

**Anwendung von *Aspergillus nidulans*
Hydrophobinen zur Funktionalisierung von
Oberflächen mit antimikrobiellen Peptiden und
Enzymen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte
DISSERTATION
von
Beatrice Gutt
aus Mediasch in Siebenbürgen

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Rolf Geisen

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis Februar 2013 am Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Anwendung von *Aspergillus nidulans* Hydrophobinen zur Funktionalisierung von Oberflächen mit antimikrobiellen Peptiden und Enzymen“ selbständig und nur mit Hilfe der erlaubten Mittel angefertigt habe. Dabei habe ich mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Karlsruhe, 06. März 2013

Beatrice Gutt

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Boeuf S, Throm T, Gutt B, Strunk T, Hoffmann M, Seebach E, Mühlberg L, Brocher J, Gotterbarm T, Wenzel W, Fischer R, Richter W (2012), Engineering hydrophobin DewA to generate surfaces that enhance adhesion of human but not bacterial cells. *Acta Biomater* 8: 1037-1047

Rieder A, Schwartz T, Obst U, Bollschweiler C, Gutt B, Zoller J, Fischer R (2010). Hydrophobins - using hydrophobins to prevent microbial biofilm growth on mineral surfaces. *Geotechnologien Science Report*. 16:3-18

Eldholm V[#], Gutt B[#], Johnsborg O, Brückner R, Maurer P, Hakenbeck R, Mascher T, Håvarstein LS (2010), The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *J. Bacteriol* 192: 1761- 1773

Gutt B, Rieder A, Schwartz T, Overhage J, Fischer R (2013) Application of *Aspergillus nidulans* hydrophobin-antimicrobial peptide fusion proteins to prevent biofilm formation. in Vorbereitung

Gutt B & Fischer R (2013) Establishment of the *Aspergillus nidulans* spore surface as expression platform for enzymes. in Vorbereitung

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
I Zusammenfassung	5
I Summary	7
II Einleitung	9
1. Biofilme	9
1.1. Entstehung und Erscheinung bakterieller Biofilme.....	9
1.2. Auswirkung von Biofilmen auf Umwelt, Industrie und Mensch.....	12
2. Hydrophobine	15
2.1. Hydrophobine allgemein.....	15
2.2. Hydrophobine in <i>Aspergillus nidulans</i>	19
2.3. Biotechnologische Anwendungen von Hydrophobinen.....	23
3. Antimikrobielle Peptide	25
3.1. Aufbau und strukturelle Einteilung antimikrobieller Peptide.....	26
3.2. Antibakterielle Aktivität antimikrobieller Peptide.....	28
3.3. Fungizide Aktivität antimikrobieller Peptide.....	31
3.4. Kurze, synthetische AMPs.....	32
4. Mikroorganismen als Ganzzell-Biokatalysatoren	34
III Ergebnisse	37
1. Funktionalisierung technischer Oberflächen mittels pilzlicher Hydrophobine.	37
1.1. Bakterielle Expression von H* Protein B.....	38
1.2. Funktionalisierung H* Protein B mit antimikrobiellen Peptiden.....	39
1.3. Bakterielle Expression funktionalisierter Hydrophobine.....	43
1.4. Erste Tests auf antibakterielle Wirkung der funktionalisierten Hydrophobine.....	44
1.5. Hydrophobin-Funktionalisierung mit weiteren AMPs.....	46
1.6. Wirkung auf pathogene Bakterien in Biofilmen.....	47
2. Untersuchung der Wirkung antimikrobieller Peptide auf <i>A. nidulans</i>	51
2.1. Deletionen von Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren.....	52
2.2. Microtiter <i>Screening Assays</i> zur Bestimmung der antimykotischen Aktivität von Amphotericin B und dem AMP F1.....	56
2.3. Expressionsanalysen F1-induzierter Stämme.....	59
3. Funktionalisierung der Sporenoberflächen von <i>A. nidulans</i>	61
3.1. Funktionalisierung von RodA mit Enzymen.....	62

3.2 Substratherstellung zur Aktivitätsbestimmung der Mutanase.....	65
3.3. Untersuchungen der Enzymaktivität von MutA und SwoM	66
IV Diskussion	69
1. Oberflächenfunktionalisierung mittels rekombinanter Hydrophobine	69
1.1. Expression rekombinanter antibakterieller Hydrophobine in <i>E. coli</i>	69
1.2. Oberflächenbeschichtung und Vermeidung der initialen Biofilmbildung	72
2. AMP-Stressantwort in <i>A. nidulans</i>.....	77
3. Funktionalisierung von Sporenoberflächen in <i>A. nidulans</i>	81
V Material und Methoden	85
1. Chemikalien und Geräte	85
2. Verwendete Organismen	85
3. Kultivierung der Organismen.....	88
3.1. Kultivierung von Bakterien	88
3.2. Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	91
3.3. Herstellung einer Sporenlösung von <i>A. nidulans</i>	92
4. Molekularbiologische Methoden.....	93
4.1. Gelelektrophorese, DNA-Restriktion und Klonierung von PCR-Fragmenten.....	93
4.2. PCR und verwendete Oligonucleotide	94
4.3. Insertion von Peptiden via Primerligation	96
4.4. <i>Site-directed Mutagenesis</i>	97
4.5. Insertion und Deletion von Domänen via Mutagenese-PCR	97
4.6. <i>E. coli</i> Transformation und Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	98
4.7. Hergestellte und verwendete Plasmide	99
4.8. Herstellung von Protoplasten und Transformation von <i>A. nidulans</i>	100
4.9. PCR mit intakten Sporen (Sporen-PCR).....	101
4.10. Präparation von genomischer DNA aus <i>A. nidulans</i>	102
4.11. <i>Southern Blot</i>	102
4.12. RNA Isolation	104
4.13. Quantitative <i>Real Time</i> RT-PCR.....	105
5. Biochemische Methoden	105
5.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	105
5.2. <i>Western Blot</i>	106
5.3. <i>Dot Blot</i>	107
5.4. Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss.....	108

5.5. Schnelltest auf Proteinexpression in <i>E. coli</i>	108
5.6. Heterologe Expression und Aufreinigung von H* Protein B -Fusionsproteinen...	109
5.7. <i>Microtiter screening Assay</i>	110
5.8. Oberflächenbeschichtung mit rekombinanten Fusions-Hydrophobinen.....	110
5.9. Test auf enzymatische Aktivität immobilisierter Enzyme	111
6. Mikroskopie.....	112
6.1. <i>Live/Dead</i> Färbung von Biofilmen.....	112
VI Literatur	114
Abkürzungsverzeichnis.....	131
Lebenslauf.....	132
Danke.....	134
Anhang	137

I Zusammenfassung

Biofilme sind allgegenwärtig und die bevorzugte Lebensform der meisten Mikroorganismen. Bakterien, Pilze aber auch Algen und Protozoen profitieren symbiotisch voneinander, während sie von einer extrazellulären schützenden Matrix umgeben sind. Manche Biofilme sind ungewollt, da sie technische Systeme stören oder Krankheiten verursachen. Um die initiale Anheftung von Bakterien und somit eine Biofilmbildung zu verhindern, sollten pilzliche Hydrophobine funktionalisiert werden. Dazu wurden antimikrobielle Peptide (AMPs) an das rekombinante Klasse I Hydrophobin DewA fusioniert und zur Beschichtung technischer Oberflächen verwendet. Hydrophobine sind kleine Proteine, die sich an hydrophil - hydrophoben Grenzflächen zu extrem stabilen amphipathischen Monolagen selbst assemblieren und nur schwer löslich sind. AMPs sind Polypeptide mit einer Größe von ungefähr 9 bis 50 Aminosäuren, deren Wirkspektrum sich über Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten erstreckt. Es wurden vier kurze, synthetische AMPs gewählt, die im angehefteten Zustand antibakterielle Aktivitäten zeigten und bestätigt, dass eine Fusion mit DewA die Ausbildung von *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* Biofilmen beeinträchtigt.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit besteht darin, die Wirkung kleiner, synthetischer AMPs auf filamentöse Pilze, die ebenfalls Biofilme besiedeln, zu untersuchen. Zur Aufklärung der antifungalen Aktivität der AMPs wurde der Modellorganismus *Aspergillus nidulans* eingesetzt. Die bakterielle Stressantwort auf AMPs liegt in der Induktion von Zweikomponenten-systemen. Ob dies auch bei *A. nidulans* der Fall ist, wurde durch die Behandlung des Wildtyps, dreier Histidin-Kinase- und zweier Response-Regulator-Deletionsstämme untersucht. Kurze, synthetische AMPs wirken sich in der Tat auf pilzliche Zweikomponentensysteme aus, indem die Antwort bestimmter Stressgene runterreguliert wird.

Der dritte Aspekt dieser Arbeit beruht in der Funktionalisierung von *A. nidulans* Sporenoberflächen mit an Hydrophobinen gekoppelten Enzymen. Hierfür wurde das Klasse I Hydrophobin RodA gewählt, das für die äußerst stabile *Rodlet*-Struktur

verantwortlich ist und zur Befestigung in der Sporenmembran einen GPI-Anker trägt. Angekoppelte Mutanase und Glukose-6-Phosphat-Isomerase zeigten enzymatische Aktivität und können durch dieses System einfach in einem großen Maßstab hergestellt werden. Dies ist der erste Vorstoß auch Sporen filamentöser Pilze als Ganzzell-Biokatalysatoren einzusetzen.

I Summary

Microbial biofilms are ubiquitously found and the chosen life form of most of the microorganisms. Bacteria, fungi but also algae and protozoa benefit symbiotically from each other, while they are surrounded by an extracellular matrix. Some of the biofilms are unwanted, as they cause diseases or destroy technical systems. To prevent the initial attachment of bacteria and hence biofilm formation fungal hydrophobins were functionalized. Therefore antimicrobial peptides (AMPs) were fused to the recombinant class I hydrophobin DewA and coated on technical surfaces. Hydrophobins are small proteins, which self-assemble at any hydrophilic-hydrophobic interface into extremely stable amphipathic monolayers that are hard to destroy. AMPs are only 9 to 50 amino acids in size and are proven to be active against bacteria, fungi, viruses and parasites. Four different small, synthetic AMPs, which are still active in a tethered manner, were fused to DewA. It was confirmed that coatings with these fusion constructs derogate *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilm formation.

Another aspect of this thesis is to characterize the impact of small, synthetic AMPs on filamentous fungi, which are also found in biofilms. The model organism *Aspergillus nidulans* has been chosen to explain the antifungal activity of AMPs. In bacteria it is known, that two-component systems are induced by AMPs. If there is also an impact on fungi a wildtype strain, three histidine kinase - and two response regulator - deletions were analyzed. AMPs do indeed affect fungal two-component systems when stress genes were down regulated.

The last aspect was to functionalize *A. nidulans* spore surfaces while coupling enzymes to hydrophobins. Therefore the class I hydrophobin RodA which forms the hard to destroy rodlet layer and owns a GPI anchor has been chosen. Coupled mutanase and glucose-6-phosphate isomerase were still enzymatically active. This system allows the production of enzymes in a large amount and is the first approach of using spores from filamentous fungi as whole cell biocatalysts.

II Einleitung

1. Biofilme

Bei Mikroorganismen unterscheidet man zwischen der planktonischen Lebensform und einem Leben im Biofilm. Biofilme ermöglichen es einer Gemeinschaft unterschiedlicher Mikroorganismen unwirtliche Lebensräume zu kolonisieren. Dies geschieht im Schutz extrazellulär polymerer Substanzen (EPS), die von Bakterien des Biofilms selbst produziert werden (Costerton *et al.*, 1995) und sich je nach Umgebung in ihrer Zusammensetzung unterscheiden (Donlan, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Es werden zum Teil sehr dicke, für das menschliche Auge erkennbare Formen gebildet, die schon früh das Interesse von Forschern erweckte. So untersuchte Antoni von Leeuwenhoek schon im Jahr 1684 Biofilme, die er von den eigenen Zähnen abkratzte. Er stellte fest, dass die Zahl der sogenannten "Animalculi" groß genug wäre um die Einwohnerzahl des damaligen *United Kingdoms* zu übertreffen. Erst in neuerer Zeit nahm das Bewusstsein der Allgegenwärtigkeit von Biofilmen und der damit verbundenen Auswirkung auf natürliche und industrielle Systeme, wie auf die menschliche Gesundheit, zu (Szewzyk und Szewzyk, 2003). In den späten 1970er Jahren wurde erstmals festgestellt, dass Bakterien die sessile Lebensform bevorzugen und somit den Großteil der bakteriellen Biomasse stellen (Costerton *et al.*, 1978). Biofilme entstehen in wässrigen Systemen, bevorzugt an Grenzflächen, z.B. in Sedimenten, Böden, geologischen Formationen, Gewebe von Pflanzen oder technischen Anlagen, aber sie besiedeln auch den menschlichen Körper (Zahnplaque, Darmflora) (Szewzyk und Szewzyk, 2003).

