2001).
173. Fluckiger, U. *et al.* Biofilm Formation, icaADBC Transcription, and Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis by *Staphylococci* in a Device-Related Infection Model. *Infection and Immunity* **73**, 1811–1819 (2005).
174. Cramton, S. E. *et al.* Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* **69**, 4079–4085 (2001).

-
175. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J. & Geoghegan, J. A. Protein- based biofilm matrices in Staphylococci. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**, 1–10 (2014).
176. Weidenmaier, C. *et al.* Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine* **10**, 243–245 (2004).
177. Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D- Alanyl- Teichoic Acids in Gram- Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 686 (2003).
178. Hussain, M., Heilmann, C., Peters, G. & Herrmann, M. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microbial Pathogenesis* **31**, 261–270 (2001).
179. Christner, M. *et al.* SarA negatively regulates *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by modulating expression of 1 MDa extracellular matrix binding protein and autolysis-dependent release of eDNA. *Molecular Microbiology* **86**, 394–410 (2012).
180. Mann, E. E. *et al.* Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE* **4** (2009).
181. Qin, Z. *et al.* Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **153**, 2083–2092 (2007).
182. Heilmann, C. & Götz, F. Further characterization of *Staphylococcus epidermidis* transposon mutants deficient in primary attachment or intercellular adhesion. *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* **287**, 69–83 (1998).
183. Palchevskiy, V. & Finkel, S. E. Escherichia coli competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient. *Journal of Bacteriology* **188**, 3902–3910 (2006).
184. Rajendran, N. B. *et al.* Important contribution of the novel locus comEB to extracellular DNA-dependent *Staphylococcus lugdunensis* biofilm formation. *Infection and Immunity* **83**, 4682–4692 (2015).
185. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* **295**, 1487–1487 (2002).
186. Novick, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology* **48**, 1429–1449 (2003).
187. Mekalanos, J. J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *Journal of Bacteriology* **174**, 1–7 (1992).
-

188. Novick, R. in *Gram-Positive Pathogens, Second Edition. ASM Press Washington D.C: V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood* 496–516 (2006).
189. Liang, X. *et al.* Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **74**, 4655–4665 (2006).
190. Giraud, A. T., Cheung, A. L. & Nagel, R. The sae locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Archives of Microbiology* **168**, 53–58 (1997).
191. Novick, R. P. & Jiang, D. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals agr quorum sensing. *Microbiology* **149**, 2709–2717 (2003).
192. Davies, D. G. *et al.* The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **280**, 295–298 (04/1998).
193. Periasamy, S. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1281–1286 (2012).
194. Mehlin, C., Headley, C. M. & Klebanoff, S. J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *The Journal of experimental medicine* **189**, 907–18 (1999).
195. Cheung, G. Y. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathogens* **6** (2010).
196. Wang, R. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 238–248 (2011).
197. Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A. B. & Otto, M. Increased Colonization of Indwelling Medical Devices by Quorum - Sensing Mutants of *Staphylococcus epidermidis* In Vivo. *The Journal of Infectious Diseases* **190**, 1498–1505 (2004).
198. Vuong, C., Saenz, H. L., Götz, F. & Otto, M. Impact of the agr Quorum - Sensing System on Adherence to Polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases* **182**, 1688–1693 (2000).
199. Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G. a., Fischer, E. R. & Otto, M. Quorum sensing - control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of infectious diseases* **188**, 706–718 (2003).
200. Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N. & Fine, D. H. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology* **185**, 4693–4698 (2003).

-
201. Knobloch, J. K. M. *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: Differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology* **183**, 2624–2633 (2001).
 202. Knobloch, J. K. M., Jäger, S., Horstkotte, M. a., Rohde, H. & Mack, D. RsbU dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor B by expression of the negative regulator gene icaR. *Infection and Immunity* **72**, 3838–3848 (2004).
 203. Conlon, K. M., Humphreys, H. & O’Gara, J. P. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology* **184**, 4400–4408 (2002).
 204. Tormo, M. Á. *et al.* SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Journal of Bacteriology* **187**, 2348–2356 (2005).
 205. Conlon, K. M., Humphreys, H. & O’Gara, J. P. Inactivations of rsbU and sarA by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology* **186**, 6208–6219 (2004).
 206. Gibson, T. Studies on the Epstein-Barr virus genome [Ph.D. thesis]. *Cambridge, United Kingdom: Cambridge University.* (1984).
 207. Elish, M. E., Pierce, J. R. & Earhart, C. F. Biochemical analysis of spontaneous fepA mutants of *Escherichia coli*. *Journal of general microbiology* **134**, 1355–64 (1988).
 208. Bullock, W., Fernandez, J. & J.M., S. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376–379 (1987).
 209. Horsburgh, M. J. *et al.* sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: Characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Journal of Bacteriology* **184**, 5457–5467 (2002).
 210. Heilmann, C., Herrmann, M., Kehrel, B. E. & Peters, G. Platelet-binding domains in 2 fibrinogen-binding proteins of *Staphylococcus aureus* identified by phage display. *J.Infect.Dis.* **186**, 32–39 (2002).
 211. Schleifer, K. H. & Fischer, U. Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **32**, 153–156 (1982).
 212. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. & Beachey, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* **37**, 318–326 (1982).

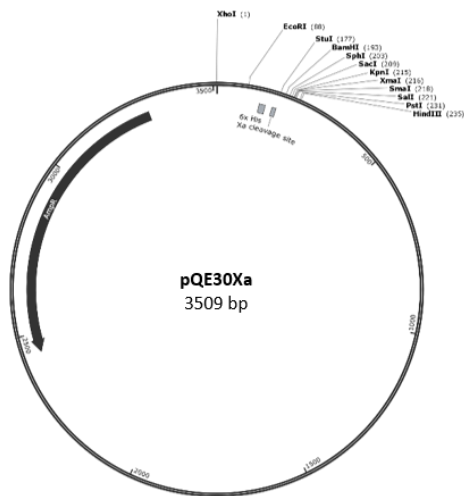
213. Mandel, M. & Higa, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology* **53**, 159–162 (1970).
214. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
215. Young, J. L., Lackner, L. L., Nunnari, J. M. & Phinney, B. S. Shotgun cross-linking analysis for studying quaternary and tertiary protein structures. *Journal of Proteome Research* **6**, 3908–3917 (2007).
216. Battesti, A. & Bouveret, E. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* **58**, 325–334 (2012).
217. Wieland, K. P., Wieland, B. & Götz, F. A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*. *Gene* **158**, 91–96 (1995).
218. Barbu, E. M., Mackenzie, C., Foster, T. J. & Höök, M. SdrC induces staphylococcal biofilm formation through a homophilic interaction. *Molecular Microbiology* **94**, 172–185 (2014).
219. Robichon, C., Karimova, G., Beckwith, J. & Ladant, D. Role of leucine zipper motifs in association of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL and FtsB. *Journal of Bacteriology* **193**, 4988–4992 (2011).
220. Cattoni, D. I., Chara, O., Kaufman, S. B. & Flecha, F. L. G. Cooperativity in binding processes: New insights from phenomenological modeling. *PLoS ONE* **10** (2015).
221. Carruthers, N. J., Parker, G. C., Gratsch, T., Caruso, J. A. & Stemmer, P. M. Protein mobility shifts contribute to gel electrophoresis liquid chromatography analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* **26**, 103–112 (2015).
222. Missineo, A. *et al.* IsdC from *Staphylococcus lugdunensis* induces biofilm formation under low-iron growth conditions. *Infection and Immunity* **82**, 2448–2459 (2014).
223. Wilchek, M. & Bayer, E. A. *The avidin-biotin complex in bioanalytical applications* 1988.
224. Adair, G. S., Bock, V. & Field, H. The Hemoglobin System: VI. The Oxygen Dissociation Curve of Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **63**, 529–545 (1925).
225. Koshland, D. E., Némethy, G. & Filmer, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry* **5**, 365–385 (1966).
226. Goodacre, N. F., Gerloff, D. L. & Uetz, P. Protein Domains of Unknown Function Are Essential in Bacteria. *mBio* **5**, 00744–13 (2014).

-
227. Bateman, A., Coggill, P. & Finn, R. D. DUFs: Families in search of function. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **66**, 1148–1152 (2010).
228. Punta, M. *et al.* Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Research* **40**, 290–301 (2012).
229. Feuillie, C. *et al.* Molecular interactions and inhibition of the staphylococcal biofilm-forming protein SdrC. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 3738–3743 (2017).
230. Karimova, G., Ullmann, A. & Ladant, D. Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin as a tool to analyze molecular interactions in a bacterial two-hybrid system. *International Journal of Medical Microbiology* **290**, 441–445 (2000).
231. Greene, C., McDevitt, D., Vaudaux, P., Lew, D. & Foster, T. J. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Molecular Microbiology* **17**, 1143–52 (1995).
232. Pascual, A., Fleer, A., Westerdaal, N. A. & Verhoef, J. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters in vitro. *European Journal of Clinical Microbiology* **5**, 518–522 (1986).
233. Schommer, N. N. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infection and Immunity* **79**, 2267–2276 (2011).
234. Mack, D. *et al.* Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods in Enzymology* **336**, 215–239 (2001).
235. Sakamoto, S. *et al.* Electron microscopy and computational studies of Ebh, a giant cell-wall-associated protein from *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2008).
236. Tanaka, Y. *et al.* A Helical String of Alternately Connected Three-Helix Bundles for the Cell Wall-Associated Adhesion Protein Ebh from *Staphylococcus aureus*. *Structure* (2008).

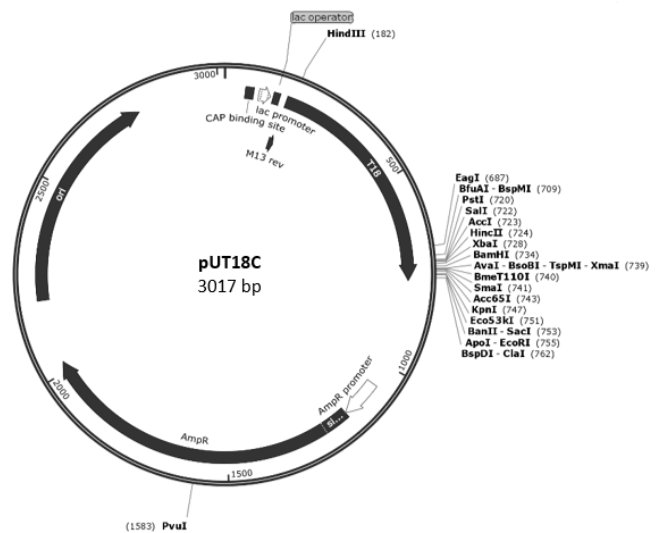
ANHANG

A1.1 Vektoren

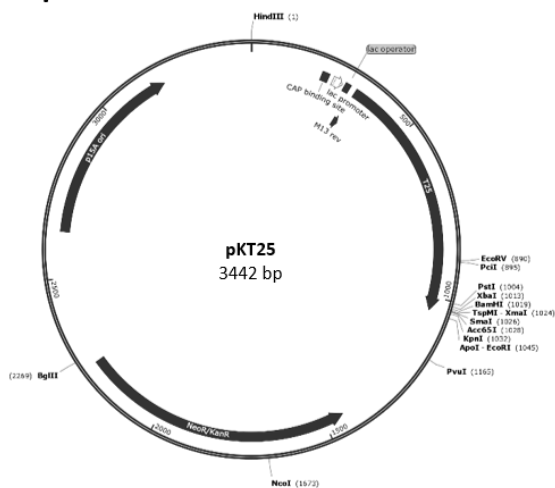
A pQE30Xa



B pUT18C



C pKT25



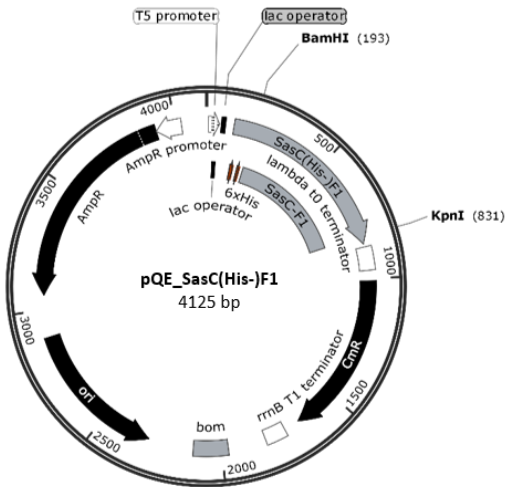
A1.2 Plasmidkarten und Sequenzen

Die Plasmidbezeichnung der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide setzt sich aus den Anfangsbuchstaben oder der Gesamtbezeichnung des entsprechenden Vektors und der Bezeichnung des klonierten Proteins zusammen. In den dazugehörigen Sequenzen sind jeweils der *Open Reading Frame* (ORF) des (Fusions-)proteins, das **Startkodon** und die verwendeten Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI: GGATCC und *Kpn*I: GGTACC) gekennzeichnet.

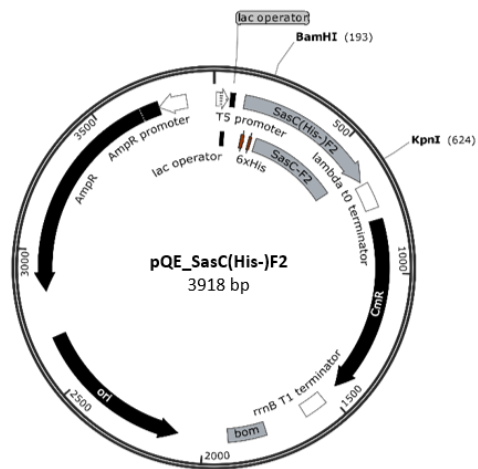
In den pQE30Xa-Derivaten wurden die SasC-Proteinsequenz **rot** und der His-Tag **blau** gekennzeichnet. In den Sequenzen für die pKT25- und pUT18C-Derivate wurden die SasC-Proteinsequenz ebenfalls **rot** und der jeweilige Fusionspartner (T18 oder T25-Untereinheit) **blau** markiert. Die Plasmide pKT25-*zip* und pUT18C-*zip* wurden nicht selbst konstruiert, sondern sind dem kommerziellen BACTH-Kit entnommen. In diesen wurde das **Leucin zipper**-Motiv hervorgehoben.