1.1. Entstehung und Erscheinung bakterieller Biofilme

Schon im Jahre 1943 machte Claude Zobell die Beobachtung, dass marine Bakterien sich bevorzugt an Oberflächen anlagern (Zobell, 1943). Im Laufe der Zeit konnte mit Hilfe von Mikroskopie, Fluoreszenzmarkierung und Biofilm-Fermentern die Entstehung bakterieller Biofilme nachvollzogen werden (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Zunächst wurde anhand mikroskopischer Untersuchungen natürlicher Biofilme

gezeigt, dass die Matrix umhüllten Mikrokolonien eine komplexe Struktur aufweisen, die mit Kanälen durchsetzt sind (de Beer *et al.*, 1994; Lawrence *et al.*, 1991).

Ein fünfphasiges Modell der bakteriellen Biofilmentstehung wurde mittels Proteomanalysen eines *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms entwickelt (Sauer *et al.*, 2002) und als grundsätzliches Modell postuliert (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Abbildung 1).

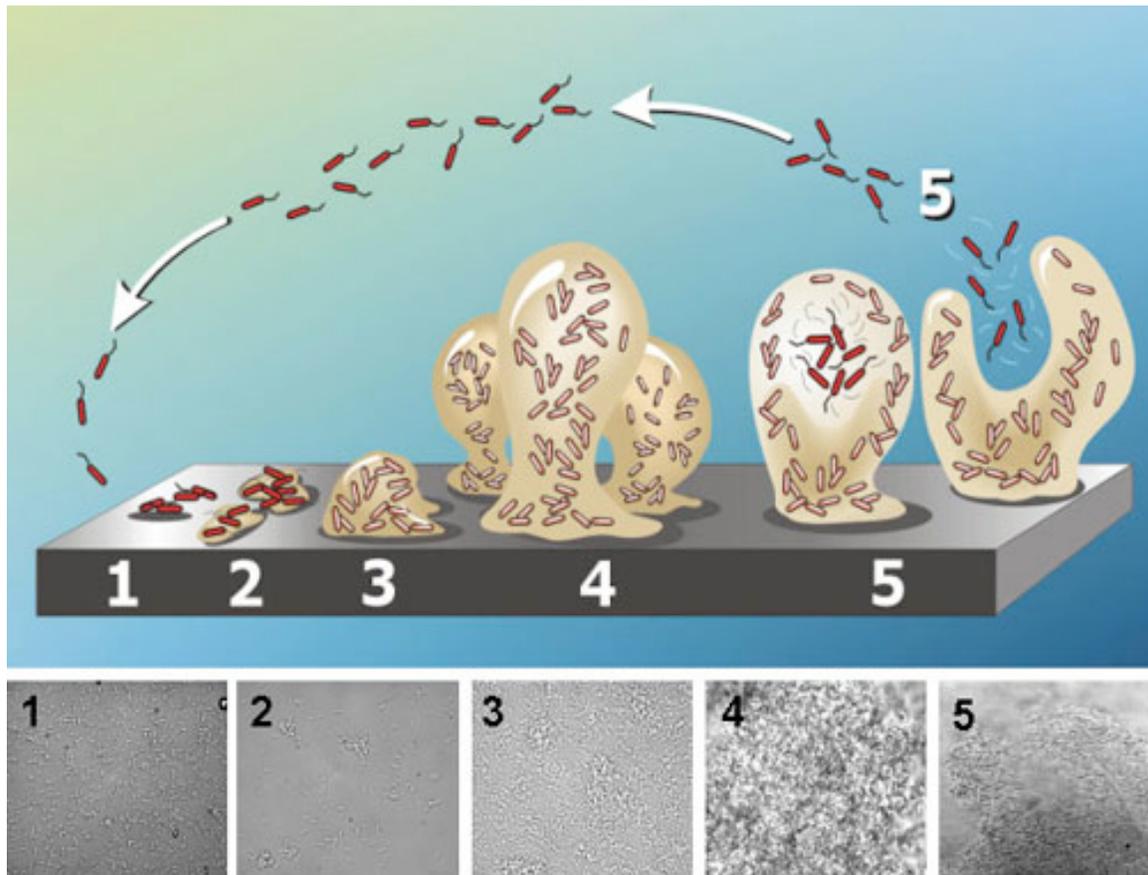


Abbildung 1: Bakterielle Biofilmentwicklung in fünf Phasen. Phase 1: Initiale reversible Anhaftung von Zellen an eine Oberfläche. Phase 2: Die Produktion von EPS verstärkt die irreversible Bindung. Die Zellen verlieren ihre Beweglichkeit. Phase 3: Frühe Entwicklung des Biofilms, frühe Reifephase. Phase 4: Ausgereifter Biofilm. Phase 5: Einzelne bewegliche Zellen verlassen den Biofilm, Verbreitungsphase. Die Mikroskopaufnahmen im unteren Bereich zeigen die einzelnen Phasen der Biofilmentwicklung von *P. aeruginosa* auf Glasoberflächen unter kontinuierlichen Durchflussbedingungen (verändert nach (Stoodley *et al.*, 2002)).

Die Biofilme wurden in einem Durchflussreaktor herangezogen und die einzelnen Phasen zusätzlich mikroskopiert (Sauer *et al.*, 2002). Phase eins zeichnet sich durch

eine reversible, zufällige Anheftung der Bakterien an Oberflächen aus, gefolgt von einer stabilen Anheftung in Phase zwei. In dieser Phase beginnt die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), welche 50 bis 90 % des Kohlenstoffgehaltes eines Biofilms ausmachen können (Flemming *et al.*, 2000). EPS bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden, aber auch aus anderen Makromolekülen wie Proteinen, DNA und Lipiden und sind stark hydratisiert (Donlan, 2002; Flemming und Wingender, 2010; Flemming *et al.*, 2000). Die Bildung der EPS ist durch das umgebende Medium beeinflussbar, so ist ein Überschuss an Kohlenstoff und eine Limitierung von Stickstoff, Kalium und Phosphat förderlich (Sutherland, 2001). Verschiedene Organismen produzieren unterschiedliche Mengen an EPS, zusätzlich steigt die EPS-Menge mit dem Alter eines Biofilms an (Sutherland, 2001; Donlan, 2002). EPS scheinen auch einen Einfluss auf die antimikrobielle Resistenz eines Biofilms zu haben (Donlan, 2000). Phase drei stellt die frühe Reife dar, in der die Bakterien sich vermehren und in eine dreidimensionale Struktur übergehen (Phase vier). Biofilme können eine flache oder knollenförmige Struktur annehmen, was durch die Beeinflussung der Motilität des Typ IV Pilus je nach Nährstoffverfügbarkeit verursacht wird (Klausen *et al.*, 2003). Die Kommunikation der einzelnen Bakterienzellen eines Biofilms erfolgt durch *Quorum sensing*, wobei diffusionsfähige Moleküle freigesetzt werden um beispielsweise bei einer bestimmten Zelldichte die Genexpression zu ändern (Ng und Bassler, 2009; Waters und Bassler, 2005). Phase fünf zeichnet sich durch teilweise Freisetzung einzelner Bakterien aus, die an angrenzenden Oberflächen weitere Biofilme bilden können.

In der Natur kommen Biofilme sowohl in fließenden als auch in stehenden Gewässern vor. Je nach Ort verändert sich auch die Form, so entstehen fädige Strukturen in Fließgewässern und Knollen- bzw. Hügelartige Strukturen in stehenden Gewässern (Stoodley *et al.*, 1999). Auch die Nährstoffverfügbarkeit spielt eine Rolle in der Erscheinung eines Biofilms (Klausen *et al.*, 2003). Die Fähigkeit auf Umwelteinflüsse durch genetische Regulation (Sauer *et al.*, 2002) und Selektion (Ghigo, 2003; Klausen *et al.*, 2003) einzugehen ist einzigartig und kann von keinem

mehrzelligen Organismus in dieser Form realisiert werden (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Die Neigung von Bakterien an unterschiedlichen Oberflächen und in unterschiedlichen Umgebungen Biofilme zu bilden, ist ein Beleg für die Vorteile einer solchen Verbindung. So sind Zellen innerhalb eines Biofilms stärker gegen Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung, Schwermetalle, Säuren, Dehydrierung und antimikrobiellen Substanzen geschützt (Espeland und Wetzler, 2001; Gilbert *et al.*, 2002; Mah und O'Toole, 2001; McNeill und Hamilton, 2003; Stewart und Costerton, 2001; Teitzel und Parsek, 2003). Bakterien innerhalb eines Biofilms können eine bis zu 1000- fach höhere Resistenz gegenüber Antibiotika aufweisen (Anderl *et al.*, 2003; Stewart und Costerton, 2001).

1.2. Auswirkung von Biofilmen auf Umwelt, Industrie und Mensch

Die ubiquitäre Verbreitung von Biofilmen bringt sowohl Vorteile als auch Nachteile. So haben frühe Biofilme die Entstehung fossiler Brennstoffe begünstigt (Hahn und Haug, 1986) und spielen heutzutage eine wichtige Rolle in der Fixierung von atmosphärischem Kohlenstoffdioxid (Cohen und Rosenberg, 1989). Zusätzlich werden sie bei der Trink- und Abwasserreinigung eingesetzt, da durch die Immobilisation der Zellen ein höherer Umsatz von Substrat erzielt werden kann als mit planktonischen Zellen (Garrido *et al.*, 1997; Rusten *et al.*, 1995). Die EPS dienen dabei als Schutzschild und bieten Haftung bei Strömungen. Zur biologischen Altlastensanierung in verunreinigten Böden werden Biofilme eingesetzt, die durch ihre Stoffwechselaktivität Gefahrstoffe wie Altöl abbauen können. Andere Einsatzgebiete finden sich im eigenen Haushalt, wo Biofilmwachstum zur Selbstreinigung des Gartenteichs empfohlen wird (Vorteile von adaptierten Biofilmen, www.koi-hobby.de, Februar 2013).

Industrielle Anlagen und medizinische Geräte hingegen sind durch Biofilmbewuchs häufig erheblich gestört, was unter dem Begriff *Biofouling* bekannt ist (Characklis und Marshall, 1990) und zu Umwelt-, Gesundheits- und finanziellen Schäden führt (Hellio und Yebra, 2009; Somerscales und Knudsen, 1981; Walker *et al.*, 2000). Marine Systeme wie Schiffsrümpfe, Unterwasserkabel, Plattformen und viele mehr

sind häufig von *Biofouling* und Korrosion betroffen. Mikrobielle Biofilme bilden dabei lediglich die Grundlage zur Anhaftung von Algen, Muscheln und Seepocken, die wiederum den Wasserwiderstand eines Schiffes erhöhen und einen erhöhten Treibstoffverbrauch und Motorenleistung fordern (Melo *et al.*, 1988; Railkin, 2004). Zusätzlich sind diese Biofilme eine erhebliche Belastung des Ökosystems, da durch den Schiffsverkehr fremde Tierarten an verschiedene Orte verbreitet werden (Bixler und Bhushan, 2012). *Biofouling* ist auch in Kraftwerken, Wasseraufbereitungsanlagen und der Lebensmittelindustrie vorzufinden, wo es zu Rohrverschlüssen, eingeschränkter Membranaktivität, kontaminiertem Wasser und verminderter Wärmeaustauscher-Leistung kommt (Chan und Wong, 2010; Somerscales und Knudsen, 1981; Walker *et al.*, 2000). Kühlanlagen von Atomkraftwerken leiden besonders an durch Biofilme verursachte Korrosion und Verstopfungen (Nebot *et al.*, 2010). Trinkwasserleitungen sind häufig von Biofilmen besiedelt, die Pathogene in sich tragen, was zu gesundheitlichen Problemen führen kann (Lebret *et al.*, 2009).

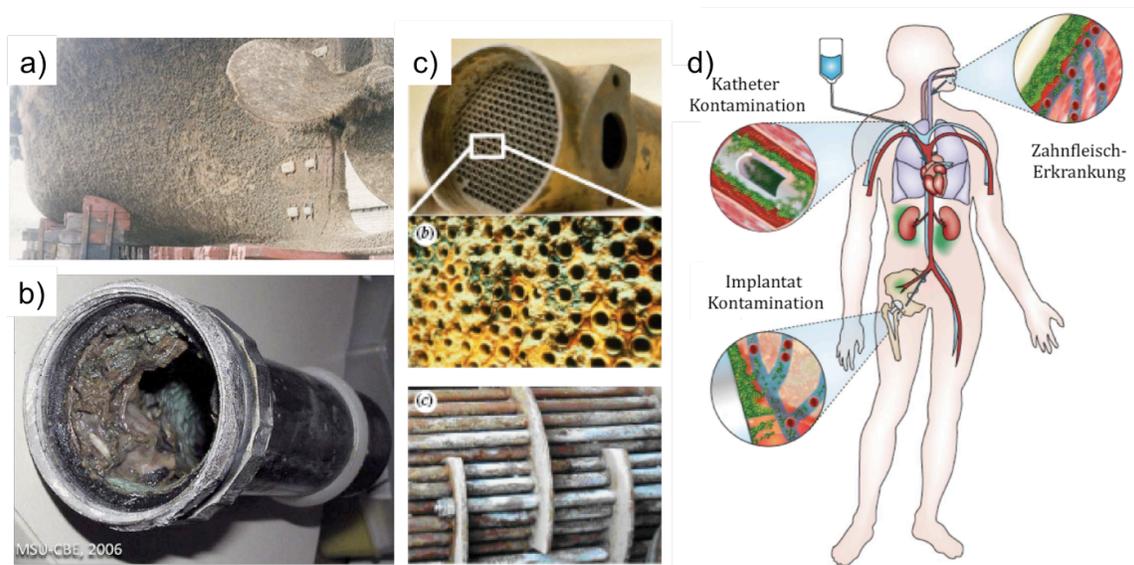


Abbildung 2: Biofilmbefall in der Industrie und Medizin. a) Schiffsrumpfe, b) Wasserrohrleitungen, c) Wärmeaustauscher und d) der menschliche Körper sind nur einige der Ziele eines Biofilmbefalls (Abbildungen: a) www.european-coatings.com, b) www.biofilm.montana.edu, c) Bixler und Bhushan, 2012, d) Hall-Stoodley *et al.*, 2004)

Die Medizintechnik und besonders Krankenhäuser sind bestrebt Biofilme zu vermeiden, die Patienten, im Besonderen immungeschwächte Menschen, zusetzen. Mehr als 45 % der Neuinfektionen in Krankenhäusern sind auf mit Biofilmen kontaminierte medizinische Geräte zurückzuführen (Bixler und Bhushan, 2012). Besonders Katheter bieten ein hohes Risiko des Befalls und der Infektion (Chan und Wong, 2010; LoVetri *et al.*, 2010). Auch bei über acht Prozent der eingesetzten Implantate führen Biofilm-Verunreinigungen zu Komplikationen und zu erneuten chirurgischen Eingriffen (Bixler und Bhushan, 2012). Durch die erhöhte Antibiotika-Resistenz der Biofilmkeime ist es umso schwerer, Infektionen einzudämmen. Unter anderen sind *P. aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* die am häufigsten vorkommenden Krankenhauskeime (Donlan *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2009; Vo-Dinh, 2007). Sie verursachen zum Beispiel Lungen- und Hautentzündungen.

Um die Biofilmbildung auf Oberflächen zu vermeiden, kann die Natur zum Vorbild dienen. In der Tier- und Pflanzenwelt finden sich Konzepte zur Oberflächengestaltung, die einen geringen Strömungswiderstand, eine geringe Adhäsion und Hydrophobizität und damit erleichterte Abwaschbarkeit gewährleisten. Superhydrophobe Oberflächen bieten zum Beispiel kaum Anheftungsfläche. Im Vergleich zu superhydrophilen Oberflächen können Mikroorganismen einfacher abgespült werden (*self-cleaning*) (Bixler und Bhushan, 2012). Superhydrophobe Oberflächen wie die Blätter der Lotuspflanze, Schmetterlingsflügel und Taubenfedern (Abbildung 3) dienen schon jetzt als Vorbild für diverse technologische Anwendungen, wie Membranen von Entsalzungsanlagen (Bhushan, 2012). Auch Fischschuppen zeigen leicht abwaschbare Oberflächeneigenschaften, da sie durch die aufeinander lagernde Schichtung superoleophob sind (Liu *et al.*, 2009). Die Haifischhaut verhindert durch die vielen „Zähne“ eine Ansiedlung von Mikroorganismen, indem es zu einem niedrigeren Wasserwiderstand und somit erhöhten Strömungen kommt (Bixler und Bhushan, 2012). Zur Herstellung sogenannter biomimetischer Oberflächen wurden rekombinante pilzliche Hydrophobine genutzt um Oberflächen zu beschichten. Einen Effekt auf die Ansiedlung eines *Escherichia coli* Biofilms hatte dies allerdings nicht (Rieder *et al.*,

2011). Die Modifikation rekombinanter Hydrophobine mit antimikrobiellen Peptiden (AMP) war ein nächster Schritt zur Biofilmvermeidung und wurde in dieser Arbeit etabliert.

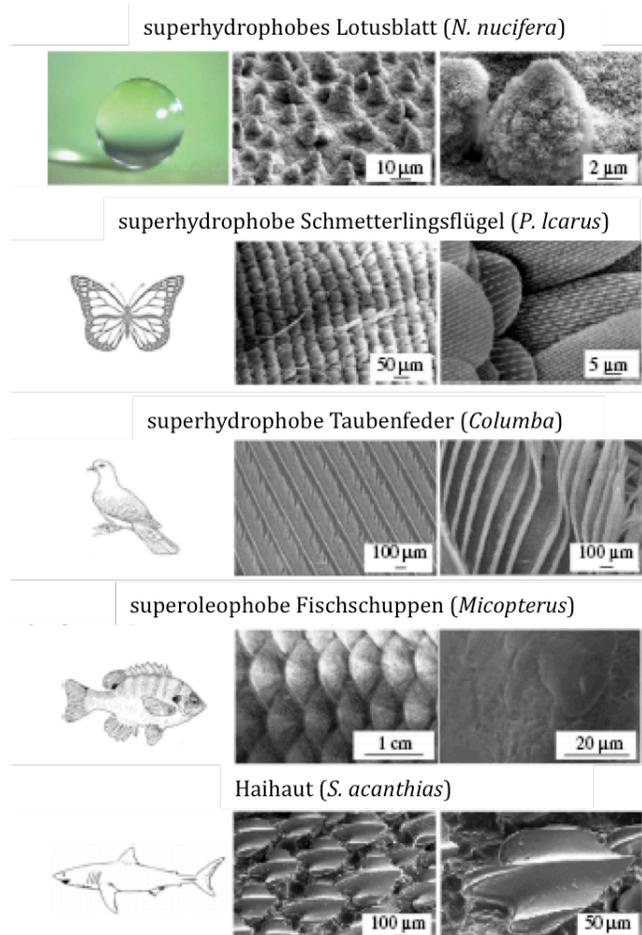


Abbildung 3: Oberflächenstrukturen der Pflanzen- und Tierwelt zur Vermeidung einer Besiedlung durch Mikroorganismen. Zu sehen sind die superhydrophoben Strukturen eines Lotusblattes, eines Schmetterlingsflügels und einer Taubenfeder. Auch superoleophobe Fischschuppen und die Haihaut erschweren eine Anheftung durch Mikroorganismen (verändert nach Bixler und Bhushan, 2012).

2. Hydrophobine

2.1. Hydrophobine allgemein

Hydrophobine sind kleine Proteine mit einer Größe von 50 bis 150 Aminosäuren, die in Pilzen zu finden sind (Wessels, 1994). Sie kommen ausschließlich in Ascomyceten und Basidiomyceten vor (Linder *et al.*, 2005), wo sie unterschiedliche Funktionen einnehmen. Sie helfen bei der Sporulation, dienen als Pathogenitätsfaktoren oder verringern die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten (Whiteford und Spanu, 2002; Wösten und Wessels, 1997). Erstmals beschrieben

wurden sie 1990 im gemeinen Spaltblättling *Schizophyllum commune* als Proteine, die die Fruchtkörper- und Sporenoberflächen wasserabweisend machen (Schuren und Wessels, 1990). Mittlerweile sind homologe Proteine in Bakterien der Gattung *Streptomyces*, sogenannte *Chapline*, bekannt (Claessen, 2003; Kodani *et al.*, 2005). Auch in *Ustilago mayidis* sind funktionelle Homologe (Repellents) zu finden (Teertstra *et al.*, 2006).

Hydrophobine ähneln sich in ihrer Aminosäuresequenz bis auf acht konservierte Cysteine sehr wenig (Wessels, 1997). Sie bilden Disulfidbrückenbindungen (Cys1-Cys6, Cys2-Cys5, Cys3-Cys4, Cys7-Cys8), welche essentiell für die hohe Stabilität der globulären Tertiärstruktur sind (Sunde *et al.*, 2008). Im Allgemeinen wird zwischen zwei Klassen von Hydrophobinen unterschieden (Wessels, 1994). Klasse I Hydrophobine bilden Polymere, sogenannte *Rodlets*, die extrem widerstandsfähig sind und nur durch starke organische Säuren gelöst werden können (Linder *et al.*, 2005; Wessels *et al.*, 1991). Klasse II Hydrophobine bilden Polymere, die keinen *Rodlet*-Charakter besitzen, und sich leichter in manchen organischen Lösungsmitteln (z. B. 60 % Ethanol, 2 % SDS) lösen (Paananen *et al.*, 2003; Sunde *et al.*, 2008; Wösten und de Vocht, 2000; Yaguchi *et al.*, 1993).

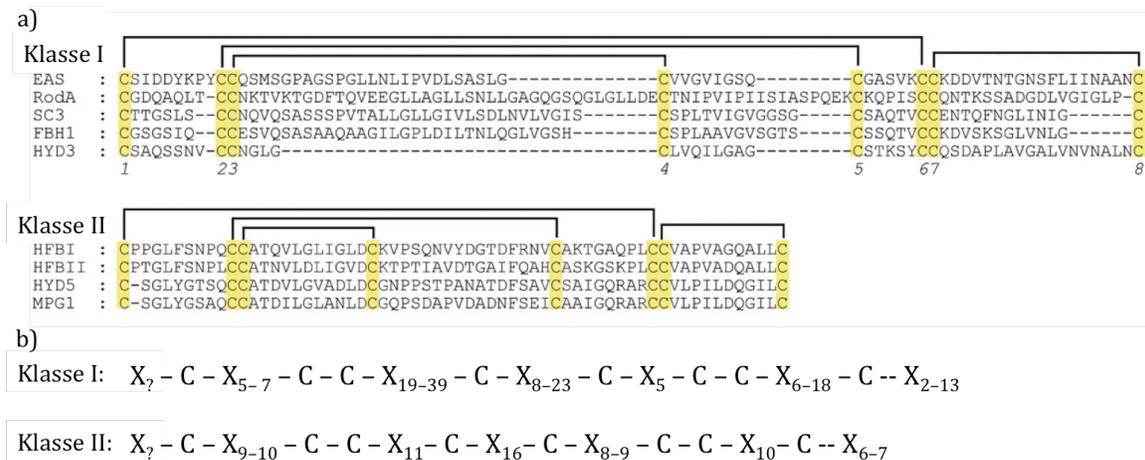


Abbildung 4: Alignments von Klasse I und Klasse II Hydrophobinen. a) Gezeigt werden nur Aminosäuren zwischen dem ersten und letzten Cystein in einer Sequenz. Die acht konservierten Cysteine sind gelb unterlegt. Die Cysteine, die Disulfidbrücken bilden, sind mit Klammern verbunden. Die höhere Konservierung der Aminosäuren der Klasse II im Gegensatz der Klasse I Hydrophobine ist ersichtlich. Verglichen wurden bei den Klasse I Hydrophobinen EAS aus *Neurospora crassa*, RodA aus *Aspergillus fumigatus*, SC3 aus *Schizophyllum commune*, FBH1 aus *Pleurotus ostreatus* und HYD3 aus *Gibberella moniliformis*. Die betrachteten Klasse II Hydrophobine sind HFBI und HFBII aus

Trichoderma reesei, HYD5 aus *Gibberella moniliformis* und MPG1 aus *Magnaporthe grisea* (verändert nach Kwan *et al.*, 2008). b) Die Abstände zwischen den einzelnen Cysteinen eines Hydrophobins sind Klassenabhängig. C = Cystein, X = beliebige Aminosäuren (verändert nach Littlejohn *et al.*, 2012).

Abbildung 4 zeigt *Alignments* von Klasse I und Klasse II Hydrophobinen unterschiedlicher Stämme. Auffallend ist, dass sich die Klassen auch in der Länge unterscheiden. Klasse I Hydrophobine haben eine Länge von 100 bis 150 Aminosäuren und Klasse II Hydrophobine eine Länge von 50 bis 100 Aminosäuren (Wessels, 1994). Klasse II Hydrophobine besitzen im Übrigen eine höhere Konservierung der Aminosäuren zwischen den Disulfidbrücken (Linder *et al.*, 2005). Tertiäre Proteinstrukturen sind bis heute nur von einigen wenigen Hydrophobinen bekannt (EAS aus *N. crassa* und HFBI und HFB II aus *T. reesei*) (Abbildung 5). Die Struktur des Klasse II Hydrophobins HFB II wurde als erste entschlüsselt (Hakanpää *et al.*, 2004b), woraufhin sich die Aufklärung von HFB I (Hakanpää *et al.*, 2006) und des Klasse I Hydrophobins EAS (Kwan *et al.*, 2006) anschlossen. Es wird ein viersträngiges β -Fass bestehend aus zwei sich verzahnenden β -Hairpin-Strukturen gebildet. Die hydrophoben Aminosäuren bilden dabei im Bereich der β -Haarnadel-Strukturen einen hydrophoben Bereich (Hakanpää *et al.*, 2004a), der etwa 12 % der Proteinoberfläche bedeckt (Bayry *et al.*, 2012). HFB I und II besitzen eine α -helikale Region, die außerhalb des β -Faltblatt Bereiches liegt (Linder *et al.*, 2005). Bei EAS findet man anstelle der α -Helix eine kurze doppelsträngige antiparallele β -Faltblatt-Struktur (Kwan *et al.*, 2006). Typisch für Klasse I Hydrophobine besitzt EAS eine lange ungeordnete Schleife (24 Aminosäurereste) zwischen dem dritten und vierten Cystein, welche bei HFB I und II fehlt. In dieser Schleife ist die geringste Rate der Konservierung von der Klasse I Hydrophobine zu finden. Deletionen von sieben bis 19 Resten dieser Region führten weder zum Verlust der Struktur noch der *Rodlet*-Bildung (Kwan *et al.*, 2008; Kwan *et al.*, 2006).