A1.2.1 Derivate des pQE30Xa

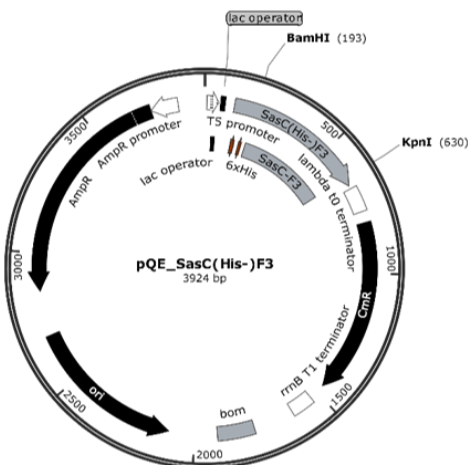
A pQE_SasC(His-)-F1



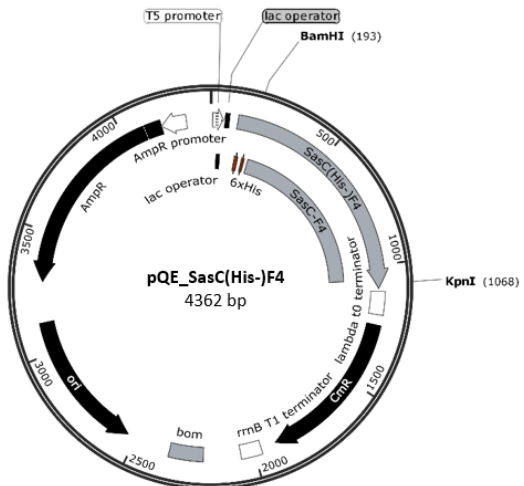
B pQE_SasC(His-)-F2



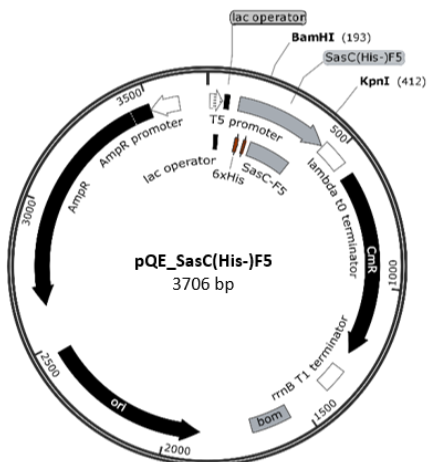
C pQE_SasC(His-)-F3



D pQE_SasC(His-)-F4



E pQE_SasC(His-)-F5



A pQE_SasC(His-)F1

```
1 CAATTTACACAGAA TTCATTAAAGAGGAG AAATTAACTATGGAGA GGATCGCATCACCAT CACCATCACGGATCT
>M R G S H H H H H H H G S
76 GGCTCTGGATCTGGT ATCGAGGGAAGGCCT TATAATGGAACTGGA TCCACGGATAATAAT GTACAAAGCGTACT
G S G S G I E G R P Y N G T G S T D N N V Q S D T
151 AATCAAGCAACACCT GTAAATTCACAAGAT AAAGATGTTGCTAAT AACAGAGGTTTAGCA AATAGTGCGCAGAAT
N Q A T P V N S Q D K D V A N N R G L A N S A Q N
226 ACACCTAATCAATCT GCAACAACCAATCAA GCAACGAATCAAGCA TTGGTTAATCATAAT AATGGTAGTATAGTA
T P N Q S A T T N Q A T N Q A L V N H N N G S I V
301 AATCAAGCTACGCCA ACATCAGTGCAATCA AGTACGCCTTCAGCA CAAAACAATAATCAT ACAGATGGCAATACA
N Q A T P T S V Q S S T P S A Q N N N H T D G N T
376 ACAGCAACTGAGACA GTGTCAAACGCTAAT AATAATGATGCAGTG TCGAATAATACCACA TAAATGTACCAAT
T A T E T V S N A N N N D A V S N N T T L N V P N
451 AAAACAAATGAAAT GGTTCAGGAGGACAT CTAACTTTAAAGGAA ATTCAGAAGATGTT CGTCATTCTTCAGAT
K T N E N G S G G H L T L K E I Q E D V R H S S D
526 AAACAGAGCTAGTT GCAATGCTGAACCA GCATCTAATAGACCG AAAAAGAGAAGTAGA CGTGCGGCACCGCA
K P E L V A I A E P A S N R P K K R S R R A A P A
601 GATCCTAATGCAACT CCAGCAGATCCAGCG GCTGCAGCGGCAGGA AACGGTGGTGCACCA GTAGCAATTACGCG
D P N A T P A D P A A A A A G N G G A P V A I T A
676 CCATACACGCCGACA ACTGATCCTAATGCC AATAATGCAGGACAA AATGCACCATCAGTA ACAGTTGTTGATAAT
P Y T P T T D P N A N N A G Q N A P S V T V V D N
751 TGGTACCCCGGTG ACCTGCAGCCAAGCT TAATTAGCTGAGCTT GGACTCCTGTTGATA GATCCAGTAATGACC
W Y P G S T C S Q A *
```

B pQE_SasC(His-)F2

```
1 CAATTTACACAGAA TTCATTAAAGAGGAG AAATTAACTATGGAGA GGATCGCATCACCAT CACCATCACGGATCT
>M R G S H H H H H H H G S
76 GGCTCTGGATCTGGT ATCGAGGGAAGGCCT TATAATGGAACTGGA TCCAGTCATGCAATG GTAAGAACGAGCATG
G S G S G I E G R P Y N G T G S S H A M V R T S M
151 TTTGATTCAGGAGAT AATAAGAACTATCAA GCACAAGGCAATGTA ATTGCATTAGGTCGT ATTAATGGAAGTATG
F D S G D N K N Y Q A Q G N V I A L G R I N G T D
226 ACGAATGACCATGGC GATTTTAATGGTATC GAGAAAACATTAACA GTAAATCCGAATTCT GAATTAATCTTTGAA
T N D H G D F N G I E K T L T V N P N S E L I F E
301 TTTAATACAATGACT ACTAAAAACGGTCAA GGCGCAACAAATGTT ATTATCAAAAATGCT GATACTAATGATACG
F N T M T T K N G Q G A T N V I I K N A D T N D T
376 ATTGCTGAAAAGACT GTTGAAGGCGGTCCA ACTTTGCGTTTATTT AAAGTACCTGATAAT GTGAGAAATCTCAA
I A E K T V E G G P T L R L F K V P D N V R N L K
426 ATTC AATTTGTATCT AAAAATGACGCAATA ACAGATGCGCGTGGC ATTTATCAACTAAAA GATGGTTACAAATAC
I Q F V S K N D A I T D A R G I Y Q L K D G Y K Y
501 TATAGCTTTGTTGAC TCTAGGTACCCGGG TCGACCTGCAGCCAA GCTTAATTAGCTGAG CTTGGACTCCTGTTG
Y S F V D S R Y P G S T C S Q A *
```

C pQE_SasC(His-)F3

```
1 CAATTTACACAGAA TTCATTAAAGAGGAG AAATTAACTATGGAGA GGATCGCATCACCAT CACCATCACGGATCT
>M R G S H H H H H H H G S
76 GGCTCTGGATCTGGT ATCGAGGGAAGGCCT TATAATGGAACTGGA TCCTCACATGTTTAT GTTGAAAGACGAAACA
G S G S G I E G R P Y N G T G S S H V Y V E R R T
151 ATGGAACCCACAGCA ACGAATAATAAAGAA TTTACAGTTACAACA TCACTAAAAATAAT GGTAATTCTGGTGTCT
M E P T A T N N K E F T V T T S L K N N G N S G A
226 TCTTTAGACACAGAT GAATTTGTTTATAAA ATTCAATTACCTGAA GGGGTAGAATATGTG AACCAATTCATTGACT
S L D T D E F V Y K I Q L P E G V E Y V N N S L T
301 AAAGATTTTCCAAGT AACAATTCAGGCGTT GATGTTAATGATATG AATGTTACATATGAT GCAGCAAATCGTGTG
K D F P S N N S G V D V N D M N V T Y D A A N R V
376 ATAACAATTAAGGC ACTGGTGGTGGCACA ACGAATTCACCTGCA CGACTAATGCCTGAT AAAATATTGGATTTA
I T I K S T G G G T T N S P A R L M P D K I L D L
```

451 AAGTATAAGTTGCGT GTTAATAATGTACCG ACACCAAGAACAGTA ACATTTAATGATACA TTAACGTATAAAACA
 K Y K L R V N N V P T P R T V T F N D T L T Y K T
 526 TATACACAAGATTTT ATTAATTCAGGGTAC CCGGGTTCGACCTGC AGCCAAGCTTAATTA GCTGAGCTTGGACTC
 Y T Q D F I N S G Y P G S T C S Q A *

D pQE_SasC(His-)-F4

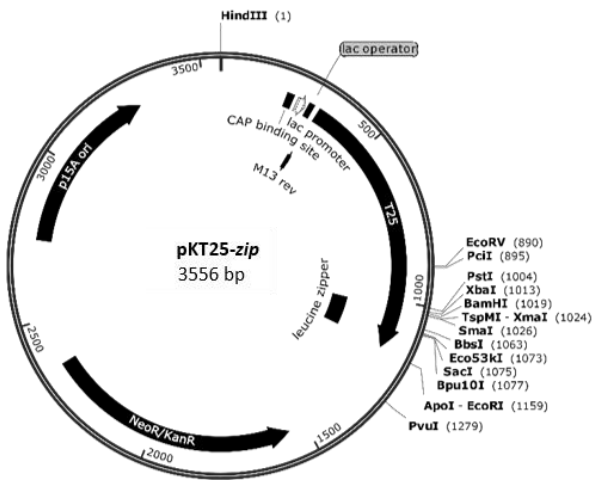
1 CAATTCACACAGAA TTCATTAAAGAGGAG AAATTAACTATGAGA GGATCGCATCACCAT CACCATCACGGATCT
 >M R G S H H H H H H G S
 76 GGCTCTGGATCTGGT ATCGAGGAAGGCCT TATAATGGAACTGGA TCCAGTCATGCAATG GTAAGAACGAGCATG
 G S G S G I E G R P Y N G T G S S H A M V R T S M
 151 TTTGATTCAGGAGAT AATAAGAACTATCAA GCACAAGGCAATGTA ATTGCATTAGGTCGT ATTAATGGAACCTGAT
 F D S G D N K N Y Q A Q G N V I A L G R I N G T D
 226 ACGAATGACCATGGC GATTTTAATGGTATC GAGAAAACATTAACA GTAAATCCGAATTCT GAATTAATCTTTGAA
 T N D H G D F N G I E K T L T V N P N S E L I F E
 301 TTTAATACAATGACT ACTAAAAACGGTCAA GGCGCAACAAATGTT ATTATCAAAAATGCT GATACTAATGATACG
 F N T M T T K N G Q G A T N V I I K N A D T N D T
 376 ATTGCTGAAAAGACT GTTGAAGGCGGTCCA ACTTTGCGTTTATTT AAAGTACCTGATAAT GTGAGAAATCTCAAA
 I A E K T V E G G P T L R L F K V P D N V R N L K
 451 ATTCAATTTGTATCT AAAAATGACGCAATA ACAGATGCGCGTGGC ATTTATCAACTAAAA GATGGTTACAAATAC
 I Q F V S K N D A I T D A R G I Y Q L K D G Y K Y
 526 TATAGCTTTGTGAC TCTATCGGACTTCAT TCTGGGTCACATGTT TATGTTGAAAAGACGA ACAATGGAACCCACA
 Y S F V D S I G L H S G S H V Y V E R R T M E P T
 601 GCAACGAATAATAAAA GAATTTACAGTTACA ACATCACTAAAAAAT AATGGTAATTCTGGT GCTTCTTTAGACACA
 A T N N K E F T V T T S L K N N G N S G A S L D T
 676 GATGAATTTGTTAT AAAAATCAATTACCT GAAGGGGTAGAATAT GTGAACAATTCATTG ACTAAAGATTTTCCA
 D E F V Y K I Q L P E G V E Y V N N S L T K D F P
 751 AGTAACAATTCAGGC GTTGATGTTAATGAT ATGAATGTTACATAT GATGCAGCAAATCGT GTGATAACAATTTAAA
 S N N S G V D V N D M N V T Y D A A N R V I T I K
 826 AGCACTGGTGGTGGC ACAACGAATTCACCT GCACGACTAATGCCT GATAAAATATTGGAT TTAAAGTATAAGTTG
 S T G G G T T N S P A R L M P D K I L D L K Y K L
 901 CGTGTTAATAATGTA CCGACACCAAGAACA GTAACATTTAATGAT ACATTAACGTATAAAA ACATATACACAAGAT
 R V N N V P T P R T V T F N D T L T Y K T Y T Q D
 976 TTCATTAATTCAGGG TACCCCGGGTCGACC TGCAGCCAAGCTTAA TTAGCTGAGCTTGGGA CTCTCTGTTGATAGAT
 F I N S G Y P G S T C S Q A *

E pQE_SasC(His-)-F5

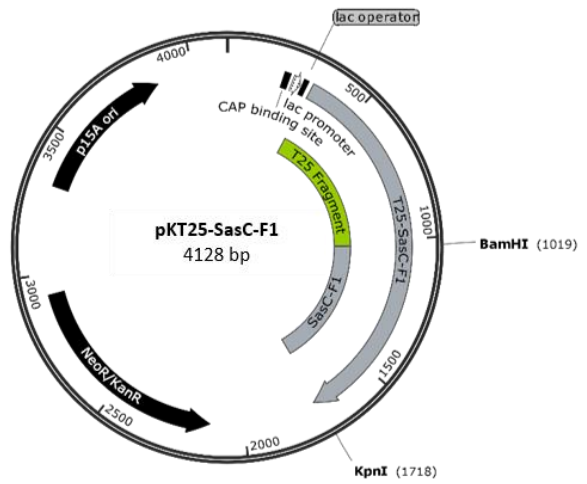
1 CAATTCACACAGAA TTCATTAAAGAGGAG AAATTAACTATGAGA GGATCGCATCACCAT CACCATCACGGATCT
 >M R G S H H H H H H G S
 76 GGCTCTGGATCTGGT ATCGAGGAAGGCCT TATAATGGAACTGGA TCCAATAAAGATGCA TTACAAGCCGAAGTT
 G S G S G I E G R P Y N G T G S N K D A L Q A E V
 151 GACAGACGTATTCAA CAAGCTGATTATACA TTTGCATCATTAGAT ATCTTTAATGATCTT AAAAAACGTGCACAA
 D R R I Q Q A D Y T F A S L D I F N D L K K R A Q
 226 ACAATTTTAGCTGAA AATCGTAACAATGTA CCATTAATAAAAAGA GTATCTCAAGCAGAT ATTGATACATTAAC
 T I L A E N R N N V P L N K R V S Q A D I D T L T
 301 AATCAGATGCAACAT ACGTTAATTCGAAGT TTGGTACCCCGGGTC GACCTGCAGCCAAGC TTAATTAGCTGAGCT
 N Q M Q H T L I R S L V P R V D L Q P S L I S *