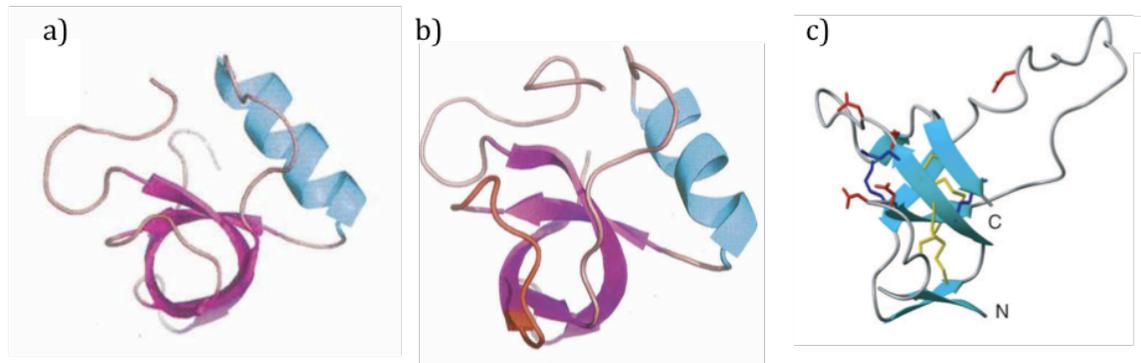


Abbildung 5: Hydrophobinstrukturen von HFB II und HFB I aus *N. crassa* und EAS aus *T. reesei*. Es wird eine Fass ähnliche Struktur aus antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen (lila bzw. blaue Pfeile) gebildet. Die Klasse II Hydrophobine HFB II (a) und HFB I zeigen zusätzlich eine α -Helix (blaue Schleife), die in der Struktur des Klasse I Hydrophobins EAS (c) nicht zu finden ist. EAS besitzt hingegen eine lange ungeordnete Schleife zwischen dem dritten und vierten Cystein, was als Charakteristikum der Klasse I Hydrophobine gilt (verändert nach Hakanpää *et al.*, 2006 (a und b) und Kwan *et al.*, 2006 (c)).

Hydrophobine assemblieren auf Sporenoberflächen zu sogenannten *Rodlets*. Diese Strukturen wurden schon vor der eigentlichen Entdeckung der Hydrophobine für die Hydrophobizität der Sporen verantwortlich gemacht (Beever *et al.*, 1979). Sie verhelfen den Sporen zu einer effizienten Verbreitung durch Wind oder Insekten und Verhindern das Aneinanderheften einzelner Sporen. Zusätzlich maskiert die *Rodlet*-Struktur die Sporen vor den menschlichen Immunzellen um eine Immunantwort zu verhindern (Aimanianda *et al.*, 2009). Die Selbstassemblierung der Hydrophobine geschieht an jeder Grenzphase von flüssig zu gasförmig. So setzen sekretierte Hydrophobine die Oberflächenspannung des umgebenden Mediums herab und ermöglichen die Bildung von Lufthyphen oder Fruchtkörpern (Wösten *et al.*, 1999). Somit sind nicht nur Sporen, sondern auch Lufthyphen und Fruchtkörper wie die des Zuchtchampignons *Agaricus bisporus* mit einer wasserabweisenden Hydrophobinschicht bedeckt. Trotz ihrer Hydrophobizität ist diese Grenzschicht äußerst durchlässig zum Gasaustausch (Wang *et al.*, 2005). Eine zusätzliche Funktion der Hydrophobine ist die vereinfachte Interaktion, mutualistisch oder pathogen, zwischen Organismen. So ist eine erhöhte Expression von Hydrophobinen in symbiontischen Beziehungen zwischen Ektomykorrhiza - Pilzen und Pflanzenwurzeln zu beobachten. Dies dient dem Gasaustausch zwischen den Symbionten (Martin *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1995b; Tagu *et al.*, 1998; Tagu *et*

al., 2002). Das Hydrophobin MPG-1 des Reisbrandpilzes *M. grisea* ist nicht nur für die Hydrophobizität sondern auch für die Apressoriumbildung verantwortlich und gilt somit als Pathogenitätsfaktor (Talbot *et al.*, 1996). Dies wurde durch Deletion des *mpg-1* Gens beobachtet. Obwohl es eine geringe Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen der Hydrophobine gibt, ist es dennoch gelungen die Funktionen des Hydrophobins teilweise zu rekompensieren (Kershaw und Talbot, 1998). Dies deutet darauf hin, dass Hydrophobine eine eng verwandte Gruppe morphogenetischer Proteine darstellen (Bayry *et al.*, 2012). Die Deletionen von Hcf-1 und Hcf-6 aus *C. fulvum* führen hingegen zu keiner Reduktion der Pathogenität (Spanu, 1998; Whiteford *et al.*, 2004; Whiteford und Spanu, 2001).

Im Durchschnitt sind zwei bis sieben verschiedene Hydrophobine pro Spezies vorhanden, allerdings wurden auch schon 34 Hydrophobine in *Coprinopsis cinerea* gefunden (Stajich *et al.*, 2010). Die Anhäufung unterschiedlicher Hydrophobine kann als Folge der Expression unterschiedlicher Entwicklungsstadien bzw. der Anpassung an Umweltbedingungen erklärt werden. Es wäre auch möglich, dass sie redundante Funktionen erfüllen (Linder *et al.*, 2005).

2.2. Hydrophobine in *Aspergillus nidulans*

Auch *A. nidulans*, ein filamentös wachsender homothallischer Ascomycet, besitzt mehrere Hydrophobine. Entdeckt wurde das Erste während einer Suche nach differenziell exprimierten Genen, die während der asexuellen Entwicklung induziert werden. Die anschließende Deletion des entsprechenden Gens, *rodA*, führte zu einer Veränderung der Sporenoberfläche und dem Verlust der *Rodlet* - Schicht. Aufgrund des Verlustes dieses Proteins waren entsprechende Kolonien weniger hydrophob und es fand eine geringere Ausbreitung der Sporen statt (Stringer *et al.*, 1991). Ein weiteres Gen aus dem *Screen* nach differentiell exprimierten Genen war *dewA*, welches ebenfalls für ein kleines Protein kodierte, dessen Deletion zu einer erhöhten Aufnahme detergenzhaltiger Lösungen in sporulierender Kolonien führte. Der Name *dewA* (*detergent wettable phenotype*) wurde auf Grund dieses Phänotyps gewählt (Stringer und Timberlake, 1995). Nach *in silico* Genomanalysen wurden vier

weitere Hydrophobine entdeckt (de Groot *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010; Throm, 2011), die in unserer Gruppe charakterisiert wurden. Alle sechs Hydrophobine besitzen ein Signalpeptid und zeigen die acht konservierten Cysteine. Die vier neuen Hydrophobine wurden DewB, DewC, DewD und DewE genannt (Abbildung 6).

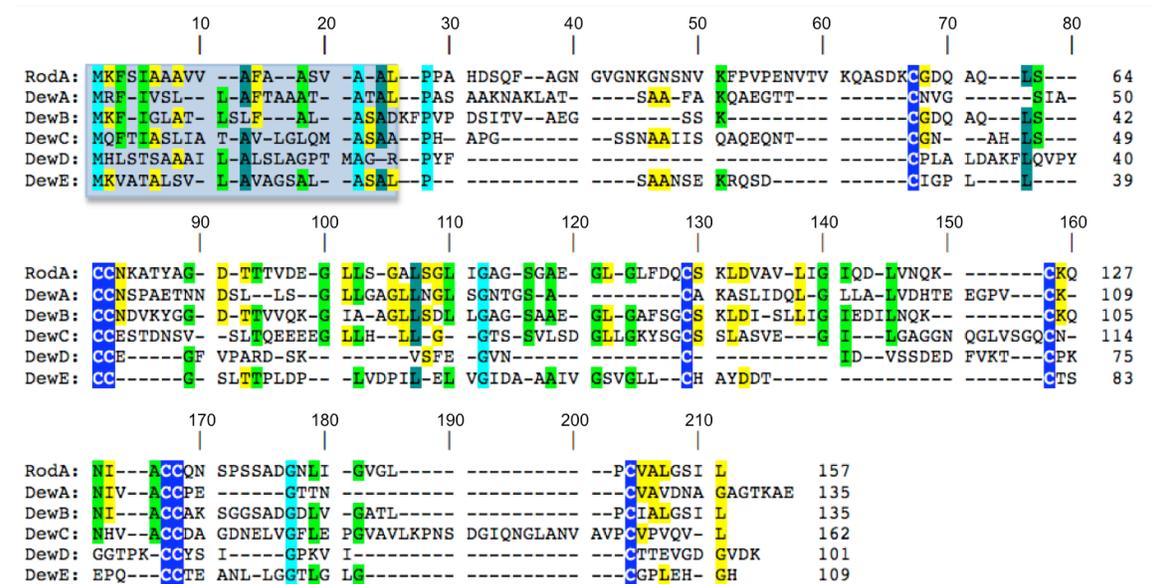


Abbildung 6: Alignment der sechs *A. nidulans* Hydrophobine. Bei allen Hydrophobinen konnte mit Hilfe des Programms SignalP 4.1 ein Signalpeptid (grauer Kasten) vorausgesagt werden. Die acht konservierten Cysteine sind dunkelblau unterlegt. Die Sequenzen zeigen wie für Hydrophobine typisch nur geringe Homologien (verändert nach Grünbacher, 2011).

Die Expressionen von RodA, DewA, DewB und DewC während der asexuellen Entwicklung von *A. nidulans* wurden mittels *Northern Blot* untersucht (Throm, 2011). *A. nidulans* besitzt die Fähigkeit sich sowohl sexuell als auch asexuell zu vermehren. Die sexuelle Vermehrung findet in Dunkelheit und erhöhter CO₂-Konzentration statt. Dagegen kommt es zur asexuellen Vermehrung bei einer erhöhten Sauerstoffkonzentration und unter Lichteinfluss (Adams, 1998; Rodriguez-Romero *et al.*, 2010). Unter normalen Laborbedingungen geht *A. nidulans* folglich den asexuellen Lebenszyklus ein. Dabei wird etwa sechs Stunden nach der Induktion der asexuellen Entwicklung der Vesikel der Konidiophore gebildet. Zwei Stunden später entwickeln sich die Metulae, die jeweils einen Kern enthalten und sich durch zweimaliges Teilen nach etwa 12 Stunden zur Phialidenschicht ausbilden. Die Bildung der Konidiosporen wird durch die mitotische Kernteilung

ausgelöst, wobei ein Zellkern in der Phialide verbleibt und der andere in die neu gebildete Spore wandert. Es entstehen Ketten einkerniger Sporen an den Phialidenspitzen (Adams, 1998; Boylan *et al.*, 1987; Sewall *et al.*, 1990) (Abbildung 7a)).

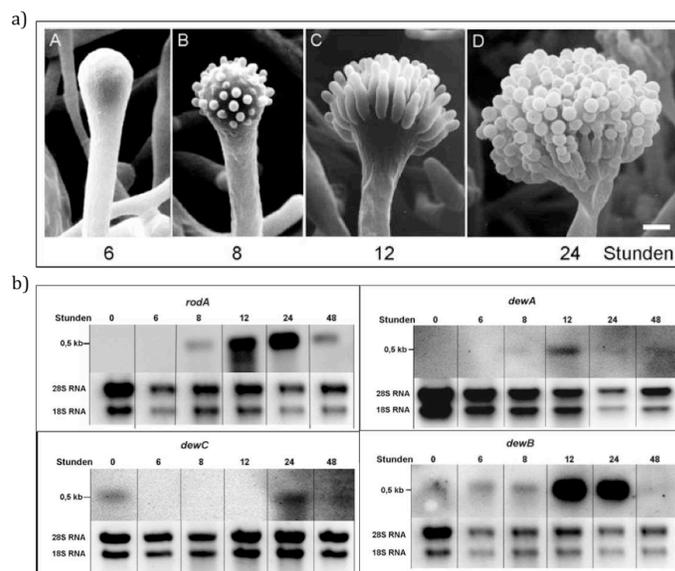


Abbildung 7: Entwicklungsstadien der Konidiosporen-Bildung und Expressionsanalysen von vier *A. nidulans* Hydrophobinen. a) (A) Zu Beginn der asexuellen Entwicklung entsteht aus der Fußzelle ein Stiel, welcher während des weiteren Wachstums ein Vesikel ausbildet. (B) Durch Teilung entstehen die Metulae und danach die Phialiden (C). Am Ende werden die Sporen gebildet (D), welche einkernig sind und die asexuelle Entwicklung abschließen (verändert nach Munk *et al.*, 2008). b) Northern Blot Analysen zur Hydrophobinexpression während der asexuellen Entwicklung: DewB wird als erstes Hydrophobin nach sechs Stunden exprimiert. Es folgen RodA nach acht Stunden, DewA nach 12 Stunden und DewC nach 24 Stunden, während der Sporenbildung (verändert nach Throm, 2011).

Die *Northern Blot* Untersuchungen (Abbildung 7b) zeigten, dass DewB schon nach sechs Stunden, also während der Vesikel-Bildung, exprimiert wird. Zwei Stunden später während der Metulae-Bildung erfolgte die Expression von RodA. DewA wird während der Phialidenschicht-Bildung exprimiert. Als letztes folgt DewC bei der Konidiosporenbildung (Abbildung 7b).

Nach Deletionen aller sechs Hydrophobine konnte zwar bei allen Stämmen eine verminderte Hydrophobizität festgestellt werden, allerdings zeigte nur die RodA Deletion den Verlust der *Rodlet*-Struktur (Grünbacher, 2011; Throm, 2011). Aufgrund ihrer Länge und dem charakteristischen AS-Abstand zwischen den

Cysteinen wurden alle sechs Hydrophobine der Klasse I zugeordnet. Nach Lokalisationsstudien wurden alle Hydrophobine auf der Sporenoberfläche gefunden (Throm, 2011; Grünbacher, 2011). Dennoch führte nur die Deletion von RodA zu einem Verlust der *Rodlet* - Struktur (Abbildung 8).

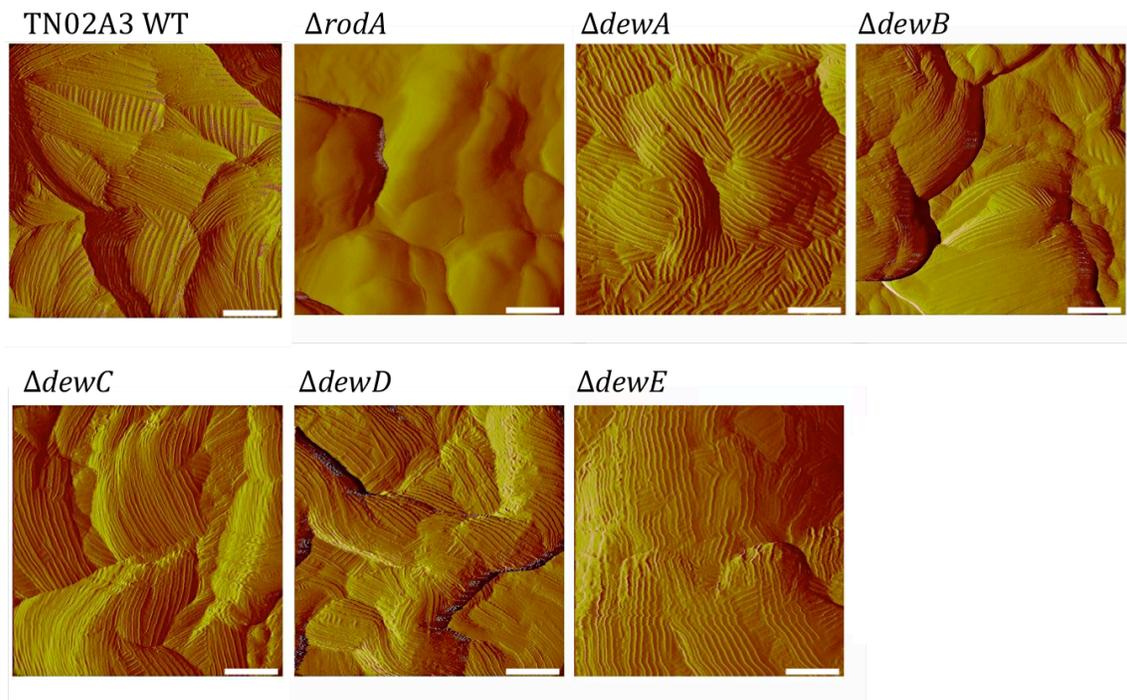


Abbildung 8: AFM (Atomic Force Microscopy) - Aufnahmen des Wildtyps und aller Hydrophobin Deletionsstämmen. Die Sporenoberflächen wurden mit einer Sonde (*cantilever*) abgetastet und so ein Abbild geschaffen. Die faltige Rodlet-Struktur ist bei allen Stämmen außer der Δ RodA-Deletion zu erkennen. (Zur Verfügung gestellt von Paul Vincze, INT, KIT Campus Nord).

Nach neuesten *in silico* Analysen sind in *A. nidulans* vier weitere putative Hydrophobine zu finden (Littlejohn *et al.*, 2012) (Tabelle 1). Diese besitzen neben den acht konservierten charakteristischen Cysteinen noch weitere Cysteine in ihren Sequenzen. Außerdem besitzen alle ein Signalpeptid und sind länger als durchschnittliche Klasse I Hydrophobine (Wessels, 1994). Der Hydrophobincharakter dieser neu vorausgesagten Proteine muss noch nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Charakteristika der 10 Hydrophobine aus *A. nidulans*

Annotation	Name	Gensequenz [nt]	Anzahl Aminosäuren	Cysteine	Größe
AN8803	RodA	474	157	8	15,6 kDa
AN8006	DewA	408	135	8	13,2 kDa
AN1837	DewB	408	135	8	13,4 kDa
AN6401	DewC	432	143	8	16,1 kDa
AN0940	DewD	306	101	8	10,6 kDa
AN7539	DewE	330	109	8	10,8 kDa
AN4845		1128	376	28	39,8 kDa
AN5290		525	175	10	17,8 kDa
AN7327		658	179	10	19,0 kDa
AN11982		753	251	11	27,3 kDa

2.3. Biotechnologische Anwendungen von Hydrophobinen

Durch die Eigenschaft zur Selbstassemblierung von Hydrophobinen an Ober- oder Grenzflächen und die Stabilität einer solchen Beschichtung sind sie von großem Interesse für biotechnologische Anwendungen. Ein durch Klasse I Hydrophobine gebildeter amphipathischer Film lässt sich nur durch starke Säuren wie Ameisensäure oder Trifluoressigsäure lösen (Vries *et al.*, 1993; Wessels *et al.*, 1991). Auch Klasse II Hydrophobine bilden solche amphipathischen Filme. Sie sind allerdings weniger stabil und lassen sich schon von 60 % Ethanol, 2 % SDS, Druckaufbau oder Kühlung ablösen (Carpenter *et al.*, 1992; Russo *et al.*, 1982; Wösten und de Vocht, 2000).

Hydrophobine sind in der Lage Schaum und Emulsionen zu bilden, was in der Pharmaindustrie eingesetzt werden kann, in der Getränkeindustrie (vor allem bei Bier) hingegen als störend empfunden wird (Shokribousjein *et al.*, 2011). Nanopartikel oder Wirkstoffe werden durch eine Hydrophobinumlagerung geschützt (Basheva *et al.*, 2011; Valo *et al.*, 2010) oder hydrophobe Wirkstoffe

werden aufnehmbar gemacht (Haas Jimoh Akanbi *et al.*, 2010). Aus therapeutischer Sicht könnten die stabilen und immunologisch inerten Hydrophobine genutzt werden um Wirkstoffe zu umschließen und sie dosiert wieder freizugeben oder an einen bestimmten Wirkort zu leiten ohne vom Immunsystem erkannt zu werden (Bayry *et al.*, 2012). Die Fähigkeit von Hydrophobinen sich in Tensid-Wassergemischen in der nicht-ionischen Tensid-Phase anzureichern, kann zur selektiven Aufreinigung von Proteinen genutzt werden (Joensuu *et al.*, 2009; Lahtinen *et al.*, 2008). Zusätzlich können sie zur Stabilisierung von Emulsionen eingesetzt werden (Wohlleben *et al.*, 2009). Immobilisierungen von Proteinen, Enzymen und antibakterieller Substanzen können durch Hydrophobinbeschichtungen ermöglicht werden und somit möglicherweise das *Biofouling* an Schiffsrümpfen verhindern (Corvis *et al.*, 2005; Hektor und Scholtmeijer, 2005; Qin *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009). Bisher war es nicht möglich Hydrophobine im großen Maßstab zu produzieren. Es wurden lediglich geringe Mengen von Klasse I Hydrophobinen durch eine komplexe Aufreinigung mit heißer SDS-Lösung und Trifluoressigsäure aus Pilzkulturen erzielt (Scholtmeijer *et al.*, 2001). Eine Überexpression rekombinanter Hydrophobine in *E. coli* im Großmaßstab gelang erstmals der BASF (Wohlleben *et al.*, 2009). Hierbei wurde das Klasse I Hydrophobin DewA aus *A. nidulans* mit einer Synthase aus *Bacillus subtilis* fusioniert und somit die Aufreinigung aus Einschlusskörperchen ermöglicht. Boeuf *et al.* (2012) fusionierten diese Hydrophobine mit Bindungsaktiven Peptiden (LG3 und RGD) um eine erhöhte Bindung an Stammzellen zu erwirken. Ziel war es, die Abstoßung von Implantaten durch den Körper einzudämmen. Die Stabilität der Beschichtung der rekombinanten Hydrophobine und deren Auswirkung auf den Biofilmbewuchs beschichteter Oberflächen wurden untersucht (Rieder *et al.*, 2011). Dabei kam es zu keiner Beeinträchtigung des Biofilmwachstums. Modifikationen der Hydrophobine mit antimikrobiellen Peptiden sind ein nächster Schritt um den Biofilmbewuchs auf Oberflächen zu verhindern.

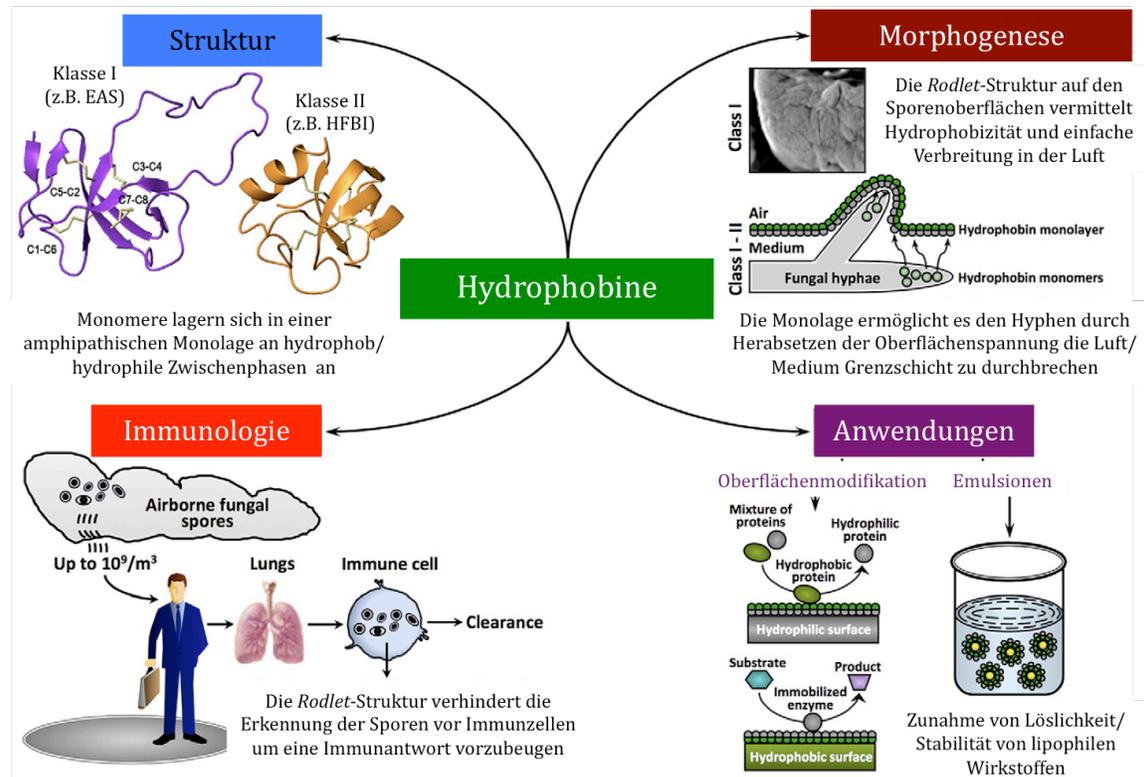


Abbildung 9: Zusammenfassung pilzlicher Hydrophobine. Hydrophobine sind einzigartige amphipathische Proteine mit einer Vielzahl an Aufgaben im pilzlichen Lebenszyklus und in der Vermittlung der Symbiose zwischen Pilz und Wirt. Es gibt eine große Diversität in den Primärstrukturen der Hydrophobine, allerdings sind die dreidimensionalen Tertiärstrukturen ähnlich. Dies ist durch die acht konservierten Cysteine bedingt, die vier Disulfidbrücken bilden und die Struktur stabilisieren. Die Möglichkeiten der Anwendung nehmen immer mehr zu, so können sie hydrophobe Nanomaterialien modifizieren und lipophile Wirkstoffe in Lösung bringen (verändert nach Bayry *et al.*, 2012).

3. Antimikrobielle Peptide

Die Entdeckung von Penicillin und die daraus resultierende medizinische Anwendung sind ein entscheidender Schritt in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Im Laufe der Zeit entwickelten Pathogene jedoch immer mehr Antibiotikaresistenzen, was eine ständige Weiterentwicklung und Forschung nach neuen antimikrobiell aktiven Substanzen erfordert.