A1.2.2 Derivate von pKT25

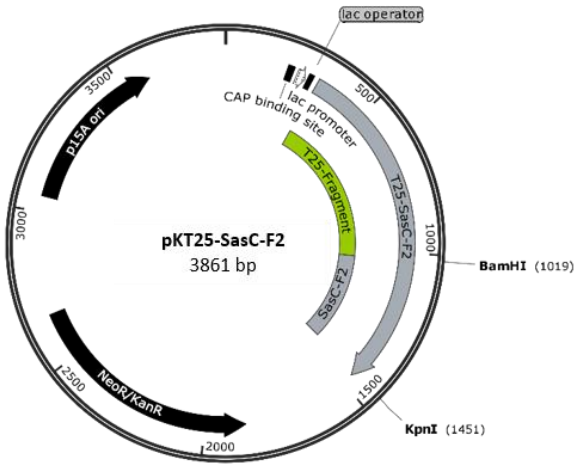
A pKT25-*zip*



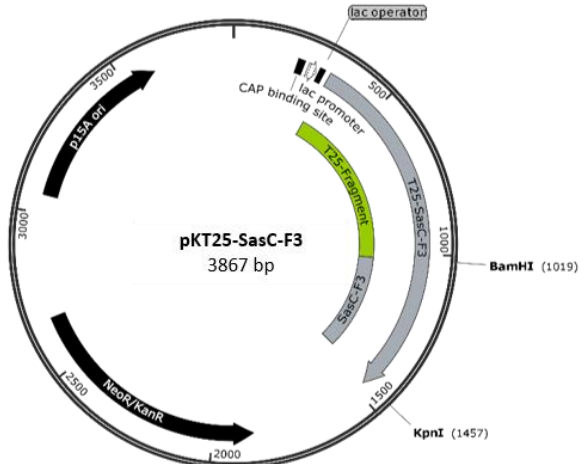
B pKT25-SasC-F1



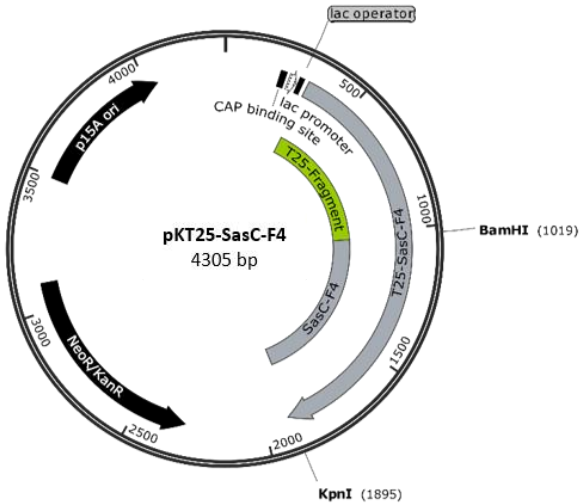
C pKT25-SasC-F2



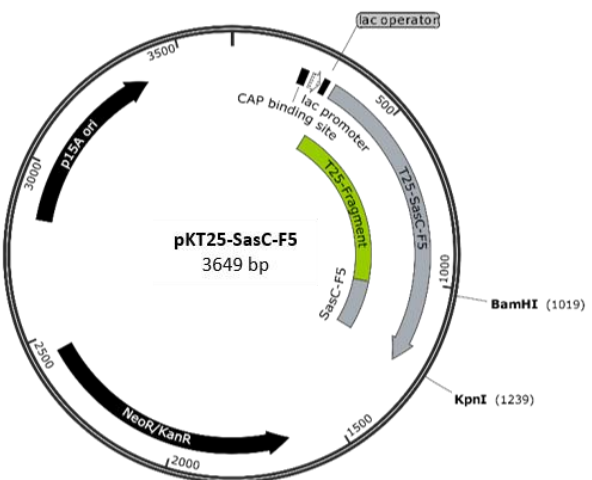
D pKT25-SasC-F3



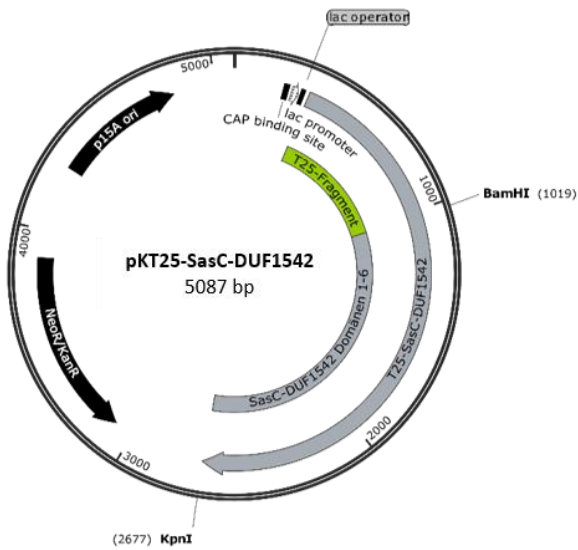
E pKT25-SasC-F4



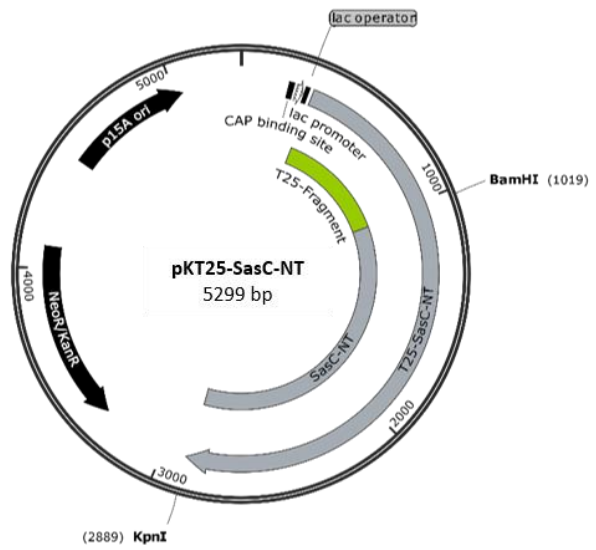
F pKT25-SasC-F5



G pKT25-SasC-DUF1542 1-6



H pKT25-SasC-NT



A pKT25-*zip*

```

1   TTCACACAGGAAACA GCTATGACCATGCAG CAATCGCATCAGGCT GGTTACGCAAACGCC GCCGACCGGGAGTCT
      >M T M Q Q S H Q A G Y A N A A D R E S
76  GGCATCCCCGCAGCC GTACTCGATGGCATC AAGGCCGTGGCGAAG GAAAAAACGCCACA TTGATGTTCCGCCTG
      G I P A A V L D G I K A V A K E K N A T L M F R L
151 GTCAACCCCCATTC ACCAGCTGATTGCC GAAGGGGTGGCCACC AAAGGATTGGGCGTG CACGCCAAGTCGTCC
      V N P H S T S L I A E G V A T K G L G V H A K S S
226 GATTGGGGGTTGCAG GCGGGCTACATTCCC GTCAACCCGAATCTT TCCAAACTGTTCCGGC CGTGCGCCCCGAGGTG
      D W G L Q A G Y I P V N P N L S K L F G R A P E V
301 ATCGCGCGGGGCCGAC AACGACGTCAACAGC AGCCTGGCGCATGGC CATACCGCGGTGCAC CTGACGCTGTCGAAA
      I A R A D N D V N S S L A H G H T A V D L T L S K
376 GAGCGGCTTACTAT CTGCGGCAAGCGGGC CTGGTACCGGCATG GCCGATGGCGTGGTC GCGAGCAACCACGCA
      E R L D Y L R Q A G L V T G M A D G V V A S N H A
451 GGCTACGAGCAGTTC GAGTTTCGCGTGAAG GAAACCTCGGACGGG CGCTATGCCGTGCAG TATCGCCGCAAGGGC
      G Y E Q F E F R V K E T S D G R Y A V Q Y R R K G
526 GGCGACGATTTTCGAG GCGGTCAAGGTGATC GGCAATGCCGCCGGT ATTCCACTGACGGCG GATATCGACATGTTT
      G D D F E A V K V I G N A A G I P L T A D I D M F
601 GCCATTATGCCGCAT CTGTCCAATTCCGC GACTCGGCGCGCAGT TCGGTGACCAGCGGC GATTCCGGTGACCGAT
      A I M P H L S N F R D S A R S S V T S G D S V T D
676 TACCTGGCGCGCACG CGGCGGCTGCAGGG TCGACTCTAGAGGAT CCCCGGTACCTATC CAGCGTATGAAACAG
      Y L A R T R R A A G S T L E D P R V P I Q R M K Q
751 CTGGAAGACAAAGTT GAAGAGCTCCTGAGC AAAAACTACCACCTG GAGAACGAAGTTGCG CGCCTGAAAAAAGT
      L E D K V E E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L
826 GTGGGTGAACGTGGG GTACCTAAGTAACTA AGAATTCGGCCGTCG TTTTACAACGTCGTG ACTGGGAAAACCCGTG
      V G E R G V P K *

```

B pKT25-SasC-F1

```

1   CCCAGGCTTTACTT TTATGCTTCCGGCTC GTATGTTGTGTGGAA TTGTGAGCGGATAAC AATTTACACAGGAA
76  ACAGCTATGACCATG CAGCAATCGCATCAG GCTGGTTACGCAAAC GCCGCCGACCGGGAG TCTGGCATCCCCGCA
      >M T M Q Q S H Q A G Y A N A A A D R E S G I P A
151 GCCGTACTCGATGGC ATCAAGGCCGTGGCG AAGGAAAAAACGCC ACATTGATGTTCCGC CTGGTCAACCCCCAT
      A V L D G I K A V A K E K N A T L M F R L V N P H

```

226 TCCACCAGCCTGATT GCCGAAGGGGTGGCC ACCAAAGGATTGGGC GTGCACGCCAAGTCG TCCGATTGGGGGTTG
 S T S L I A E G V A T K G L G V H A K S S D W G L
 301 CAGGCGGGCTACATT CCCGTCAACCCGAAT CTTTCCAACTGTTC GGCCGTGCGCCCGAG GTGATCGCGCGGGCC
 Q A G Y I P V N P N L S K L F G R A P E V I A R A
 376 GACAACGACGTCAAC AGCAGCCTGGCGCAT GGCCATACCGCGGTG GACCTGACGCTGTG AAAGAGCGGCTTGAC
 D N D V N S S L A H G H T A V D L T L S K E R L D
 451 TATCTGCGGCAAGCG GGCCGTGTCACCGGC ATGGCCGATGGCGTG GTCCGCGAGCAACCAC GCAGGCTACGAGCAG
 Y L R Q A G L V T G M A D G V V A S N H A G Y E Q
 526 TTCGAGTTTCGCGTG AAGGAAACCTCGGAC GGGCGCTATGCCGTG CAGTATCGCCGCAAG GCGGCGACGATTC
 F E F R V K E T S D G R Y A V Q Y R R K G G D D F
 601 GAGGCGGTCAAGGTG ATCGGCAATGCCGCC GGTATTCCACTGACG GCGGATATCGACATG TTCGCCATTATGCCG
 E A V K V I G N A A G I P L T A D I D M F A I M P
 676 CATCTGTCCAAC TTC CGCGACTCGGCGCGC AGTTCGGTGACCAGC GGCGATTCCGGTGACC GATTACCTGGCGCGC
 H L S N F R D S A R S S V T S G D S V T D Y L A R
 751 ACGCGGGGGGTGCA GGGTCGACTCTAGAG GATCCTACGGATAAT AATGTACAAAAGCGAT ACTAATCAAGCAACA
 T R R A A G S T L E D P T D N N V Q S D T N Q A T
 826 CCTGTAAATTCACAA GATAAAGATGTTGCT AATAACAGAGGTTTA GCAAATAGTGCGCAG AATACAC2AATCAA
 P V N S Q D K D V A N N R G L A N S A Q N T P N Q
 901 TCTGCAACAACCAAT CAAGCAACGAATCAA GCATTGGTTAATCAT AATAATGGTAGTATA GTAAATCAAGCTACG
 S A T T N Q A T N Q A L V N H N N G S I V N Q A T
 976 CCAACATCAGTGCAA TCAAGTACGCCTTCA GCACAAAACAATAAT CATAACAGATGGCAAT ACAACAGCAACTGAG
 P T S V Q S S T P S A Q N N N H T D G N T T A T E
 1051ACAGTGTCAAACGCT AATAATAATGATGCA GTGTGCAATAATACC ACATTAATGTACCA AATAAAACAAATGAA
 T V S N A N N N D A V S N N T T L N V P N K T N E
 1126AATGGTTCCAGGAGGA CATCTAACTTTAAAG GAAATTCAGAAGAT GTTCGTCAATCTTCA GATAAACCAGAGCTA
 N G S G G H L T L K E I Q E D V R H S S D K P E L
 1201GTTGCAATTGCTGAA CCAGCATCTAATAGA CCGAAAAAGAGAAGT AGACGTGCGGCACCG GCAGATCCTAATGCA
 V A I A E P A S N R P K K R S R R A A P A D P N A
 1276ACTCCAGCAGATCCA GCGGCTGCAGCGGCA GGAACGGTGGTGCA CCAGTAGCAATTACA GCGCCATACACGCCG
 T P A D P A A A A A G N G G A P V A I T A P Y T P
 1351ACAAC2GATCCTAAT GCCAATAATGCAGGA CAAAATGCACCTAAC GAAGTGTGTCTTTT GATGACAATGGTATT
 T T D P N A N N A G Q N A P N E V L S F D D N G I
 1426AGACCAAGTACCAAC CGTTCGTACCATCA GTAACAGTTGTTGAT AATTGGTACCTAAGT AACTAAGAATTCGGC
 R P S T N R S V P S V T V V D N W Y L S N *

C pKT25-SasC-F2

1 CTCATTAGGCACCCC AGGCTTTACACTTTA TGCTTCCGGCTCGTA TGTTGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAAT
 76 TTCACACAGGAAACA GCTATGACCATGCAG CAATCGCATCAGGCT GGTTACGCAAACGCC GCCGACCGGGAGTCT
 >M T M Q Q S H Q A G Y A N A A D R E S
 151 GGCATCCCCGCAGCC GTACTCGATGGCATC AAGGCCGTGGCGAAG GAAAAAACGCCACA TTGATGTTCCGCTCG
 G I P A A V L D G I K A V A K E K N A T L M F R L
 226 GTCAACCCCCATTCC ACCAGCCTGATTGCC GAAGGGGTGGCCACC AAAGGATTGGGCGTG CACGCCAAGTCGTCC
 V N P H S T S L I A E G V A T K G L G V H A K S S
 301 GATTGGGGGTTGCAG GCGGGCTACATTCCC GTCAACCCGAATCTT TCCAACTGTTCCGGC CGTGCGCCCGAGGTG
 D W G L Q A G Y I P V N P N L S K L F G R A P E V
 376 ATCGCGCGGGCCGAC AACGACGTCAACAGC AGCCTGGCGCATGGC CATACCGGGTTCGAC CTGACGCTGTGAAA
 I A R A D N D V N S S L A H G H T A V D L T L S K
 451 GAGCGGCTTGACTAT CTGCGGCAAGCGGGC CTGGTACCGGCATG GCCGATGGCGTGGTC GCGAGCAACCACGCA
 E R L D Y L R Q A G L V T G M A D G V V A S N H A
 526 GGCTACGAGCAGTTC GAGTTTCGCGTGAAG GAAACCTCGGACGGG CGCTATGCCGTGCAG TATCGCCGCAAGGGC
 G Y E Q F E F R V K E T S D G R Y A V Q Y R R K G
 601 GCGCAGCATTTTCGAG GCGGTCAAGGTGATC GGCAATGCCCGCGT ATTCCACTGACGGCG GATATCGACATGTTTC
 G D D F E A V K V I G N A A G I P L T A D I D M F
 676 GCCATTATGCCGCAT CTGTCCAAC2TCCGC GACTCGGCGCGCAGT TCGGTGACCAGCGGC GATTCCGGTGACCGAT
 A I M P H L S N F R D S A R S S V T S G D S V T D
 751 TACCTGGCGCGCAGC CGGCGGGCTGCAGGG TCGACTCTAGAGGAT CCTAGTCATGCAATG GTAAGAACGAGCATG
 Y L A R T R R A A G S T L E D P S H A M V R T S M
 826 TTTGATTCCAGGAGAT AATAAGAACTATCAA GCACAAGGCAATGTA ATTGCATTAGGTCGT ATTAATGGAAGTATGAT
 F D S G D N K N Y Q A Q G N V I A L G R I N G T D

901 ACGAATGACCATGGC GATTTTAATGGTATC GAGAAAACATTAACA GTAAATCCGAATTCT GAATTAATCTTTGAA
T N D H G D F N G I E K T L T V N P N S E L I F E
976 TTTAATACAATGACT ACTAAAAACGGTCAA GGCGCAACAAATGTT ATTATCAAAAATGCT GATACTAATGATACG
F N T M T T K N G Q G A T N V I I K N A D T N D T
1051ATTGCTGAAAAGACT GTTGAAGGCGGTCCA ACTTTGCGTTTATTT AAAGTACCTGATAAT GTGAGAAATCTCAAA
I A E K T V E G G P T L R L F K V P D N V R N L K
1126ATTCAATTTGTATCT AAAAAATGACGCAATA ACAGATGCGCGTGGC ATTTATCAACTAAAA GATGGTTACAAATAC
I Q F V S K N D A I T D A R G I Y Q L K D G Y K Y
1201TATAGCTTTGTGAC TCTAGGTACCTAAGT AACTAAGAATTCGGC CGTCGTTTACAACG TCGTGACTGGGAAA
Y S F V D S R Y L S N *

D pKT25-SasC-F3

1 CTCATTAGGCACCCC AGGCTTTACTACTTTA TGCTTCCGGCTCGTA TGTTGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAAT
76 TTCACACAGGAAACA GCTATGACCATGCAG CAATCGCATCAGGCT GGTTACGCAAACGCC GCCGACCGGGAGTCT
>M T M Q Q S H Q A G Y A N A A D R E S
151 GGCATCCCCGACGCC GTACTCGATGGCATC AAGGCCGTGGCGAAG GAAAAAACGCCACA TTGATGTTCCGCTG
G I P A A V L D G I K A V A K E K N A T L M F R L
226 GTCAACCCCCATTCC ACCAGCTGATTGCC GAAGGGGTGGCCACC AAAGGATTGGGCGTG CACGCCAAGTCGTCC
V N P H S T S L I A E G V A T K G L G V H A K S S
301 GATTGGGGTTGCAG GCGGGTACATTCCC GTCAACCCGAATCTT TCCAAACTGTTCCGGC CGTGCGCCGAGGTG
D W G L Q A G Y I P V N P N L S K L F G R A P E V
376 ATCGCGCGGGCCGAC AACGACGTCAACAGC AGCCTGGCGCATGGC CATAACCGGTCGAC CTGACGCTGTGAAA
I A R A D N D V N S S L A H G H T A V D L T L S K
451 GAGCGGCTTGACTAT CTGCGGCAAGCGGGC CTGGTCACCGGCATG GCCGATGGCGTGGTC GCGAGCAACCACGCA
E R L D Y L R Q A G L V T G M A D G V V A S N H A
526 GGCTACGAGCAGTTC GAGTTTCGCGTGAAG GAAACCTCGGACGGG CGCTATGCCGTGCAG TATCGCCGCAAGGGC
G Y E Q F E F R V K E T S D G R Y A V Q Y R R K G
601 GGCGACGATTTCCGAG GCGGTCAAGGTGATC GGCAATGCCGCCGGT ATTCCACTGACGGCG GATATCGACATGTTCT
G D D F E A V K V I G N A A G I P L T A D I D M F
676 GCCATTATGCCGCAT CTGTCCAACCTCCGC GACTCGGCGCGCAGT TCGGTGACCAGCGGC GATTCGGTGACCAGT
A I M P C H L S N F R D S A R S S V T S G D S V T D
751 TACCTGGCGPCACG CGGCGGGCTGCAGGG TCGACTCTAGAGGAT CCGTCACATGTTTAT GTTGAAAGACGAACA
Y L A R T R R A A G S T L E D P S H V Y V E R R T
826 ATGGAACCCACAGCA ACGAATAATAAAGAA TTTACAGTTACAACA TCACTAAAAATAAT GGTAATTCTGGTGTCT
M E P T A T N N K E F T V T T S L K N N G N S G A
901 TCTTTAGACACAGAT GAATTTGTTTATAAA ATTCAATTACCTGAA GGGGTAGAATATGTG AACAAATTCATTGACT
S L D T D E F V Y K I Q L P E G V E Y V N N S L T
976 AAAGATTTTCCAAGT AACAATTCAGGCGTT GATGTTAATGATATG AATGTTACATATGAT GCAGCAAATCGTGTG
K D F P S N N S G V D V N D M N V T Y D A A N R V
1051ATAACAATTAAGC ACTGGTGGTGGCACA ACGAATTCACCTGCA CGACTAATGCCTGAT AAAATATTGGATTTA
I T I K S T G G G T T N S P A R L M P D K I L D L
1126AAGTATAAGTTGCGT GTTAATAATGTACCG ACACCAAGAACAGTA ACATTTAATGATACA TTAACGTATAAACA
K Y K L R V N N V P T P R T V T F N D T L T Y K T
1201TATACACAAGATTC ATTAATTCAGGGTAC CTAAGTAACCTAAGAA TTCGGCCGTCGTTTT ACAACGTCGTGACTG
Y T Q D F I N S G Y L S N *

E pKT25-SasC-F4

1 CTCATTAGGCACCCC AGGCTTTACTACTTTA TGCTTCCGGCTCGTA TGTTGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAAT
76 TTCACACAGGAAACA GCTATGACCATGCAG CAATCGCATCAGGCT GGTTACGCAAACGCC GCCGACCGGGAGTCT
>M T M Q Q S H Q A G Y A N A A D R E S
151 GGCATCCCCGACGCC GTACTCGATGGCATC AAGGCCGTGGCGAAG GAAAAAACGCCACA TTGATGTTCCGCTG
G I P A A V L D G I K A V A K E K N A T L M F R L
226 GTCAACCCCCATTCC ACCAGCTGATTGCC GAAGGGGTGGCCACC AAAGGATTGGGCGTG CACGCCAAGTCGTCC
V N P H S T S L I A E G V A T K G L G V H A K S S

301 GATTGGGGGTTGCAG GCGGGCTACATTCCC GTCAACCCGAATCTT TCCAAACTGTTCCGGC CGTGCGCCCGAGGTG
 D W G L Q A G Y I P V N P N L S K L F G R A P E V
 376 ATCGCGCGGGCCGAC AACGACGTCAACAGC AGCCTGGCGCATGGC CATACCGCGGTTCGAC CTGACGCTGTGCGAAA
 I A R A D N D V N S S L A H G H T A V D L T L S K
 451 GAGCGGCTTGACTAT CTGCGGCAAGCGGGC CTGGTCACCGGCATG GCCGATGGCGTGGTC GCGAGCAACCACGCA
 E R L D Y L R Q A G L V T G M A D G V V A S N H A
 526 GGCTACGAGCAGTTC GAGTTTCGCGTGAAG GAAACCTCGGACGGG CGCTATGCCGTGCAG TATCGCCGCAAGGGC
 G Y E Q F E F R V K E T S D G R Y A V Q Y R R K G
 601 GGCGACGATTTTCGAG GCGGTCAAGGTGATC GGCAATGCCGCCGGT ATTCCACTGACGGCG GATATCGACATGTTTC
 G D D F E A V K V I G N A A G I P L T A D I D M F
 676 GCCATTATGCCGCAT CTGTCCAACCTCCGC GACTCGGCGCGCAGT TCGGTGACCAGCGGC GATTCGGTGACCGAT
 A I M P H L S N F R D S A R S S V T S G D S V T D
 751 TACCTGGCGCGCAGC CGGCGGGCTGCAGGG TCGACTCTAGAGGAT CCTAGTCATGCAATG GTAAGAACGAGCATG
 Y L A R T R R A A G S T L E D P S H A M V R T S M
 826 TTTGATTTCAGGAGAT AATAAGAACTATCAA GCACAAGGCAATGTA ATTGCATTAGGTCTG ATTAATGGAAGTATG
 F D S G D N K N Y Q A Q A G N V I A L G R I N G T T D
 901 ACGAATGACCAATGGC GATTTTAATGGTATC GAGAAAACATTAACA GTAAATCCGAATTCT GAATTAATCTTGAA
 T N D H G D F N G I E K T L T V N P N S E L I F E
 976 TTTAATACAATGACT ACTAAAAACGGTCAA GGCGCAACAAATGTT ATTATCAAAAATGCT GATACTAATGATACG
 F N T M T T K N G Q G A T N V I I K N A D T N D T
 1051ATTGCTGAAAAGACT GTTGAAGGCGGTCCA ACTTTGCGTTTATTT AAAGTACCTGATAAT GTGAGAAATCTCAAA
 I A E K T V E G G P T L R L F K V P D N V R N L K
 1126ATTCAATTTGTATCT AAAAAATGACGCAATA ACAGATGCGCGTGGC ATTTATCAACTAAAA GATGGTTACAAATAC
 I Q F V S K N D A I T D A R G I Y Q L K D G Y K Y
 1201TATAGCTTTGTGAC TCTATCGGACTTCAT TCTGGGTCACATGTT TATGTTGAAAAGACGA ACAATGGAACCCACA
 Y S F V D S I G L H S G S H V Y V E R R T M E P T
 1276GCAACGAATAATAAAA GAATTTACAGTTACA ACATCACTAAAAAAT AATGGTAATTCTGGT GCTTCTTTAGACACA
 A T N N K E F T V T T S L K N N G N S G A S L D T
 1351GATGAATTTGTTAT AAAATTCAATTACCT GAAGGGGTAGAATAT GTGAACAATTCATG ACTAAAGATTTTCCA
 D E F V Y K I Q L P E G V E Y V N N S L T K A D F P
 1426AGTAACAATTCAGGC GTTGATGTTAATGAT ATGAATGTTACATAT GATGCAGCAAATCGT GTGATAACAATTA
 S N N S G V D V N D M N V T Y D A A N R V I T I K
 1501AGCACTGGTGGTGGC ACAACGAATTCACCT GCACGACTAATGCCT GATAAAATATTGGAT TTAAGTATAAGTTG
 S T G G G T T N S P A R L M P D K I L D L K Y K L
 1576CGTGTTAATAATGTA CCGACACCAAGAACA GTAACATTTAATGAT ACATTAACGTATAAAA ACATATACACAAGAT
 R V N N V P T P R T V T F N D T L T Y K T Y T Q D
 1651TTCATTAATTCAGGG TACCTAAGTAACTAA GAATTCGGCCGTCGT TTTACAACGTCGTGA CTGGGAAAACCCCTGG
 F I N S G Y L S N *

F pKT25-SasC-F5

1 AGGCTTTACTTTTA TGCTTCCGGCTCGTA TGTTGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAAT TTCACACAGGAAACA
 76 GCTATGACCATGCAG CAATCGCATCAGGCT GGTTACGCAAACGCC GCCGACCGGGAGTCT GGCATCCCCGAGCC
 >M T M Q Q S H Q A G Y A N A A D R E S G I P A A
 151 GTACTCGATGGCATC AAGGCCGTGGCGAAG GAAAAAAACGCCACA TTGATGTCCGCCTG GTCAACCCCCATTC
 V L D G I K A V A K E K N A T L M F R L V N P H S
 226 ACCAGCCTGATTGCC GAAGGGGTGGCCACC AAAGGATTGGGCGTG CACGCCAAGTCGTCC GATTGGGGGTTGCAG
 T S L I A E G V A T K G L G V H A K S S D W G L Q
 301 GCGGGCTACATTCCC GTCAACCCGAATCTT TCCAAACTGTTCCGGC CGTGCGCCCGAGGTG ATCGCGCGGGCCGAC
 A G Y I P V N P N L S K L F G R A P E V I A R A D
 376 AACGACGTCAACAGC AGCCTGGCGCATGGC CATACCGCGGTTCGAC CTGACGCTGTGCGAAA GAGCGCTTGACTAT
 N D V N S S L A H G H T A V D L T L S K E R L D Y
 451 CTGCGGCAAGCGGGC CTGGTCACCGGCATG GCCGATGGCGTGGTC GCGAGCAACCACGCA GGCTACGAGCAGTTC
 L R Q A G L V T G M A D G V V A S N H A G Y E Q F
 526 GAGTTTCGCGTGAAG GAAACCTCGGACGGG CGCTATGCCGTGCAG TATCGCCGCAAGGGC GCGACGATTTTCGAG
 E F R V K E T S D G R Y A V Q Y R R K G G D D F E
 601 GCGGTCAAGGTGATC GGCAATGCCGCCGGT ATTCCACTGACGGCG GATATCGACATGTTTC GCCATTATGCCGCAT
 A V K V I G N A A G I P L T A D I D M F A I M P H
 676 CTGTCCAACCTCCGC GACTCGGCGCGCAGT TCGGTGACCAGCGGC GATTCGGTGACCGAT TACCTGGCGCGCAGC
 L S N F R D S A R S S V T S G D S V T D Y L A R T
 751 CGGCGGGCTGCAGGG TCGACTCTAGAGGAT CCGAATAAAGATGCA TTACAAGCCGAAGTT GACAGACGTATTCAA
 R R A A G S T L E D P N K D A L Q A E V D R R I Q

826 CAAGCTGATTATACA TTTGCATCATTAGAT ATCTTTAATGATCTT AAAAAACGTGCACAA ACAATTTTAGCTGAA
 Q A D Y T F A S L D I F N D L K K R A Q T I L A E
 901 AATCGTAACAATGTA CCATTAAATAAAGA GTATCTCAAGCAGAT ATTGATACATTAAC T AATCAGATGCAACAT
 N R N N V P L N K R V S Q A D I D T L T N Q M Q H
 976 ACGTTAATTCGAAGT TTGGTACCTAAGTAA CTAAGAATTCGGCCG TCGTTTTACAACGTC GTGACTGGGAAACC
 T L I R S L V P K *