Antimikrobielle Peptide (AMPs) werden von zahlreichen Organismen wie einzelligen, Insekten und anderen Invertebraten, Pflanzen, Amphibien, Vögeln, Fischen und Säugetieren einschließlich dem Menschen produziert (Hancock und Lehrer, 1998; Martin *et al.*, 1995a; Wang und Wang, 2004). Das Wirkspektrum

erstreckt sich dabei über Pilze, Viren, Parasiten und Bakterien, selbst über resistente Pathogene wie Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA)-Stämme und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) (Hancock, 2006; Jenssen *et al.*, 2006). Sie gehören dabei der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr an, welche das primäre Abwehrsystem der meisten Organismen darstellt (*host defence*) oder dienen der direkten Abtötung eindringender Pathogene (Hancock *et al.*, 2006; Oppenheim *et al.*, 2003; Zasloff, 2002). Diese Eigenschaft macht sie besonders interessant in der Erforschung von Antibiotika-Alternativen. Einer Datenbank zufolge sind mittlerweile 2.172 antimikrobielle Peptide beschrieben (Stand Februar 2013) (Wang *et al.*, 2009; Wang und Wang, 2004).

3.1. Aufbau und strukturelle Einteilung antimikrobieller Peptide

AMPs besitzen eine hohe strukturelle Diversität mit nur einigen gemeinsamen Eigenschaften. So haben diese Polypeptide eine Länge von 9 bis 50 Aminosäuren, eine positive Nettoladung durch eine Anhäufung an basischem Lysin und Arginin und bestehen aus bis zu 50 % hydrophoben Resten (Hancock, 2001). Sie sind in Genen kodiert und ribosomal exprimiert (Hancock und Chapple, 1999). Eine Einteilung der AMPs erfolgt durch die sekundäre Struktur (Andreu und Rivas, 1998) und lässt sich in vier Klassen einordnen (Brogden, 2005; Hancock, 2001) (Abbildung 10):

- a) β -Faltblatt Strukturen (z.B. humanes β -Defensin 1)
- b) amphipathische α -Helices (z.B. Magainin 2)
- c) Peptide mit Schleifenstruktur (z.B. Bactenecin)
- d) lineare, gestreckte Peptide (z.B. Indolicidin)

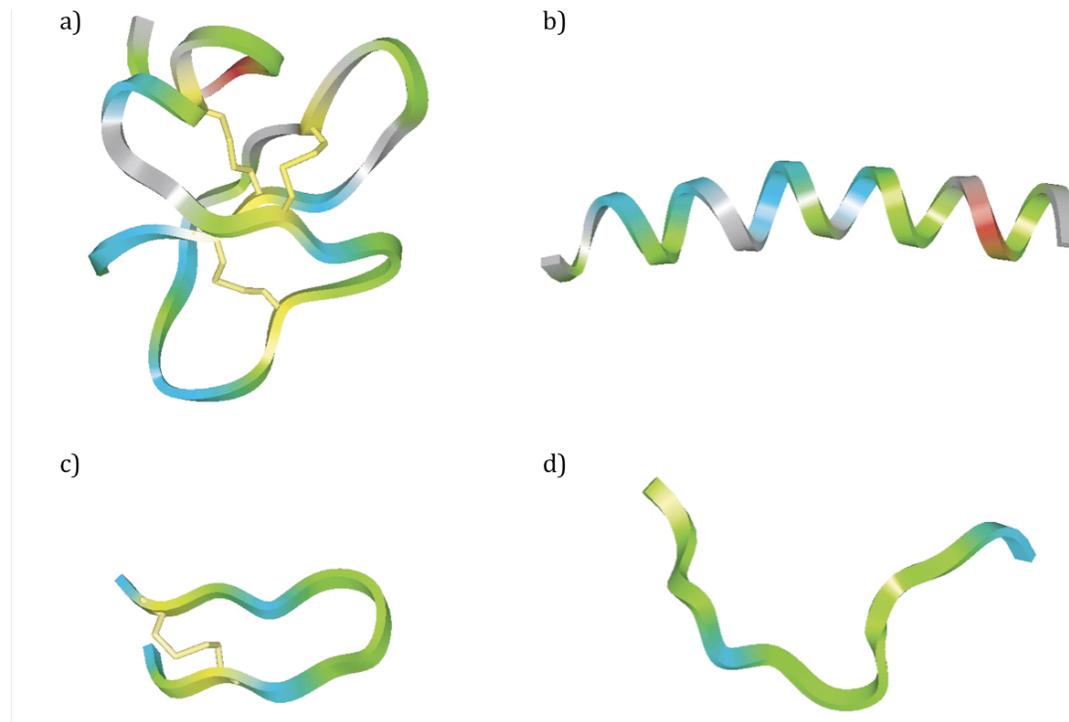


Abbildung 10: Vier Struktur-Klassen von AMPs. a) β -Faltblatt Strukturen: Zum Beispiel das humane β -Defensin 1, welches eine dreifache β -Faltblatt Struktur zeigt, die durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die N-terminale Region enthält in diesem Fall eine α -Helix. b) α -Helices: Zum Beispiel Magainin-2. c) Peptide mit Schleifenbildung begründet durch eine Disulfidbrücke: Zum Beispiel Bactenecin, das eine β -Hairpin Struktur annimmt. d) lineare, gestreckte Peptide: Zum Beispiel Indolicidin. Solche Peptide enthalten weder α -Helix noch β -Faltblatt Elemente. Sie besitzen lediglich eine gestreckte spirale Struktur (Hanckock, 2001).

Peptide mit β -Faltblatt Strukturen (Abbildung 10 a) werden durch den Besitz von Cysteinresten und daraus folgender Ausbildung von einer bis drei Disulfidbrücken beschrieben. Zu dieser Klasse gehören unter anderem Protegrine und Defensine (Zasloff, 2002). Amphipathische α -helikale Peptide (Abbildung 10 b) nehmen erst in Gegenwart von anionischen Tensiden (SDS), Alkoholen (Trifluorethanol), Phospholipid-Vesikeln und Liposomen ihre Struktur ein. In wässrigen Lösungen sind sie unstrukturiert. Je höher die α -helikale Struktur ausgeprägt ist, desto stärker ist die antimikrobielle Wirkung (Park *et al.*, 2000). Beispiele für α -helikale Peptide sind das humane LL-37 und Magainin-2 (Brogden, 2005). Peptide mit β -Faltblatt und α -helikalen Strukturen sind die am verbreitetsten in der Natur (Hanckock, 2001).

3.2. Antibakterielle Aktivität antimikrobieller Peptide

Elektrostatische und hydrophil-hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und in der Regel positiv geladener, amphiphiler AMPs sind die treibende Kraft der Permeabilisierung bakterieller Zytoplasmamembranen (Brogden, 2005). Die negativ geladenen bakteriellen Membranen ziehen kationische Peptide an, die durch ihre Amphiphilie in die Membran integrieren und permeabilisieren können (Brogden, 2005). Zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkungsweise auf die Zytoplasmamembran wurden künstliche Lipiddoppelschichten genutzt (Jelinek und Kolusheva, 2005). *In vivo* müssen sie um zur Zytoplasmamembran durchzudringen bei Gram-negativen Bakterien die erste Membran, die reich an Lipopolysacchariden (LPS) ist, durchqueren. Dies geschieht über die elektrostatische Wechselwirkung kationischer Peptide und den LPS, wobei zweiwertige Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) verdrängt werden und so die Stabilität der äußeren Membran gestört wird. Die durchlässige äußere Membran wird durch einen sogenannten *self-promoted Uptake* von weiteren antimikrobiellen Peptiden durchquert (Hale und Hancock, 2007). Bei Gram-positiven Bakterien muss zunächst die Mureinschicht durchdrungen werden.

Zur Permeabilisierung der Zytoplasmamembran gibt es drei unterschiedliche Erklärungsmodelle. Das *torodial* Modell (*wormhole*) zeigt Porenbildungen verursacht durch Spannungen in der Membran, die zu positiven Krümmungen führen. Dabei kleiden sowohl die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide als auch die hydrophilen Bereiche der antimikrobiellen Peptide die Poren aus (Hale und Hancock, 2007). Beim *barrel-stave* Modell werden Poren gebildet, die nur aus den hydrophilen Bereichen der antimikrobiellen Peptide bestehen. Dabei sollten die Peptide lang genug sein um die gesamte Membran durchspannen zu können (Hale und Hancock, 2007). Das *carpet-like* Modell gibt die Wirkungsweise kurzer antimikrobieller Peptide wieder, die nicht in der Lage sind die Zytoplasmamembran zu durchspannen. Hierbei akkumulieren die Peptide auf einer Seite der Zytoplasmamembran und nach Erreichen einer Grenzkonzentration kommt es zu

keiner Porenbildung, sondern zum Zusammenbruch und Auflösung der Membran (Hancock und Chapple, 1999).

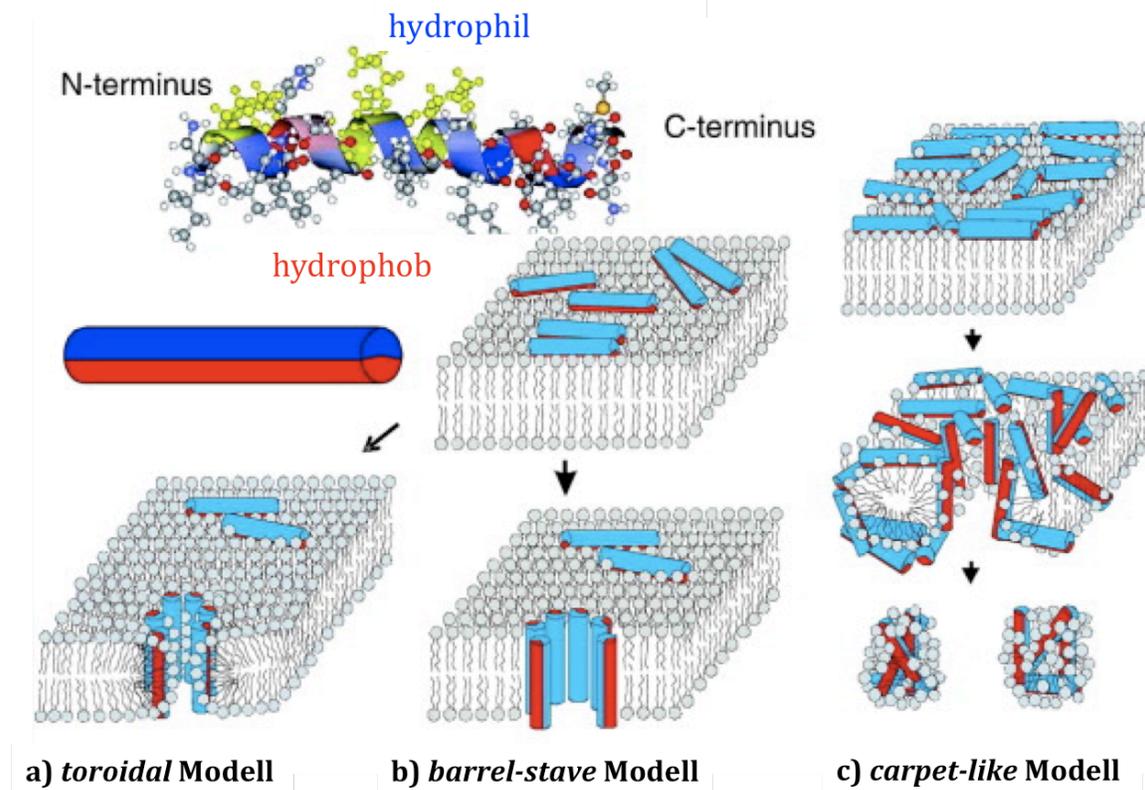


Abbildung 11: Drei Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide auf die bakterielle Zytoplasmamembran. a) Beim *toroidal* Modell werden Poren geformt, die sowohl aus Phospholipidköpfen als auch hydrophilen Bereichen der antimikrobiellen Peptide bestehen. b) Das *barrel-stave* Modell zeigt Poren, die durch das Durchspannen antimikrobieller Peptide durch die Membran entstehen. Hierbei müssen die Peptide eine bestimmte Grundlänge besitzen. c) Beim *carpet-like* Modell kommt es zur Akkumulation antimikrobieller Peptide auf einer Seite der Phospholipiddoppelschicht und darauf folgend zu deren kompletten Zerstörung und Auflösung (verändert nach (Glinel *et al.*, 2012)).

Ein anderer Ansatz zur Wirkungsweise beinhaltet die Penetration der Membran durch die Peptide ohne Porenbildung (Brogden, 2005). Das Ziel der Peptide hierbei ist die Störung intrazellulärer Prozesse wie die Proteinsynthese, DNA Replikation oder Zerstörung von Mitochondrien (Boman, 2003; Gennaro *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2000).

In den durch AMPs angegriffenen Bakterien dienen Zweikomponentensysteme und *Extracytoplasmic function* (ECF) σ -Faktoren zur Stressantwort (Pietiäinen *et al.*, 2005; Staron *et al.*, 2010). Dies wurde in dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis*

unter anderen mit den AMPs Nisin, Plectasin und LL-37 untersucht (Pietiäinen *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2010; Staron *et al.*, 2010). Die Zellhüllstressantwort dient der Überwachung und dem Schutz der Bakterienzelle und besteht aus zwei signaltransduzierenden Systemen, die die extrazellulären Signale erkennen: Zweikomponentensysteme (Abbildung 12) und *Extracytoplasmic function* (ECF) σ -Faktoren.