G pKT25-SasC-DUF1542 1-6

1 TGCTTCCGGCTCGTA TGTGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAAT TTCACACAGGAAACA GCTATGACCATGCAG
 >M T M Q
 76 CAATCGCATCAGGCT GGTTACGCAAACGCC GCCGACCGGGAGTCT GGCATCCCCGCGACCC GTACTCGATGGCATC
 Q S H Q A G Y A N A A D R E S G I P A A V L D G I
 151 AAGGCCGTGGCGAAG GAAAAAACGCCACA TTGATGTTCCGCCTG GTCAACCCCCATTCC ACCAGCCTGATTGCC
 K A V A K E K N A T L M F R L V N P H S T S L I A
 226 GAAGGGGTGGCCACC AAAGGATTGGGCGTG CACGCCAAGTCGTCC GATTGGGGGTTGCAG GCGGGCTACATTCCC
 E G V A T K G L G V H A K S S D W G L Q A G Y I P
 301 GTCAACCCGAATCTT TCCAACTGTTCCGGC CGTGCGCCCGAGGTG ATCGCGCGGGCCGAC AACGACGTCAACAGC
 V N P N L S K L F G R A P E V I A R A D N D V N S
 376 AGCCTGGCGCATGGC CATACCGCGGTCGAC CTGACGCTGTGCGAAA GAGCGGCTTGACTAT CTGCGGCAAGCGGGC
 S L A H G H T A V D L T L S K E R L D Y L R Q A G
 451 CTGGTCACCGGCATG GCCGATGGCGTGGTC GCGAGCAACCACGCA GGCTACGAGCAGTTC GAGTTTCGCGTGAAG
 L V T G M A D G V V A S N H A G Y E Q F E F R V K
 526 GAAACCTCGGACGGG CGCTATGCCGTGCAG TATCGCCGCAAGGGC GGCACGATTTTCGAG GCGGTCAAGGTGATC
 E T S D G R Y A V Q Y R R K G G D D F E A V K V I
 601 GGCAATGCCGCCGGT ATTCCACTGACGGCG GATATCGACATGTTC GCCATTATGCCGCAT CTGTCCAACCTCCGC
 G N A A G I P L T A D I D M F A I M P H L S N F R
 676 GACTCGGCGCGCAGT TCGGTGACCAGCGGC GATTGCGGTGACCGAT TACCTGGCGCGCACG GCGGGGCTGCAGGG
 D S A R S S V T S G D S V T D Y L A R T R R A A G
 751 TCGACTCTAGAGGAT CCTACTTTAATTCGA AGTGTGATGCTGAA AATGCAGTAAATCAA AAAGCTGATCAAATG
 S T L E D P T L I R S V D A E N A V N Q K A D Q M
 826 GAAGATTTAGTTAAT CAAAATGATGAACTG ACAGATGAAGAAAA CAAGCAGCAATACAA GTTATCGAGGAACAT
 E D L V N Q N D E L T D E E K Q A A I Q V I E E H
 901 AAAGGCAATATTATT GGTGATATTGGTGTAT CAAACGACTGATGAT GGCGTTACTAGAATC AAAGATCAAGGTATA
 K G N I I G D I G D Q T T D D G V T R I K D Q G I
 976 CAGACCTTAAGTGGG GACTGCAACACCG GTTGTTAAACCAAT GCTAAAAAAGCAATA CGTGATAAAGCAACG
 Q T L S G D T A T P V V K P N A K K A I R D K A T
 1051AAAACAAAGGGAAATT ATCAATGCAACACCA GATGCTACTGAAGAC GAGATTCAAGATGCA ATAAATCAATTAGCT
 K Q R E I I N A T P D A T E D E I Q D A I N Q L A
 1126ACGGATGAAACAGAT GCTATTGATAATGTT ACGAATGCTACTACA AATGCTGACGTTGAA ACAGCTAAAAATAAT
 T D E T D A I D N V T N A T T N A D V E T A K N N
 1201GGCATCAATACTATT GGAGCAGTTGTTCCCT CAAGTAACCTATAAA AAAGCTGCAAGAGAT GCAATTAACCAAGCA
 G I N T I G A V V P Q V T H K K A A R D A I N Q A
 1276ACAGCAACGAAAAGA CAACAAATAAATAGT AATAGAGAAGCAACT CAGGAAGAGAAAAAT GCAGCATTGAACGAA
 T A T K R Q Q I N S N R E A T Q E E K N A A L N E
 1351TTAACTCAAGCAACC AACCATGCTTTAGAA CAAATCAATCAAGCA ACAACAAATGCTGAT GTTGATAACGCCAAA
 L T Q A T N H A L E Q I N Q A T T N A D V D N A K
 1426GGAGATGGTCTAAAT GCCATTAATCCAATT GCTCCTGTAACCTGTT GTTAAGCAAGCTGCA AGGGATGCTGTATCA
 G D G L N A I N P I A P V T V V K Q A A R D A V S
 1501CATGATGCACAACAA CATATCGCAGAGATC AATGCTAATCCTGAT GCGACTCAAGAAGAA AGACAAGCAGCAATT
 H D A Q Q H I A E I N A N P D A T Q E E R Q A A I
 1576GACAAAGTGAATGCT GCTGTAACCTGCAGCA AACACAAACATTTTA AACGCTAATACCAAT GCTGATGTTGAACAA
 D K V N A A V T A A N T N I L N A N T N A D V E Q
 1651GTAAGACAAATGCG ATTCAAGGAATACAA GCAATTACACCAGCT ACAAAGGTAAAAACA GATGCAAAAAATGCC
 V K T N A I Q G I Q A I T P A T K V K T D A K N A
 1726ATCGATAAAAAGTGCG GAAACGCAACATAAT ACGATATTTAATAAT AATGATGCGACGCTC GAAGAACAACAAGCA
 I D K S A E T Q H N T I F N N N D A T L E E Q Q A
 1801GCACAACAATTACTT GATCAAGCTGTAGCT ACAGCGAAGCAAAA ATTAAATGCAGCAGAT ACGAATCAAGAAGTT
 A Q A V L D Q A V A T A K Q N I N A A D T N Q E V
 1876GCACAAGCAAAAAGAT CAAGGTATGCAAAAAT ATAGTTGTGATTCAA CCAGCGACACAAGTT AAAACGGATGCTCGT
 A Q A K D Q G M Q N I V V I Q P A T Q V K T D A R

1951AATACTGTAATGAA AAAGCACGTGAGGCG ATAACAAATATCAAT GCTACACCTGGTGCG ACTCGAGAAGAGAAA
 N T V N E K A R E A I T N I N A T P G A T R E E K
 2026CAAGAAGCGATAGAT CGTGTCAATGCACTT AAAAAATAGAGCATTA ACTGATATTGGTGTG ACGTCTACTACTGCG
 Q E A I D R V N A L K N R A L T D I G V T S T T A
 2101ATGGTCAATAGCATT AGAGACGATGCAGTC AATCAAATCGGCGCT GTTCAACCGCATGTA ACTAAGAAGCAAACA
 M V N S I R D D A V N Q I G A V Q P H V T K K Q T
 2176GCTACAGGTGTATTA AACGATTTAGCAACT GCTAAAAAGCAAGAG ATTAATCAAAATACA AATGCAACAAC TGAA
 A T G V L N D L A T A K K Q E I N Q N T N A T T E
 2251GAAAAGCAAATGGCT TTAAATCAAGTGGAT CAAGATTTAGCAACG GCAATTAATAATATA AATCAAGCTGATACA
 E K Q M A L N Q V D Q D L A T A I N N I N Q A D T
 2326AACACGGAAGTAGAT CAAGCGCAACAATTA GTGGCACAAGCAATT AATGCGATTCAGCCA AATATTGTAAAAAAA
 N T E V D Q A Q Q L V A Q A I N A I Q P N I V K K
 2401CCTGCAGCATTAGCA CGGTACCTAAGTAAC TAAGAATTCGGCCGTC
 P A A L A R Y L S N *

H pKT25-SasC-NT

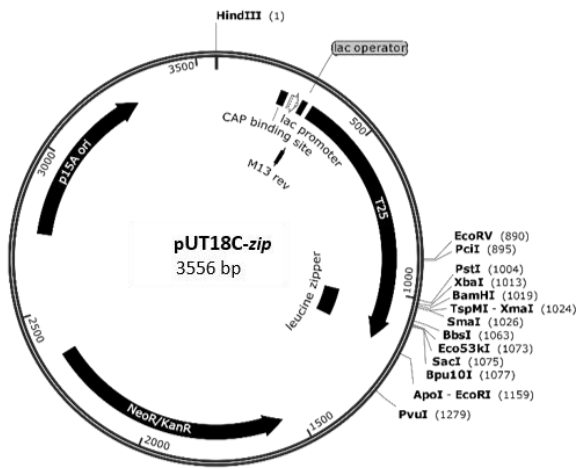
1 AGGCACCCCAGGCTT TACACTTTATGCTTC CGGCTCGTATGTTGT GTGGAATTGTGAGCG GATAACAATTTCACA

 76 CAGGAAACAGCTATG ACCATGCAGCAATCG CATCAGGCTGGTTAC GCAAACGCCGCCGAC CGGGAGTCTGGCATC
 >M T M Q Q S H Q A G Y A N A A D R E S G I
 151 CCCGACCCGCTACTC GATGGCATCAAGGCC GTGGCGAAGGAAAAA AACGCCACATTGATG TTCCGCCTGGTCAAC
 P A A V L D G I K A V A K E K N A T L M F R L V N
 226 CCCATTCCACCAGC CTGATTGCCGAAGGG GTGGCCACCAAAGGA TTGGGCGTGCACGCC AAGTCGTCCGATTGG
 P H S T S L I A E G V A T K G L G V H A K S S D W
 301 GGGTTGCAGGCGGGC TACATTCCCCTCAAC CCGAATCTTTCCAAA CTGTTCCGCCGTGCG CCCGAGGTGATCGCG
 G L Q A G Y I P V N P N L S K L F G R A P E V I A
 376 CGGGCCGACAACGAC GTCAACAGCAGCCTG GCGCATGGCCATACC GCGGTCGACCTGACG CTGTGCAAAGAGCGG
 R A D N D V N S S L A H G H T A V D L T L S K E R
 451 CTTGACTATCTGCGG CAAGCGGGCCTGGTC ACCGGCATGGCCGAT GGCGTGGTCCGCGAGC AACCCAGCAGGCTAC
 L D Y L R Q A G L V T G M A D G V V A S N H A G Y
 526 GAGCAGTTCGAGTTT CGCGTGAAGGAAACC TCGGACGGGCGTAT GCCGTGCAGTATCGC CGCAAGGGCGGGCAGC
 E Q F E F R V K E T S D G R Y A V Q Y R R K G G D
 601 GATTTTCGAGGCGGTC AAGGTGATCGGCAAT GCCGCCGGTATTCCA CTGACGGCGGATATC GACATGTTCCGCATT
 D F E A V K V I G N A A G I P L T A D I D M F A I
 676 ATGCCGCATCTGTCC AACTTCCGCGACTCG GCGCGCAGTTCGGTG ACCAGCGGCGATTCCG GTGACCGATTACCTG
 M P H L S N F R D S A R S S V T S G D S V T D Y L
 751 GCGCGCACGCGGCGG GCTGCAGGGTGCAGT CTAGAGGATCCTACG GATAATAATGTACAA AGCGATACTAATCAA
 A R T R R A A G S T L E D P T D N N V Q S D T N Q
 826 GCAACACCTGTAAT TCACAAGATAAAGAT GTTGCTAATAACAGA GGTTTAGCAAATAGT GCGCAGAATACACCT
 A T P V N S Q D K D V A N N R G L A N S A Q N T P
 901 AATCAATCTGCAACA ACCAATCAAGCAACG AATCAAGCATTGGTT AATCATAATAATGGT AGTATAGTAAATCAA
 N Q S A T T N Q A T N Q A L V N H N N G S I V N Q
 976 GCTACGCCAACATCA GTGCAATCAAGTACG CCTTCAGCACAAAAC AATAATCATAACAGAT GGCAATACAACAGCA
 A T P T S V Q S S T P S A Q N N N H T D G N T T A
 1051ACTGAGACAGTGTCA AACGCTAATAATAAT GATGCAGTGTGCAAT AATACCACATTAAT GTACCAAATAAAAACA
 T E T V S N A N N N D A V S N N T T L N V P N K T
 1126AATGAAAATGGTTCA GGAGGACATCTAACT TTAAAGGAAATTCAA GAAGATGTTTCGTCAT TCTTCAGATAAACCA
 N E N G S G G H L T L K E I Q E D V R H S S D K P
 1201GAGCTAGTTGCAATT GCTGAACCAGCATCT AATAGACCGAAAAAG AGAAGTAGACGTGCG GCACCCGGCAGATCCT
 E L V A I A E P A S N R P K K R S R R A A P A D P
 1276AATGCAACTCCAGCA GATCCAGCGGCTGCA GCGGCAGGAAACGGT GGTGCACCAGTAGCA ATTACAGCGCCATAC
 N A T P A D P A A A A A G N G G A P V A I T A P Y
 1351ACGCCGACAATGAT CCTAATGCCAATAAT GCAGGACAAAATGCA CCTAACGAAGTGCTG TCTTTTGATGACAAAT
 T P T T D P N A N N A G Q N A P N E V L S F D D N
 1426GGTATTAGACCAAGT ACCAACCCTTCTGTA CCATCAGTAACAGTT GTTGATAATTTACCA GGCTTTACACTTATC
 G I R P S T N R S V P S V T V V D N L P G F T L I
 1501AATGGTGGTAAAGTA GGTGTGTTTAGTCAT GCAATGGTAAGAACG AGCATGTTTGATTCA GGAGATAATAAGAAC
 N G G K V G V F S H A M V R T S M F D S G D N K N
 1576TATCAAGCACAAGGC AATGTAATTGCATTA GGTTCGTATTAATGGA ACTGATACGAATGAC CATGGCGATTTTAAAT
 Y Q A Q G N V I A L G R I N G T D T N D H G D F N

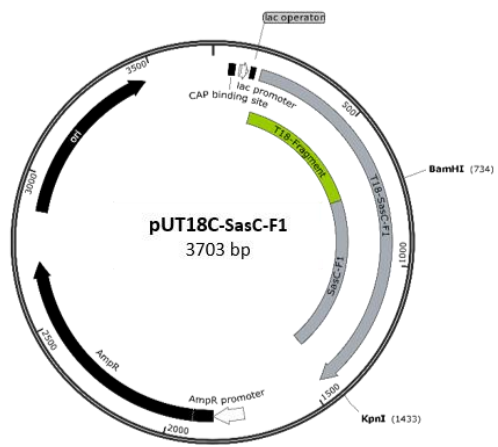
1651GGTATCGAGAAAACA TTAACAGTAAATCCG AATTCTGAATTAATC TTTGAATTTAATACA ATGACTACTAAAAAC
G I E K T L T V N P N S E L I F E F N T M T T K N
1726GGTCAAGGCGCAACA AATGTTATTATCAAA AATGCTGATACTAAT GATACGATTGCTGAA AAGACTGTTGAAGGC
G Q G A T N V I I K N A D T N D T I A E K T V E G
1801GGTCCAACTTTGGCT TTATTTAAAGTACCT GATAATGTGAGAAAT CTCAAAATTC AATTT GTATCTAAAAATGAC
G P T L R L F K V P D N V R N L K I Q F V S K N D
1876GCAATAACAGATGCG CGTGGCATTATCAA CTAAAAGATGGTTAC AAATACTATAGCTTT GTTGACTCTATCGGA
A I T D A R G I Y Q L K D G Y K Y Y S F V D S I G
1951CTTCATTCTGGGTCA CATGTTTATGTTGAA AGACGAACAATGGAA CCCACAGCAACGAAT AATAAAGAATTTACA
L H S G S H V Y V E R R T M E P T A T N N K E F T
2026GTTACAACATCACTA AAAAATAATGGTAAT TCTGGTGCTTCTTTA GACACAGATGAATTT GTTTATAAAAATTCAA
V T T S L K N N G N S G A S L D T D E F V Y K I Q
2101TTACCTGAAGGGGTA GAATATGTGAACAAT TCATTGACTAAAGAT TTTCCAAGTAACAAT TCAGGCGTTGATGTT
L P E G V E Y V N N S L T K D F P S N N S G V D V
2176AATGATATGAATGTT ACATATGATGCAGCA AATCGTGTGATAACA ATTTAAAGCACTGGT GGTGGCACAACGAAT
N D M N V T Y D A A N R V I T I K S T G G G T T N
2251TCACCTGCAGACTA ATGCCTGATAAAAATA TTGGATTTAAAGTAT AAGTTGCGTGTAAAT AATGTACCGACACCA
S P A R L M P D K I L D L K Y K L R V N N V P T P
2326AGAACAGTAACATTT AATGATACATTAACG TATAAAAACATATACA CAAGATTCATTAAT TCAGCTGCAGAAAGT
R T V T F N D T L T Y K T Y T Q D F I N S A A E S
2401CATACTGTAAGTACA AATCCATATACTATC GATATCATCATGAAT AAAGATGCATTACAA GCCGAAGTTGACAGA
H T V S T N P Y T I D I I M N K D A L Q A E V D R
2476CGTATTCAACAAGCT GATTATACATTTGCA TCATTAGATATCTTT AATGATCTTAAAAAA CGTGCACAAACAATT
R I Q Q A D Y T F A S L D I F N D L K K R A Q T I
2551TTAGCTGAAAATCGT AACAATGTACCATTA AATAAAAAGAGTATCT CAAGCAGATATTGAT ACATTAACATAATCAG
L A E N R N N V P L N K R V S Q A D I D T L T N Q
2626ATGCAACATACGTTA ATTCGAAGTTTGGTA CCTAAGTAAC TAAGA ATTCGGCCGTCGTTT TACAACGTCGTGACT
M Q H T L I R S L V P K *

A1.2.3 Derivate von pUT18C

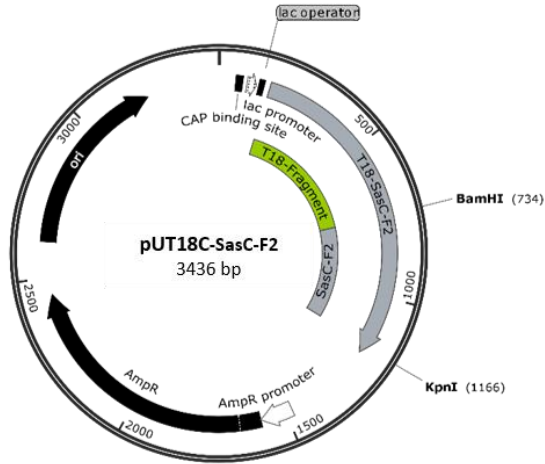
A pUT18C-zip



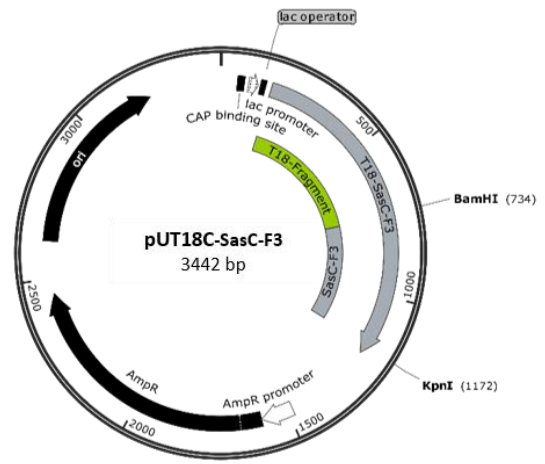
B pUT18C-SasC-F1



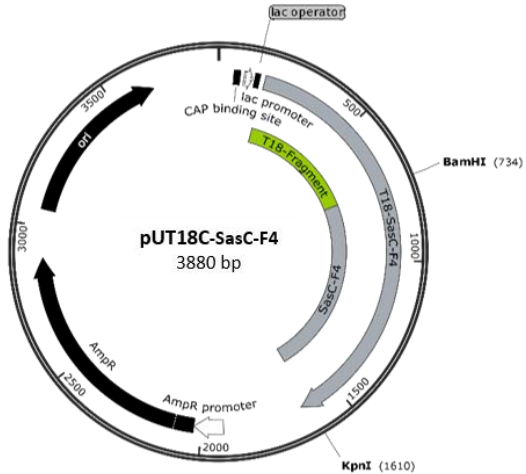
C pUT18C-SasC-F2



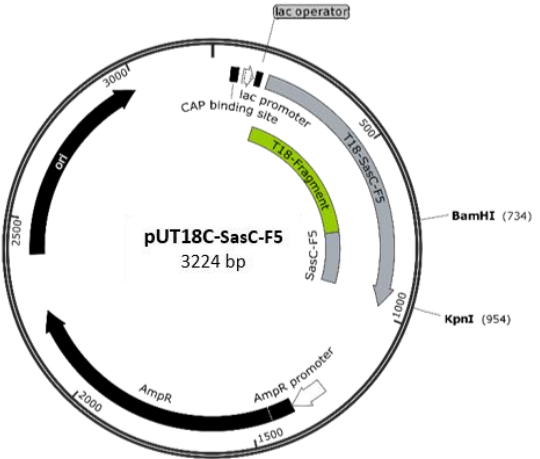
D pUT18C-SasC-F3



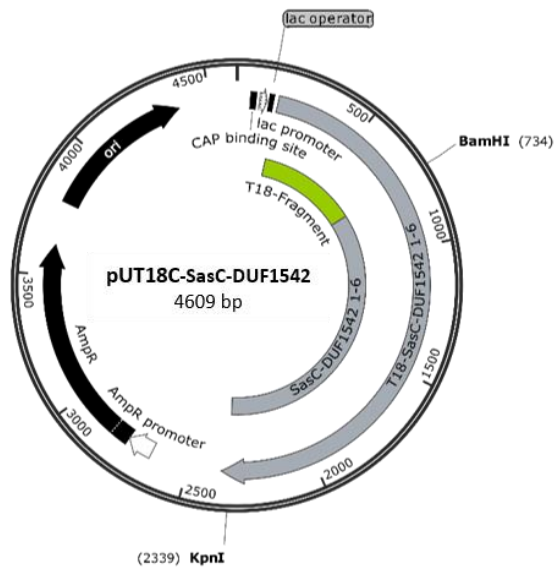
E pUT18C-SasC-F4



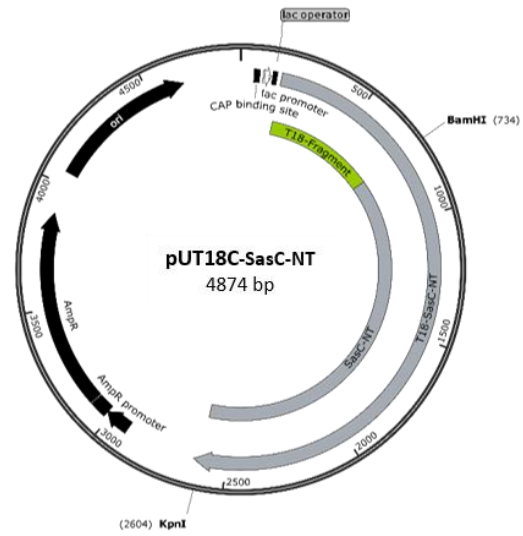
F pUT18C-SasC-F5



G pUT18C-SasC-DUF1542 1-6



H pUT18C-SasC-NT



A pUT18C-*zip*

```

1  CAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCA AGCTTAGCCGCCAGC GAGGCCACGGGCGGC CTGGATCGCGAACGC
   >M  T M I T P S L A A S E A T G G L D R E R
76  ATCGACTTGTGTGG AAAATCGCTCGCGCC GCGCCTCGTCCGCA GTGGGCACCGAGGCG CGTCGCCAGTTCGCC
   I D L L W K I A R A G A R S A V G T E A R R Q F R
151 TACGACGGCGACATG AATATCGCGGTGATC ACCGATTCGAGCTG GAAGTGCCAATGCG CTGAACAGGCGGGCG
   Y D G D M N I G V I T D F E L E V R N A L N R R A
226 CACGCCGTGCGCGCG CAGGACGTGGTCCAG CATGGCACTGAGCAG AACAACTCTTTCCCG GAGGCAGATGAGAAG
   H A V G A Q D V V Q H G T E Q N N P F P E A D E K
301 ATTTTCGTGCTATCG GCCACCGGTGAAAGC CAGATGCTCAGCGC GGGCAACTGAAGGAA TACATTGGCCAGCAG
   I F V V S A T G E S Q M L T R G Q L K E Y I G Q Q
376 CGCGGCGAGGGCTAT GTCTTCTACGAGAAC CGTGATACGGCGTG GCGGGGAAAAGCCTG TTCGACGATGGGCTG
   R G E C G Y V F Y E N R A A Y G V A G K S L F D D G L
451 GGACCCGCGCCGCGG GTGCCGAGCGGACGT TCGAAGTTCGCGCG GATGTACTGGAACG GTGCCGGCTCACCC
   G A A P G V P S G R S K F S P D V L E T V P A S P
526 GGATTGCGGCGGCCG TCGCTGGGCGCAGTG GAACGCCACTGCAGG TCGACTCTAGAGGAT CCCCGGTACCTATC
   G L R R P S L G A V E R H C R S T L E D P R V P I
601 CAGCGTATGAAACAG CTGGAAGACAAAGTT GAAGAGCTCCTGAGC AAAAACTACCACCTG GAGAACGAAGTTGCG
   Q R M K Q L E D K V E E L L S K N Y H L E N E V A
676 CGCCTGAAAAAACTG GTGGGTGAACGTGGG AATTCATCGATATAA CTAAGTAATATGGTG CACTCTCAGTACAAT
   R L K K L V G E R G N S S I *

```

B pUT18C-SasC-F1

```

1  CAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCA AGCTTAGCCGCCAGC GAGGCCACGGGCGGC CTGGATCGCGAACGC
   >M  T M I T P S L A A S E A T G G L D R E R
76  ATCGACTTGTGTGG AAAATCGCTCGCGCC GCGCCTCGTCCGCA GTGGGCACCGAGGCG CGTCGCCAGTTCGCC
   I D L L W K I A R A G A R S A V G T E A R R Q F R
151 TACGACGGCGACATG AATATCGCGGTGATC ACCGATTCGAGCTG GAAGTGCCAATGCG CTGAACAGGCGGGCG
   Y D G D M N I G V I T D F E L E V R N A L N R R A
226 CACGCCGTGCGCGCG CAGGACGTGGTCCAG CATGGCACTGAGCAG AACAACTCTTTCCCG GAGGCAGATGAGAAG
   H A V G A Q D V V Q H G T E Q N N P F P E A D E K
301 ATTTTCGTGCTATCG GCCACCGGTGAAAGC CAGATGCTCAGCGC GGGCAACTGAAGGAA TACATTGGCCAGCAG
   I F V V S A T G E S Q M L T R G Q L K E Y I G Q Q

```

376 CGCGGCGAGGGCTAT GTCTTCTACGAGAAC CGTGCATACGGCGTG GCGGGGAAAAGCCTG TTCGACGATGGGCTG
 R G E G Y V F Y E N R A Y G V A G K S L F D D G L
 451 GGAGCCGCGCCCGGC GTGCCGAGCGGACGT TCGAAGTTCTCGCCG GATGTACTGGAAACG GTGCCGGCGTCACCC
 G A A P G V P S G R S K F S P D V L E T V P A S P
 526 GGATTGCGGCGGCCG TCGCTGGGCGCAGTG GAACGCCACTGCAGG TCGACTCTAGAGGAT CCTACGGATAATAAT
 G L R R P S L G A V E R H C R S T L E D P T D N N
 601 GTACAAAGCGATACT AATCAAGCAACACCT GTAAATTCACAAGAT AAAGATGTTGCTAAT AACAGAGGTTTAGCA
 V Q S D T N Q A T P V N S Q D K D V A N N R G L A
 676 AATAGTGCAGCAAT ACACCTAATCAATCT GCAACAACCAATCAA GCAACGAATCAAGCA TTGGTTAATCATAAT
 N S A Q N T P N Q S A T T N Q A T N Q A L V N H N
 751 AATGGTAGTATAGTA AATCAAGCTACGCCA ACATCAGTGAATCA AGTACGCCTTCAGCA CAAAACAATAATCAT
 N G S I V N Q A T P T S V Q S S T P S A Q N N N H
 826 ACAGATGGCAATACA ACAGCAACTGAGACA GTGTCAAACGCTAAT AATAATGATGCAGTG TCGAATAATACCACA
 T D G N T T A T E T V S N A N N N D A V S N N T T
 901 TTAATGTACCAAAAT AAAACAAATGAAAAT GGTTCAGGAGGACAT CTAAC TTAAAGGAA ATTCAGAAGATGTT
 L N V P N K T N E N G S G G H L T L K E I Q E D V
 976 CGTATTCTTTCAGAT AAACCAGAGCTAGTT GCAATTGCTGAACCA GCATCTAATAGACCG AAAAAGAGASRTAGA
 R H S S D K P E L V A I A E P A S N R P K K R S R
 1051CGTGCGGCACCGGCA GATCCTAATGCAACT CCAGCAGATCCAGCG GCTGCAGCGGCAGGA AACGGTGGTGCACCA
 R A A P A D P N A T P A D P A A A A A G N G G A P
 1126GTAGCAATTACAGCG CCATACACGCCGACA ACTGATCCTAATGCC AATAATGCAGGACAA AATGCACCTAACGAA
 V A I T A P Y T P T T D P N A N N A G Q N A P N E
 1201GTGCTGTCTTTTGAT GACAATGGTATTAGA CCAAGTACCAACCGT TCTGTACCATCAGTA ACAGTTGTTGATAAT
 V L S F D D N G I R P S T N R S V P S V T V V D N
 1276TGGTACCGAGCTCGA ATTCATCGATATAAC TAAGTAATATGGTGC ACTCTCAGTACAATC TGCTCTGATGCCGCA
 W Y R A R I H R Y N *

C pUT18C-SasC-F2

1 CAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCA AGCTTAGCCGCCAGC GAGGCCACGGGCGGC CTGGATCGCGAACGC
 >M T M I T P S L A A S E A T G G L D R E R
 76 ATCGACTTGTGTGG AAAATCGCTCGCGCC GCGGCCGTTCCGCA GTGGGCACCGAGGCG CGTCGCCAGTTCGCC
 I D L L W K I A R A G A R S A V G T E A R R Q F R
 151 TACGACGGCGACATG AATATCGGCGTGATC ACCGATTTTCGAGCTG GAAGTGCGCAATGCG CTGAACAGGCGGGCG
 Y D G D M N I G V I T D F E L E V R N A L N R R A
 226 CACGCCGTCGGCGG CAGGACGTGGTCCAG CATGGCACTGAGCAG AACAAATCCTTTCCC GAGGCAGATGAGAAG
 H A T G A Q D V V Q H G T E Q N N P F P E A A D E K
 301 ATTTTCGTCGTATCG GCCACCGTGAAAGC CAGATGCTCACGCGC GGGCAACTGAAGGAA EATTTGGCCAGCAG
 I F V V S A T G E S Q M L T R G Q L K E Y I G Q Q
 376 CGCGGCGAGGGCTAT GTCTTCTACGAGAAC CGTGCATACGGCGTG GCGGGGAAAAGCCTG TTCGACGATGGGCTG
 R G E G Y V F Y E N R A Y G V A G K S L F D D G L
 451 GGAGCCGCGCCCGGC GTGCCGAGCGGACGT TCGAAGTTCTCGCCG GATGTACTGGAAACG GTGCCGGCGTCACCC
 G A A P G V P S G R S K F S P D V L E T V P A S P
 526 GGATTGCGGCGGCCG TCGCTGGGCGCAGTG GAACGCCACTGCAGG TCGACTCTAGAGGAT CCTAGTCATGCAATG
 G L R R P S L G A V E R H C R S T L E D P S H A M
 601 GTAAGAACGAGCATG TTTGATTCAGGAGAT AATAAGAACTATCAA GCACAAGGCAATGTA ATTCATTAGGTCGT
 V R T S M F D S G D N K N Y Q A Q G N V I A L G R
 676 ATTAATGGAAGTATG ACGAATGACCATGGC GATTTTAATGGTATC GAGAAAACATTAACA GTAAATCCGAATTCT
 I N G T D T N D H G D F N G I E K T L T V N P N S
 751 GAATTAATCTTTGAA TTTAATACAATGACT ACTAAAAACGGTCAA GGCGCAACAAATGTT ATTATCAAAAATGCT
 E L I F E F N T M T T K N G Q G A T N V I I K N A
 826 GATACTAATGATACG ATTGCTGAAAAGACT GTTGAAGGCGGTCCA ACTTTGCGTTTATTT AAAGTACCTGATAAT
 D T N D T I A E K T V E G G P T L R L F K V P D N
 901 GTGAGAAATCTCAAA ATTCAATTTGTATCT AAAAATGACGCAATA ACAGATGCGCGTGGC ATTTATCAACTAAAA
 V R N L K I Q F V S K N D A I T D A R G I Y Q L K
 976 GATGGTTACAATAAC TATAGCTTTGTTGAC TCTAGGTACCGAGCT CGAATTCATCGATAT AACTAAGTAATATGG
 D G Y K Y Y S F V D S R Y R A R I H R Y N *