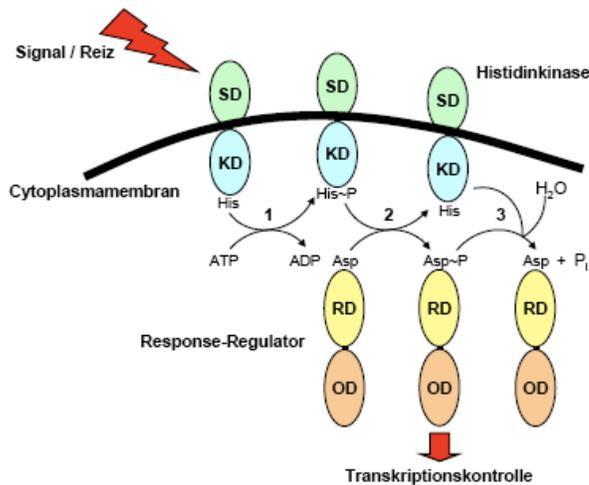


Abbildung 12. Funktionsweise von Zweikomponentensystemen. SD (Sensordomäne) und KD (Kinasedomäne) stellen die Komponenten der Histidinkinase dar und RD (Receiver-Domäne; hier auch regulatorische Domäne genannt) und OD (Output-Domäne; hier auch Effektor-Domäne genannt) den Response-Regulator. Zur Vereinfachung ist nur ein Monomer der Histidinkinase dargestellt, obwohl diese in Dimeren vorkommen (verändert nach (West und Stock, 2001)).

Beide Systeme bestehen aus zwei Proteinen, einem membranständigen Sensor, welcher das Signal detektiert, und einem Regulator, welcher als zelluläre Antwort auf den Stimulus meist die Genexpression reguliert (Helmann und Moran, 2002). Bei den Zweikomponentensystemen basiert die Signalübertragung zwischen den beiden Komponenten auf Phosphorylierungen. Dabei stellt eine Histidin-Kinase, die aus zwei Domänen, einer stark variierenden, stimuluspezifischen Sensor-Domäne und einer hochkonservierten Kinase-Domäne besteht, den Sensor dar. Bei der Erkennung eines Signals kommt es zu einer Konformationsänderung der Kinase, die in einer Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes mündet. Die zweite Komponente, der Response-Regulator, der neben der regulatorischen Domäne eine Effektor-Domäne besitzt, die die zelluläre Reaktion vermittelt (Stock *et*

al., 2000), wird nun phosphoryliert. Die Phosphatgruppe wird vom Histidinrest der Histidinkinase auf einen Aspartatrest innerhalb der regulatorischen Domäne des Response-Regulators übertragen. Die Effektor-Domäne des Response-Regulators ist im Normalfall eine DNA-Bindedomäne, somit kann man die Response-Regulatoren als Transkriptionsfaktoren bezeichnen (Mizuno, 1997). Der Responseregulator kann nun entweder als Aktivator oder Repressor die Expression der Zielgene regulieren (Helmann und Moran, 2002). Die Inaktivierung des Response-Regulators erfolgt durch Dephosphorylierung, welche von dem Response-Regulator selbst, durch die zugehörige Histidin-Kinase oder einer externen Aspartat-Phosphatase katalysiert wird (Perego, 2001; Stock *et al.*, 2000).

3.3. Fungizide Aktivität antimikrobieller Peptide

Die Wirkung der AMPs auf Pilze ist weit weniger untersucht. Die Diversität unterschiedlicher AMPs lassen auch keine generelle Wirkungsweise auf die pilzliche Zelle zu (van der Weerden *et al.*, 2013). Ein einzelnes antimikrobielles Peptid kann unterschiedliche Wirkungen abhängig von der Zielzelle entfalten (van der Weerden *et al.*, 2013). Auch unterscheidet sich die pilzliche Zellhülle sehr von der bakteriellen. Pilze besitzen eine feste Zellwand, die aus Glucan-, Mannanpolymeren, Proteinen und Chitin besteht. Die Zellwand filamentöser Pilze (*Ascomycten* und *Basidomycten*) besteht hauptsächlich aus (1,3)/(1,6) β -Glucan-Chitin-Komplexen, (1,3) α -Glucan und (Glyko-)Proteinen (van Wetter *et al.*, 2000). Die Zellmembran besteht neben Phospholipiden aus Sphingolipiden und Sterolen. Bakterielle Lipide sind vor allem Phosphatidylglycerol und Cardiolipin, während sich in der pilzlichen Membran hauptsächlich Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol befinden (Theis und Stahl, 2004). Die Sterole in tierischen Zellen sind hauptsächlich Cholesterin und in niedrigeren Eukaryoten wie Pilzen Ergosterol (Bloch, 1983). Der Unterschied in der Zellwand und -membran Komposition wirkt sich auch auf die Wirkungsweise der AMPs aus (van der Weerden *et al.*, 2013). Kurze synthetische Peptide können entweder die Zellmembran durchqueren ohne sie zu zerstören und dann Ziele innerhalb der Zelle angreifen (Lopez-Garcia *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 2013) oder sich in die Plasmamembran integrieren (Mania *et al.*, 2010). Da pilzliche

Zweikomponentensysteme unter anderen ebenfalls bei Zellhüllstress wie Temperatur, Licht, pH-Unterschiede und Osmolarität eine Rolle spielen (Miskei *et al.*, 2009), werden diese in *A. nidulans* in Bezug auf AMP-Stress untersucht.

3.4. Kurze, synthetische AMPs

Seit der Entdeckung antimikrobieller Peptide sind bis heute eine große Anzahl unterschiedlicher Peptide beschrieben worden (Wang *et al.*, 2009). Die Produktion solcher Peptide über konventionelle Festphasensysteme *in vitro* ist aufwendig und kostspielig und führt zu bescheidenen Ergebnissen bei Peptidoptimierungen (Hancock und Sahl, 2006). Kleine Peptide, die eine Anreicherung an Tryptophan (W) und Arginin (R) haben, zeigen eine hohe antimikrobielle Aktivität und dienen als Ausgangsmoleküle zur Optimierung antimikrobiell aktiver Peptide (Hilpert *et al.*, 2005). Eine Methode um eine große Anzahl von Peptiden zu synthetisieren wurde 1992 von Ronald Frank entwickelt und SPOT-Synthese genannt (Frank, 1992). Dabei werden Peptide im großen Durchsatz auf Cellulosemembranen synthetisiert. Die Peptide werden durch die Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Gruppe geschützt vom C - zum N - Terminus synthetisiert. Dies erlaubt den Einsatz natürlicher L - und D -, sowie unnatürlicher Aminosäuren als auch anderer organischer Stoffe (Hilpert *et al.*, 2005). Durch Pipettierroboter kann der Durchsatz an verschiedenen Varianten des Peptides auf bis zu 8.000 oder bei größeren Mengen (größeren *spots*) auf bis zu 1.000 pro Cellulosemembran erhöht werden (Hilpert *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 1997). Gleichzeitig wurde die antimikrobielle Aktivität der neu synthetisierten Peptide auf *P. aeruginosa* untersucht. Der Bakterienstamm besitzt eine Luciferase-Aktivität, welche photometrisch nachgewiesen werden kann und proportional zum Zelltod abnimmt (Hilpert *et al.*, 2005). Mit Hilfe dieser Anwendungen lassen sich pro Pipettierroboter bis zu 50.000 Peptide pro Jahr synthetisieren und auf ihre antimikrobielle Wirkung untersuchen (Hancock und Sahl, 2006).

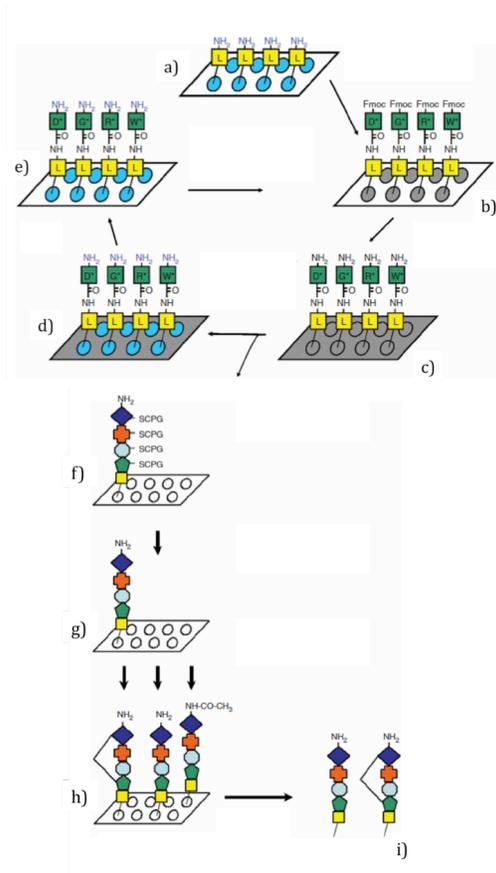


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Peptidsynthese nach der SPOT-Methode. Eine Zellulosemembran wurde vorbereitet indem die freien OH-Gruppen mit durch Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl) geschützten Alaninen gebunden werden. Fmoc wird abgespalten und durch die Färbung der freien AS werden die erfolgreichen Bindungen dargestellt (blaue Punkte). Es folgt der AS-Bindungs-Zyklus (a-e). Der Linker bestehend aus zwei Alaninen ist mit einem gelben L gekennzeichnet. a) Durch Fmoc geschützte AS werden an den Linker gebunden und b) Fmoc abgespalten. c) Durch Färbung wird die wieder freie AS gekennzeichnet (blaue Punkte). In diesem Schritt kann man auch AS-Modifikationen vornehmen. Die graue Farbe der Membran deutet auf eine Behandlung mit Lösungsmitteln hin. e) Die Membran wird getrocknet (weiße Farbe). f) Die unterschiedlichen Formen deuten unterschiedliche AS an. Die Seitenketten sind geschützt mit SCPG (*side chain protection group*). g) Diese Gruppen werden abgespalten. h) Unterschiedliche Peptidkonformationen sind symbolisch dargestellt (z. B. durch Disulfidbrückenbindungen). i) Fertige Peptide werden von der Membran abgespalten. (verändert nach (Hilpert *et al.*, 2007)).

Bactenecin (RLCRIVVIRVCR) ist eines der kleinsten natürlichen AMPs und ist in den Neutrophilen von Rindern gefunden worden (Romeo *et al.*, 1988). Die Aktivität gegenüber Gram-negativen (*E. coli*, *P. aeruginosa*) und Gram-positiven Bakterien (*Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*) ist mäßig. Die natürliche Variante des Peptides ist durch eine Disulfidbrücke stabilisiert, eine linierisierte Variante (Bac2A: RLARIVVIRAR-NH₂) hingegen zeigt eine höhere Aktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien aber eine ähnliche Aktivitäten gegenüber Gram-negative Bakterien (Wu und Hancock, 1999). Die geringe Größe, Linearität und Aktivität gegenüber Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien machen dieses Peptid zu einem guten Kandidaten um eine neue Klasse der antimikrobiellen Wirkstoffe zu entwickeln (Hilpert *et al.*, 2005). Synthetische Peptide, die auf dem natürlichen Peptid Bactenecin beruhen, wurden in dieser Arbeit verwendet.

4. Mikroorganismen als Ganzzell-Biokatalysatoren

Die Darstellung von Peptiden oder Proteinen mit ausgeprägten Funktionen an Zelloberflächen bringen erhebliche Vorteile für viele biotechnologische Anwendungen mit sich (Lee *et al.*, 2003; Wernerus und Stahl, 2004) (Abbildung 14).

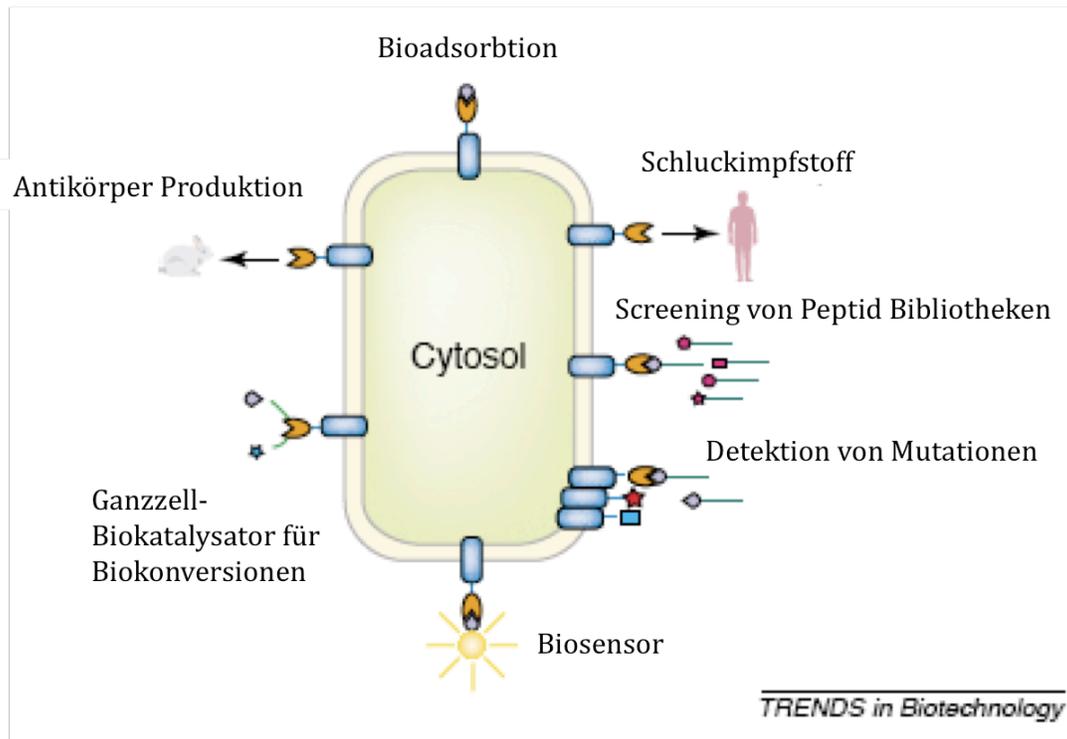


Abbildung 14: Anwendungen von mikrobiellen Zelloberflächen Display. (verändert nach Lee *et al.*, 2003).