D pUT18C-SasC-F3

1 CAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCA AGCTTAGCCGCCAGC GAGGCCACGGGCGGC CTGGATCGCGAACGC
>M T M I T P S L A A S E A T G G L D R E R
76 ATCGACTTGTGTGG AAAATCGCTCGCGCC GCGGCCGTTCGCCA GTGGGCACCGAGGCG CGTCGCCAGTTCGCC
I D L L W K I A R A G A R S A V G T E A R R Q F R
151 TACGACGGCGACATG AATATCGGCGTGATC ACCGATTTTCGAGCTG GAAGTGCGCAATGCG CTGAACAGGGCGGGCG
Y D G D M N I G V I T D F E L E V R N A L N R R A
226 CACGCCGTGCGCGCG CAGGACGTGGTCCAG CATGGCACTGAGCAG AACCAATCCTTTCCCG GAGGCAGATGAGAAG
H A V G A Q D V V Q H G T E Q N N P F P E A D E K
301 ATTTTCGTCGTATCG GCCACCGGTGAAAGC CAGATGCTCAGCGCG GGGCAACTGAAGGAA TACATTGGCCAGCAG
I F V V S A T G E S Q M L T R G Q L K E Y I G Q Q
376 CGCGGCGAGGGCTAT GTCTTCTACGAGAAC CGTGCATACGGCGTG GCGGGGAAAAGCCTG TTCGACGATGGGCTG
R G E G Y V F Y E N R A Y G V A G K S L F D D G L
451 GGAGCCGCGCCCGGC GTGCCGAGCGGACGT TCGAAGTTCTCGCCG GATGTACTGGAAACG GTGCCGGCGTCACCC
G A A P G V P S G R S K F S P D V L E T V P A S P
526 GGATTGCGGCGGCCG TCGCTGGGCGCAGTG GAACGCCACTGCAGG TCGACTCTAGAGGAT CCGTCACATGTTTAT
G L R R P S L G A V E R H C R S T L E D P S H V Y
601 GTTGAAGACGAACA ATGGAACCCACAGCA ACGAATAATAAAGAA TTTACAGTTACAACA TCACTAAAAAATAAT
V E R R T M E P T A T N N K E F T V T T S L K N N
676 GGTAATTCTGGTGCT TCTTTAGACACAGAT GAATTTGTTTATAAAA ATTCAATTACCTGAA GGGGTAGAATATGTG
G N S G A S L D T D E F V Y K I Q L P E G V E Y V
751 AACAAATTCATTGACT AAAGATTTTCCAAGT AACAAATTCAGGCGTT GATGTTAATGATATG AATGTTACATATGAT
N N S L T K D F P S N N S G V D V N D M N V T Y D
826 GCAGCAAATCGTGTG ATAACAATTA AAAAGC ACTGGTGGTGGCACA ACGAATCACCTGCA CGACTAATGCCTGAT
A A N R V I T I K S T G G G T T N S P A R L M P D
901 AAAATATTGGATTTA AAGTATAAGTTGCGT GTTAATAATGTACCG ACACCAAGAACAGTA ACATTTAATGATACA
K I L D L K Y K L R V N N V P T P R T V T F N D T
976 TTAACGTATAAAAACA TATACACAAGATTTT ATTAATTCAGGGTAC CGAGCTCGAATTCAT CGATATAACTAAGTA
L T Y K T Y T Q D F I N S G Y R A R I H R Y N *

E pUT18C-SasC-F4

1 CAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCA AGCTTAGCCGCCAGC GAGGCCACGGGCGGC CTGGATCGCGAACGC
>M T M I T P S L A A S E A T G G L D R E R
76 ATCGACTTGTGTGG AAAATCGCTCGCGCC GCGGCCGTTCGCCA GTGGGCACCGAGGCG CGTCGCCAGTTCGCC
I D L L W K I A R A G A R S A V G T E A R R Q F R
151 TACGACGGCGACATG AATATCGGCGTGATC ACCGATTTTCGAGCTG GAAGTGCGCAATGCG CTGAACAGGGCGGGCG
Y D G D M N I G V I T D F E L E V R N A L N R R A
226 CACGCCGTGCGCGCG CAGGACGTGGTCCAG CATGGCACTGAGCAG AACCAATCCTTTCCCG GAGGCAGATGAGAAG
H A V G A Q D V V Q H G T E Q N N P F P E A D E K
301 ATTTTCGTCGTATCG GCCACCGGTGAAAGC CAGATGCTCAGCGCG GGGCAACTGAAGGAA TACATTGGCCAGCAG
I F V V S A T G E S Q M L T R G Q L K E Y I G Q Q
376 CGCGGCGAGGGCTAT GTCTTCTACGAGAAC CGTGCATACGGCGTG GCGGGGAAAAGCCTG TTCGACGATGGGCTG
R G E G Y V F Y E N R A Y G V A G K S L F D D G L
451 GGAGCCGCGCCCGGC GTGCCGAGCGGACGT TCGAAGTTCTCGCCG GATGTACTGGAAACG GTGCCGGCGTCACCC
G A A P G V P S G R S K F S P D V L E T V P A S P
526 GGATTGCGGCGGCCG TCGCTGGGCGCAGTG GAACGCCACTGCAGG TCGACTCTAGAGGAT CCTAGTCATGCAATG
G L R R P S L G A V E R H C R S T L E D P S H A M
601 GTAAGAACGAGCATG TTTGATTCAGGAGAT AATAAGAACTATCAA GCACAAGGCAATGTA ATTGCATTAGGTCGT
V R T S M F D S G D N K N Y Q A Q G N V I A L G R
676 ATTAATGGAACGTGAT ACGAATGACCATGGC GATTTTAATGGTATC GAGAAAACATTAACA GTAAATCCGAATTCT
I N G T D T N D H G D F N G I E K T L T V N P N S
751 GAATTAATCTTTGAA TTTAATACAATGACT ACTAAAAACGGTCAA GGCGCAACAAATGTT ATTATCAAAAATGCT
E L I F E F N T M T T K N G Q G A T N V I I K N A
826 GATACTAATGATACG ATTGCTGAAAAGACT GTTGAAGGCGGTCCA ACTTTGCGTTTATTT AAAGTACCTGATAAT
D T N D T I A E K T V E G G P T L R L F K V P D N
901 GTGAGAAATCTCAAAA ATTCAATTTGTATCT AAAAAATGACGCAATA ACAGATGCGCGTGGC ATTTATCAACTAAAA
V R N L K I Q F V S K N D A I T D A R G I Y Q L K

976 GATGGTTACAAATAC TATAGCTTTGTTGAC TCTATCGGACTTCAT TCTGGGTCACATGTT TATGTTGAAAGACGA
 D G Y K Y Y S F V D S I G L H S G S H V Y V E R R
 1051ACAATGGAACCCACA GCAACGAATAATAAAA GAATTTACAGTTACA ACATCACTAAAAAAT AATGGTAATTCTGGT
 T M E P T A T N N K E F T V T T S L K N N G N S G
 1126GCTTCTTTAGACACA GATGAATTTGTTTAT AAAATTC AATTACCT GAAGGGGTAGAATAT GTGAACAATTCATG
 A S L D T D E F V Y K I Q L P E G V E Y V N N S L
 1201ACTAAAGATTTTCCA AGTAACAATTCAGGC GTTGATGTTAATGAT ATGAATGTTACATAT GATGCAGCAAATCGT
 T K D F P S N N S G V D V N D M N V T Y D A A N R
 1276GTGATAACAATTA AAA AGCACTGGTGGTGGC ACAACGAATTCACCT GCACGACTAATGCCT GATAAAAATATTGGAT
 V I T I K S T G G G T T N S P A R L M P D K I L D
 1351TTAAAGTATAAGTTG CGTGTTAATAATGTA CCGACACCAAGAACA GTAACATTTAATGAT ACATTAACGTATAAAA
 L K Y K L R V N N V P T P R T V T F N D T L T Y K
 1426ACATATACACAAGAT TTCATTAATTCAGGG TACCGAGCTCGAATT CATCGATATAACTAA GTAATATGGTGCCT
 T Y T Q D F I N S G Y R A R I H R Y N *

F pUT18C-SasC-F5

1 CAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCA AGCTTAGCCGCCAGC GAGGCCACGGGCGGC CTGGATCGCGAACGC
 >M T M I T P S L A A S E A T G G L D R E R
 76 ATCGACTTGTGTGG AAAATCGCTCGCGCC GCGGCCGTTCCGCA GTGGGCACCGAGGCG CGTCGCCAGTTCGCG
 I D L L W K I A R A G A R S A V G T E A R R Q F R
 151 TACGACGGCGACATG AATATCGGCGTGATC ACCGATTTTCGAGCTG GAAGTGC GCAATGCG CTGAACAGGCGGGCG
 Y D G D M N I G V I T D F E L E V R N A L N R R A
 226 CACGCCGTCGGCGCG CAGGACGTGGTCCAG CATGGCACTGAGCAG AACAAATCCTTTCCCG GAGGCAGATGAGAAG
 H A V G A Q D V V Q H G T E Q N N P F P E A D E K
 301 ATTTTCGTCGTATCG GCCACCGGTGAAAGC CAGATGCTCACGCGC GGGCAACTGAAGGAA TACATTGGCCAGCAG
 I F V V S A T G E S Q M L T R G Q L K E Y I G Q Q
 376 CGCGGCGAGGGCTAT GTCTTCTACGAGAAC CGTGCATACGGCGTG GCGGGGAAAAGCCTG TTCGACGATGGGCTG
 R G E G Y V F Y E N R A Y G V A G K S L F D D G L
 451 GGAGCCGCGCCCGGC GTGCCGAGCGGACGT TCGAAGTTCCTCGCCG GATGTACTGGAAACG GTGCCGGCGTCACCC
 G A A P G V P S G R S K F S P D V L E T V P A S P
 526 GGATTGCGGCGGCCG TCGCTGGGCGCAGTG GAACGCCACTGCAGG TCGACTCTAGAGGAT CCGAATAAAGATGCA
 G L R R P S L G A V E R H C R S T L E D P N K D A
 601 TTACAAGCCGAAGTT GACAGACGTATTCAA CAAGCTGATTATACA TTTGCATCATTAGAT ATCTTTAATGATCTT
 L Q A E V D R R I Q Q A D Y T F A S L D I F N D L
 676 AAAAAACGTGCACAA ACAATTTTAGCTGAA AATCGTAACAATGTA CCATTAATAAAAAGA GTATCTCAAGCAGAT
 K K R A Q T I L A E N R N N V P L N K R V S Q A D
 751 ATTGATACATTA ACT AATCAGATGCAACAT ACGTTAATTCGAAGT TTGGTACCGAGCTCG AATTCATCGATATAA
 I D T L T N Q M Q H T L I R S L V P S S N S S I *

G pUT18C-SasC-DUF1542 1-6

1 CAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCA AGCTTAGCCGCCAGC GAGGCCACGGGCGGC CTGGATCGCGAACGC
 >M T M I T P S L A A S E A T G G L D R E R
 76 ATCGACTTGTGTGG AAAATCGCTCGCGCC GCGGCCGTTCCGCA GTGGGCACCGAGGCG CGTCGCCAGTTCGCG
 I D L L W K I A R A G A R S A V G T E A R R Q F R
 151 TACGACGGCGACATG AATATCGGCGTGATC ACCGATTTTCGAGCTG GAAGTGC GCAATGCG CTGAACAGGCGGGCG
 Y D G D M N I G V I T D F E L E V R N A L N R R A
 226 CACGCCGTCGGCGCG CAGGACGTGGTCCAG CATGGCACTGAGCAG AACAAATCCTTTCCCG GAGGCAGATGAGAAG
 H A V G A Q D V V Q H G T E Q N N P F P E A D E K
 301 ATTTTCGTCGTATCG GCCACCGGTGAAAGC CAGATGCTCACGCGC GGGCAACTGAAGGAA TACATTGGCCAGCAG
 I F V V S A T G E S Q M L T R G Q L K E Y I G Q Q
 376 CGCGGCGAGGGCTAT GTCTTCTACGAGAAC CGTGCATACGGCGTG GCGGGGAAAAGCCTG TTCGACGATGGGCTG
 R G E G Y V F Y E N R A Y G V A G K S L F D D G L
 451 GGAGCCGCGCCCGGC GTGCCGAGCGGACGT TCGAAGTTCCTCGCCG GATGTACTGGAAACG GTGCCGGCGTCACCC
 G A A P G V P S G R S K F S P D V L E T V P A S P
 526 GGATTGCGGCGGCCG TCGCTGGGCGCAGTG GAACGCCACTGCAGG TCGACTCTAGAGGAT CCTACTTTAATTCGA
 G L R R P S L G A V E R H C R S T L E D P T L I R

601 AGTGTGATGCTGAA AATGCAGTAAATCAA AAAGCTGATCAAATG GAAGATTAGTAAAT CAAAATGATGAACTG
S V D A E N A V N Q K A D Q M E D L V N Q N D E L
676 ACAGATGAAGAAAA CAAGCAGCAATACAA GTTATCGAGGAACAT AAAGGCAATATTATT GGTGATATTGGTGAT
T D E E K Q A A I Q V I E E H K G N I I G D I G D
751 CAAACGACTGATGAT GGCCTTACTAGAATC AAAGATCAAGGTATA CAGACCTTAAGTGGG GATACTGCAACACCG
Q T T D D G V T R I K D Q G I Q T L S G D T A T P
826 GTTGTAAACCAAAT GCTAAAAAGCAATA CGTGATAAAGCAACG AAACAAAGGGAAATT ATCAATGCAACACCA
V V K P N A K K A I R D K A T K Q R E I I N A T P
901 GATGCTACTGAAGGC GAGATTCAAGATGCA ATAAATCAATTAGCT ACGGATGAAACAGAT GCTATTGATAATGTT
D A T E G E I Q D A I N Q L A T D E T D A I D N V
976 ACGAATGCTACTACA AATGCTGACGTTGAA ACAGCTAAAAATAAT GGCATCAATACTATT GGAGCAGTTGTTCCCT
T N A T T N A D V E T A K N N G I N T I G A V V P
1051CAAGTAACCTCATAAA AAAGCTGCAAGAGAT GCAATTAACCAAGCA ACAGCAACGAAAAAGA CAACAAATAAATAGT
Q V T H K K A A R D A I N Q A T A T K R Q Q I N S
1126AATAGAGAAGCAACT CAGGAAGAGAAAAAT GCAGCATTGAACGAA TTAACTCAAGCAACC AACCATGCTTTAGAA
N R E A T Q E E K N A A L N E L T Q A T N H A L E
1201CAAATCAATCAAGCA ACAACAAATGCTGAT GTTGATAACGCCAAA GGAGATGGTCTAAAT GCCATTAATCCAATT
Q I N Q A T T N A D V D N A K G D G L N A I N P I
1276GCTCCTGTAACGTGT GTTAAGCAAGCTGCA GGGGATGCTGTATCA CATGATGCACAACAA CATATCGCAGAGATC
A P V T V V K Q A A R D A V S H D A Q Q H I A E I
1351AATGCTAATCCTGAT GCGACTCAAGAAGAA AGACAAGCAGCAATT GACAAAGTGAATGCT GCTGTAACCTGCAGCA
N A N P D A T Q E E R Q A A I D K V N A A V T A A
1426AACACAAACATTTTA AACGCTAATACCAAT GCTGATGTTGAACAA GTAAAGACAAATGCG ATTCAAGGAATACAA
N T N I L N A N T N A D V E Q V K T N A I Q G I Q
1501GCAATTACACCAGCT ACAAAAGTAAAAACA GATGCAAAAAATGCC ATCGATAAAAAGTGGG GAAACGCAACATAAT
A I T P A T K V K T D A K N A I D K S A E T Q H N
1576ACGATATTTAATAAT AATGATGCGACGCTC GAAGAACAACAAGCA GCACAACAATTACTT GATCAAGCTGTAGCT
T I F N N N D A T L E E Q Q A A Q Q L L D Q A V A
1651ACAGCGAAGCAAAAT ATTAATGCAGCAGAT ACGAATCAAGAAGTT GCACAAGCAAAAGAT CAAGGTATGCAAAAT
T A K Q N I N A A D T N Q E V A Q A K D Q G M Q N
1726ATAGTTGTGATTCAA CCAGCGACACAAGTT AAAACGGATGCTCGT AATACTGTAAATGAA AAAGCACGTGAGGCG
I V V I Q P A T Q V K T D A R N T V N E K A R E A
1801ATAACAAATTTAGCA GCACTTAAAAATAGA GCATTAACCTGATATT GGTGTGACGTCTACT ACTGCGATGGTCAAT
I T N L A A L K N R A L T D I G V T S T T A M V N
1876AGCATTAGAGACGAT GCAGTCAATCAAATC GCGCTGTTCAACCG CATGTAAC TAAGAAG CAAACAGCTACAGGT
S I R D D A V N Q I G A V Q P H V T K K Q T A T G
1951GTATTAACGATTTA GCAACTGCTAAAAAG CAAGAGATTAATCAA AATACAAATGCAACA ACTGAAGAAAAGCAA
V L N D L A T A K K Q E I N Q N T N A T T E E K Q
2026ATGGCTTTAAATCAA GTGGATCAAGATTTA GCAACGGCAATTAAT AATATAATCAAGCT GATACAAACACGGAA
M A L N Q V D Q D L A T A I N N I N Q A D T N T E
2101GTAGATCAAGCGCAA CAATTAGGTGCACAA GCAATTAATGCGATT CAGCCAAATATTGTA AAAAACCTGCAGCA
V D Q A Q Q L G A Q A I N A I Q P N I V K K P A A
2176TTAGCACGGTACCGA GCTCGAATTCATCGA TATAACTAAGTAATA TGGTGCCTCTCAGT ACAATCTGCTCTGAT
L A R Y R A R I H R Y N *

H pUT18C-SasC-NT

1 CAGGAAACAGCTATG ACCATGATTACGCCA AGCTTAGCCGCCAGC GAGGCCACGGGCGGC CTGGATCGCGAACGC
>M T M I T P S L A A S E A T G G L D R E R
76 ATCGACTTGTGTGG AAAATCGCTCGCGCC GCGGCCGTTCCGCA GTGGGCACCGAGGCG CGTCGCCAGTTCGCG
I D L L W K I A R A G A R S A V G T E A R R Q F R
151 TACGACGGCGACATG AATATCGGCGTGATC ACCGATTTTCGAGCTG GAAGTGCGCAATGCG CTGAACAGGCGGGCG
Y D G D M N I G V I T D F E L E V R N A L N R R A
226 CACGCCGTCGGCGCG CAGGACGTGGTCCAG CATGGCACTGAGCAG AACAACTCTTTCCCG GAGGCAGATGAGAAG
H A V G A Q D V V Q H G T E Q N N P F P E A D E K
301 ATTTTCGTCGTATCG GCCACCGGTGAAAGC CAGATGCTCAGCGC GGGCAACTGAAGGAA TACATTGGCCAGCAG
I F V V S A T G E S Q M L T R G Q L K E Y I G Q Q
376 CGCGGCGAGGGCTAT GTCTTCTACGAGAAC CGTGATACGGCGTG GCGGGGAAAAGCCTG TTCGACGATGGGCTG
R G E G Y V F Y E N R A Y G V A G K S L F D D G L
451 GGAGCCGCGCCCGGC GTGCCGAGCGGACGT TCGAAGTCTCTCGCG GATGTACTGGAAACG GTGCCGGCGTACCC
G A A P G V P S G R S K F S P D V L E T V P A S P

526 GGATTGCGGCGGCCG TCGCTGGGCGCAGTG GAACGCCACTGCAGG TCGACTCTAGAGGAT CCTACGGATAATAAT
G L R R P S L G A V E R H C R S T L E D P T D N N
601 GTACAAAGCGTACT AATCAAGCAACACCT GTAAATTCACAAGAT AAAGATGTTGCTAAT AACAGAGGTTTAGCA
V Q S D T N Q A T P V N S Q D K D V A N N R G L A
676 AATAGTGCAGCAAT ACACCTAATCAATCT GCAACAACCAATCAA GCAACGAATCAAGCA TTGGTTAATCATAAT
N S A Q N T P N Q S A T T N Q A T N Q A L V N H N
751 AATGGTAGTATAGTA AATCAAGCTACGCCA ACATCAGTGCAATCA AGTACGCCTTCAGCA CAAAAACAATAATCAT
N G S I V N Q A T P T S V Q S S T P S A Q N N N H
826 ACAGATGGCAATACA ACAGCAACTGAGACA GTGTCAAACGCTAAT AATAATGATGCAGTG TCGAATAATACCACA
T D G N T T A T E T V S N A N N N D A V S N N T T
901 TTAAATGTACCAAAAT AAAACAAATGAAAAT GGTTCAGGAGGACAT CTAACTTAAAGGAA ATTCAAGAAGATGTT
L N V P N K T N E N G S G G H L T L K E I Q E D V
976 CGTCATTCTTCAGAT AAACCAGAGCTAGTT GCAATTGCTGAAACA GCATCTAATAGACCG AAAAAAGAGAAGTAGA
R H S S D K P E L V A I A E P A S N R P K K R S R
1051CGTGCGGCACCGGCA GATCCTAATGCAACT CCAGCAGATCCAGCG GCTGCAGCGGCAGGA AACGGTGGTGCACCA
R A A P A D P N A T P A D P A A A A A G N G G A P
1126GTAGCAATPACGCG CCATACGCGCCGACA ACTGATCCTAATGCC AATAATGCAGGACAA AATGCAC2AACGAA
V A I T A P Y T P T T D P N A N N A G Q N A P N E
1201GTGCTGTCTTTTGAT GACAATGGTATTAGA CCAAGTACCAACCGT TCTGTACCATCAGTA ACAGTTGTTGATAAT
V L S F D D N G I R P S T N R S V P S V T V V D N
1276TTACCAGGCTTTACA CTTATCAATGGTGGT AAAGTAGGTGTGTTT AGTCATGCAATGGTA AGAACGAGCATGTTT
L P G F T L I N G G K V G V F S H A M V R T S M F
1351GATTCAAGGAGATAAT AAGAACTATCAAGCA CAAGGCAATGTAATT GCATTAGGTTCGTATT AATGGA2ACTGATACG
D S G D N K N Y Q A Q G N V I A L G R I N G T D T
1426AATGACCATGGCGAT TTTAATGGTATCGAG AAAACATTAACAGTA AATCCGAATTCTGAA TTAATCTTTGAATTT
N D H G D F N G I E K T L T V N P N S E L I F E F
1501AATACAATGACTACT AAAACCGGTCAAGGC GCAACAAATGTTATT ATCAAAAATGCTGAT ACTAATGATACGATT
N T M T T K N G Q G A T N V I I K N A D T N D T T I
1576GCTGAAAAGACTGTT GAAGCGGTCCAATT TTGCGTTTATTTAAA GTACCTGATAATGTG AGAAATCTCAAATTT
A E K T V E G G P T L R L F K V P D N V R N L K I
1651CAATTTGTATCTAAA AATGACGCAATAACA GATGCGCGTGGCATT TATCAACTAAAAGAT GTTTACAAATACTAT
Q F V S K N D A I T D A R G I Y Q L K D G Y K Y Y
1726AGCTTTGTTGACTCT ATCGGACTTCATTCT GGGTCACATGTTTAT GTTGAAAGACGAACA ATGGAACCCACAGCA
S F V D S I G L H S G S H V Y V E R R T M E P T A
1801ACGAATAATAAAAGAA TTTACAGTTACAACA TCACTAAAAAATAAT GGTAATTCTGGTGCT TCTTTAGACACAGAT
T N N K E F T V T T S L K N N G N S G A S L D T D
1876GAATTTGTTTATAAA ATTCAATTACCTGAA GGGGTAGAATATGTG AACAATCATTGACT AAAGATTTTCCAAGT
E F V Y K I Q L P E G V E Y V N N S L T K D F P S
1951AACAATTCAGGCGTT GATGTTAATGATATG AATGTTACATATGAT GCAGCAAATCGTGTG ATAACAATTA2AAAGC
N N S G V D V N D M N V T Y D A A N R V I T I K S
2026ACTGGTGGTGGCACA ACGAATTCACCTGCA CGACTAATGCCTGAT AAAATATTGGATTTA AAGTATAAGTTGCGT
T G G G T T N S P A R L M P D K I L D L K Y K L R
2101GTTAATAATGTACCG ACACCAAGAACAGTA ACATTTAATGATACA TTAACGTATAAAAACA TATACACAAGATTT
V N N V P T P R T V T F N D T L T Y K T Y T Q D F
2176ATTAATTCAGCTGCA GAAAGTCATACTGTA AGTACAAATCCATAT ACTATCGATATCATC ATGAATAAAGATGCA
I N S A A E S H T V S T N P Y T I D I I M N K D A
2251TTACAAGCCGAAGTT GACAGACGTATTCAA CAAGCTGATTATACA TTTGCATCATTAGAT ATCTTTAATGATCTT
L Q A E V D R R I Q Q A D Y T F A S L D I F N D L
2326AAAAACGTGCACAA ACAATTTTAGCTGAA AATCGTAACAATGTA CCATTAATAAAAAGA GTATCTCAAGCAGAT
K K R A Q T I L A E N R N N V P L N K R V S Q A D
2401ATTGATACATTAACT AATCAGATGCAACAT ACGTTAATTCGAAGT TTGGTACCGAGCTCG AATTCATCGATATAA
I D T L T N Q M Q H T L I R S L V P S S N S S I *

PDATQEERQAAIDKVNAAVTAANTNILNANTNADVEQVKTNAIQGIQAITPATKVKTDAKNAIDKSAETQ
CcchHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHhhcCCccccchhccccccccCCccccccchHHHHHHHHHH

HNTIFNNNDATLEEQAAQQLLDQAVATAKQNIINAADTNQEVAQAKDQGTQNIIVVIQPATQVKTDTRNVV
HhhhccccCcchHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHhhccccchhhhccccccCCCCCcCchHHHHHHH
NDKAREAITNINATTGATREEKQEAINRVNTLKNRALTDIGVTSTTAMVNSIRDDAVNQIGAVQPHVTKK
HHHHHHhhhhcccCCCCcHHHHhhHHHHHHHHHHHHHHhhccccchhhhccccccccCCCCcCCc

QTATGVLNDLATAKKQEINQNTNATTEEKQVALNQVDQELATAINNINQADTNAEVDQAQQLGTKAINAI
chHHHHHHHHHHHHhhcccCCCCcHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHhhchhhhHHHHhhccccccC

QPNIIVKKPAALAQINQHYNAKLAEINATPDATNDEKNAAINTLNQDRQQAIESIKQANTNAEVDQAATVA
CCCcCchhHHHHHHHHHHhhhhcCCCcchHHHHHHHHHHhhhhHHHHHHhhcccccccccccc

ENNIDAVQVDVVKQAARDKITA EVAKRIEAVKQTPNATDEEKQAAVNQINQLKDQAINQINQNQNTNDQV
ccccccCCCCccccccccchhhHHHHHHhhhhhhcCCCCChHHHHHHHHHHHHHHHHHHhhcCcccc

DTTNTQAVNAIDNVEAEVVIKPKAIADIEKAVKEKQQQIDNSLDSTDNEKEVASQALAKEKEKALAAIDQ
chhhccccccccCCCCcCchhHHHHHHHHHHhhhhcCCCCChHHHHHHHHHHHHHHHHHHhhhh

AQTNSQVNQAATNGVSAIKIIQPETKVKPAAREKINQKANELRAKINQDKEATAEERQVALDKINEFVNQ
hccccccccccccCCCCcCCCCccccchhHHHHHHHHHHHHhhhhccccCCchhhHHHHHHHHHHHH

AMTDITNNRTNQVDDTTSQALDSIALVTPDHIVRAAARDAVKQOYEAKKREIEQAEHATDEEKQVALNQ
HHHHHHhhhhcccchhccccchhhccccCcccchhhhhHHHHHHhhhhhhhhcccCCCCcHHHHHHHHHH

LANNEKRALQNIQAIANNDVSRVETNGIATLKGVPQPHIVIKPEAQQAIKASAENQVESIKDTPHATVDE
HHHHHHHHHHhhhhccccccccccccCCCCCCCCCcCchhHHHHHHhhhhccccCCCCcchh

LDEANQLISDTLKQAQQEIENTNQDAAVTDVRNQTIKAIIEQIKPKVRRKRAALDSIEENKNQLDAIRNT
HHHHHHHhHhHhhhhhhccccCCCCccccchhhccccccccCCCCccccchhHHHHHHHHHHhhhhcCC

LDTTQDERDVAIDTLNKIVNTIKNDIAQNKTNAEVDRTETDGNDNIKVILPKVQVKPAARQSVGVKAEAQ
CCCchHHHHHHHHHHHHHHHHHHhhccccCCCCccccccccCCCCccccCCCCCcchHHHHHHHHHHHH

NALIDQSDLSTEEERLAAKHLVEQALNQAIQDQINHADKTAQVNVQDSINAQNIISKIKPATTVKATALQQI
HhhhcccCCcchHHHHHHHHHHHHHHHHhhhhhhcccCCCCccccccccccccCCCCCCCCcchHHHHH

QNIATNKINLIKANNEATDEEQNIAIAQVEKELIKAKQQIASAVTNADVAYLLHDEKNEIREIEPVINRK
HHHHHHhhhhcccCCCCcchhhcHHHHHHHHHHHHhhhhHhHhHHHHHHHHhhhhhhhhhhcccc

ASAREQLTTLFNDKKQAI EANIQATVEERNSILAQLQNIYDTAIGQIDQDRSNAQVDKTASLNLQTIHDL
hHHHHHHHHHHhhHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHhhcccCccccccccccccchhHHHhhhhhhhhccc

DVHPIKPKPAEKTINDDLARVTALVQNYRQVSNRNKADALKAITALKLQMDDEELKTARTNADVAVLKR
ccccCccccchHHHHHHhhHHHHhhccccchhhhHHHHHHHHHHHHhhhhccccchhhhcc

NVALSDIEAVITEKENSLLRIDNIAQQTYAKFKAIATPEQLAKVKVLIQYVADGNRMIDEDATLNDIKQ
cchhhccccccccccccchhhHHHhHhHHHHHHhhccccchhhHHHHHHHHHHhhhhccccCcccchhhh

HTQFIVDEILAIKLP AEATKVSPEIQPAPKVCTPIKKEETHESRKVEKELPNTGSEGMDLPLKEFALIT
hhhhhHHHHhhccccccccccccccccccccccccCCCCchhhhhhhhhcccchhhhhhhhhcccC

GAALLARRRTKNEKES
ChHHHHHHHHHHhhcCC

LEBENS LAUF