So können sie zur Lebendimpfstoffentwicklung beitragen, indem durch Immobilisierung von heterologen Epitopen eine Antigen-spezifische Antikörper-Antwort hervorgerufen wird (Lee *et al.*, 2000; Liljeqvist *et al.*, 1997). Auch können Peptid Bibliotheken angefertigt werden, indem zum Beispiel eine Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung durchgeführt wird (Boder und Wittrup, 1997). Durch Expressierung von Antigenen an Zelloberflächen, kommt es zur Antikörper-Produktion in Tieren (Martineau *et al.*, 1991). Zusätzlich lassen sich schädliche Chemikalien und Schwermetalle entfernen, wenn Adsorptionsmittel an Zellen immobilisiert werden (Bae *et al.*, 2000; Bae *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 1998; Xu und Lee, 1999). Nutzbar ist das System ebenfalls zur Detektion von Mutationen nach

einem Austausch einzelner Aminosäuren durch zufällige Mutagenese (Aoki *et al.*, 2002). Als Biosensoren durch Verankerung von Enzymen, Rezeptoren oder andere Signal-sensitiver Substanzen sind diese Systeme in der Diagnostik und bei industriellen und umweltbedingten Zwecken einsetzbar (Dhillon *et al.*, 1999; Shibasaki *et al.*, 2001). Weiterhin werden immobilisierte Enzyme als Ganzzell-Katalysatoren genutzt (Richins *et al.*, 1997). Das an der Oberfläche dargestellte Molekül ist dabei für das Substrat oder dem Bindungspartner frei zugänglich. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Proteine stabiler sind, wenn sie an eine Matrix gebunden sind (Jose und Meyer, 2007). In diesem Fall dient die Zelloberfläche als Matrix. Proteine an Zelloberflächen darzustellen hat den Vorteil keine Proteinaufreinigung durchführen zu müssen, was eine beträchtliche Zeitersparnis bedeutet (Jose und Meyer, 2007). Darüber hinaus lassen sich ganze Zellen nach Beendigung enzymatischer Reaktionen einfach durch Zentrifugation separieren.

Das erste System zur Koppelung von Proteinen an Zelloberflächen geschah in einem filamentösen Phagen (Smith, 1985). Hierbei wurden Peptide und kleine Proteine zusammen mit dem PIII Protein des Phagen exprimiert. Mittlerweile werden Hefen (Kuroda und Ueda, 2010; Schreuder *et al.*, 1996), Gram-positive (Stahl *et al.*, 2000) und Gram-negative (Schumacher und Jose, 2012) Bakterien genutzt. Es gibt vier Mindestanforderungen für ein *Carrier*-Protein an das das zu exponierende Protein gebunden wird (Lee *et al.*, 2003). Es sollte erstens ein effizientes Signalpeptid besitzen, welches dem unfertigen Fusions-Protein erlaubt die innere Membran zu durchdringen. Zum Zweiten sollte ein starker Anker das Fusionsprotein an der Zelloberfläche befestigen. Drittens sollte das Carrier-Protein kompatibel zur Fremdsequenz sein und nicht dadurch destabilisiert werden. Und viertens sollte es gegenüber Proteasen des periplasmatischen Raums resistent sein. Zur Immobilisierung von Proteinen an Sporenoberflächen filamentöser Pilze sind daher Hydrophobine sehr gut geeignet. Sie werden sekretiert und im Fall des Klasse I Hydrophobins RodA durch GPI-Anker in der Sporenmembran befestigt (de Groot *et al.*, 2009).



III Ergebnisse

Kapitel 1

Funktionalisierung technischer Oberflächen mittels pilzlicher Hydrophobine

Hydrophobine sind Proteine, die eine Größe von 100 bis 150 Aminosäuren besitzen und in Pilzen, aber nicht in Hefen zu finden sind. Diese Proteine haben einen amphiphilen Charakter und reichern sich an flüssig-gasförmigen Zwischenphasen an. DewA, eins der Hydrophobine aus *A. nidulans*, kann mithilfe einer Modifikation großtechnisch aus *E. coli* aufgereinigt und für Oberflächenbeschichtungen genutzt werden (Wohlleben *et al.*, 2009). Dieses Verfahren wurde von der BASF SE (Ludwigshafen) etabliert. Dazu wurden Fusions-Hydrophobine hergestellt, die ein Produkt aus dem pilzlichen Hydrophobin DewA und einer Synthase (YaaD) sind. Überexpression mit dem pilzlichen Hydrophobin RodA führten zu einer geringen Ausbeute und wurden daher nicht weiter berücksichtigt (nicht veröffentlicht, Claus Bollschweiler, BASF SE). Die Synthase stammt aus dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* und dient dort der Vitamin B₆ - Biosynthese (Sakai *et al.*, 2002). Auf Grund dieser Fusion ist es möglich Hydrophobine in einem bakteriellen System (*E. coli*) zu überexprimieren und aufzureinigen. Hydrophobine lagern sich wahrscheinlich durch ihre amphiphilen Eigenschaften in die bakterielle Zellmembran ein und führen somit zur Membranpermeabilisierung. Dies macht die Aufreinigung aus sogenannten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) erforderlich (Wohlleben *et al.*, 2009). Eine auf 40 Aminosäuren (AS) verkürzte Version der Synthase (YaaD*) reicht dabei aus die Expression in *E. coli* zu ermöglichen (Wohlleben *et al.*, 2009). Das Fusionsprotein H* Protein B wird im Laufe dieser Arbeit verwendet und weiteren Modifikationen unterworfen.

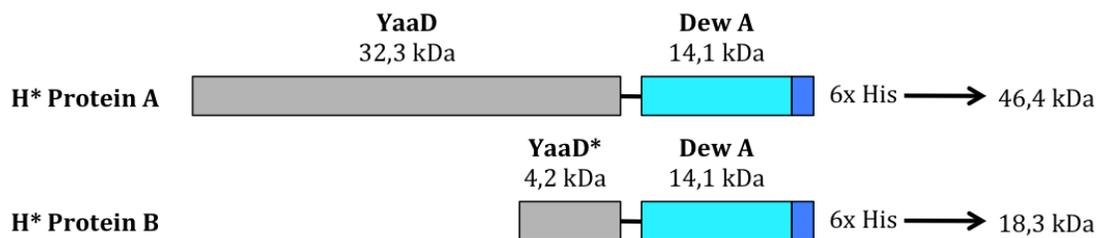


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Fusions-Hydrophobine. Das Hydrophobin DewA des Ascomyceten *A. nidulans* ist mit der Synthase YaaD aus *B. subtilis* fusioniert und wird in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) angereichert. Aus den Einschlusskörperchen werden die Fusionshydrophobine aufgereinigt. Dargestellt sind das Fusions-Hydrophobin mit der vollständigen und das mit einer stark verkürzten Version der Synthase YaaD. Diese nunmehr auf 40 Aminosäuren (AS) gekürzte Version ermöglicht noch die Überexpression in *E. coli*. Das Fusionskonstrukt mit der verkürzten Synthase (YaaD*) wird in dieser Arbeit verwendet.

1.1. Bakterielle Expression von H* Protein B

Zur Proteinexpression und Modifikation der Fusionshydrophobine wurde das Plasmid pBASF 2 verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der BASF SE). Dieses Plasmid wurde mit dem üblicherweise für Proteinexpressionen genutzten Stamm *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS transformiert. Vor einer Induktion wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,8 bis 1,0 wachsen gelassen. Zur Proteinexpression im Labormaßstab wurden Wachstumstemperaturen von 25 °C bis 37 °C getestet. Zusätzlich wurden unterschiedliche Konzentrationen des T5-Promotor Induktors IPTG (Isopropyl-β-D Thiogalaktopyranosid) und verschiedenen lange Induktionszeiten untersucht. Die optimalen Bedingungen zur Überexpression des H* Protein B sind nach Induktion mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG bei 37 °C und einer Wachstumszeit von vier bis sechs Stunden oder über Nacht (Throm, 2011). Die Zellen wurden nach der Expression durch Zentrifugation geerntet und mit einer *French Pressure Cell Press* (Aminco, USA) aufgeschlossen. Die Einschlusskörperchen wurden durch weitere Zentrifugationsschritte aufgereinigt und durch eine pH-Degradierung von pH 12 auf pH 8 bis pH 9 aufgeschlossen. Das H* Protein B befindet sich nach einem weiteren Zentrifugationsschritt im Überstand und wird lyophilisiert. Es kann in SDS -Gelen und durch die sechsfache His-Markierung am C-Terminus in dazugehörigen *Western Blots* nachgewiesen werden (Abbildung 16).

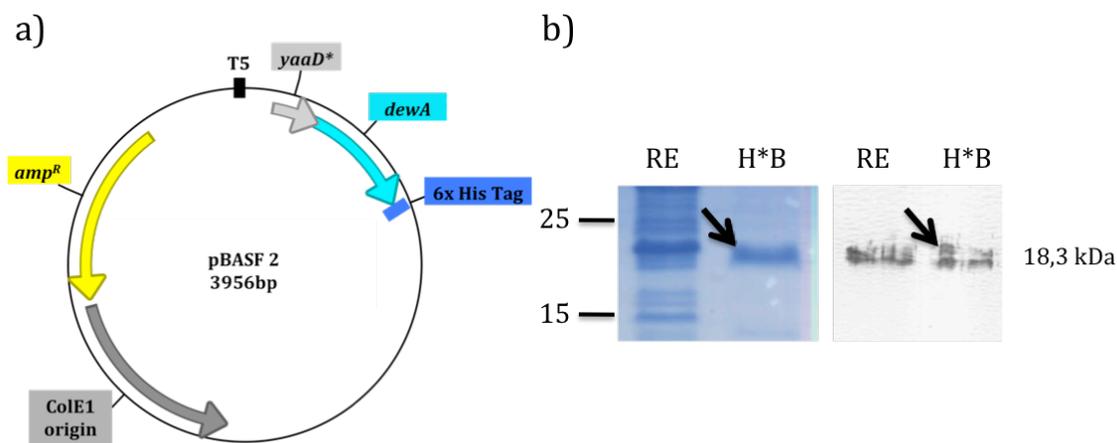


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pBASF2 und die Überexpression vom Fusionshydrophobin H* Protein B. a) Der Expressionsvektor pBASF 2 beruht auf dem pQE60 Expressionssystem der Firma Qiagen (Hilden). Der Vektor enthält eine Ampicillin Resistenz (Amp^R) und den durch IPTG (Isopropyl- β -D Thiogalaktopyranosid) induzierbaren Promotor T5. Das Fusionsprotein bestehend aus dem Hydrophobin DewA und der auf 40 AS verkürzte Synthase YaaD* hat am C-Terminus eine sechsfache Histidinmarkierung. Diese Markierung dient dem *Western Blot*-Nachweis mittels spezifischer Antikörper. Der Expressionsvektor pBASF 2 wurde mit dem Stamm *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS transformiert und bei einer OD_{600} von etwa 0,8 mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach einer Inkubation von sechs bis 16 Stunden werden die Zellen geerntet und mit Hilfe einer *French Pressure Cell Press* (Aminco, USA) aufgeschlossen. Die Einschlusskörperchen werden durch mehrere Zentrifugationsschritte aufgereinigt und durch eine pH - Degradierung von pH 12 auf pH 8,5 bis pH 9 mit 20 % H_3PO_4 zersört. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt befindet sich das Fusionsprotein im Überstand und wird gefriergetrocknet. b) SDS-Page (links) und *Western Blot* (rechts) zum Nachweis des überexprimierten Fusionsproteins H* Protein B. Es wurden sowohl der Rohextrakt (RE) direkt nach dem Zellaufschluss mit Hilfe der *French Press* als auch der das Fusionsprotein enthaltende Überstand aufgetragen. Bei einer Höhe von etwa 18,3 kDa sind Banden sichtbar. Für den *Western Blot* wurde das Protein mit einem Anti-His Antikörper (GE Healthcare, Chalfont St Giles) nachgewiesen.

1.2. Funktionalisierung H* Protein B mit antimikrobiellen Peptiden

Das bisher für Oberflächenbeschichtungen verwendete Fusionshydrophobin H* Protein B zeigte keine Effekte auf das Biofilmwachstum von Bakterien (Rieder *et al.*, 2011). Deshalb sollte getestet werden, ob eine antibakterielle Wirkung durch eine Fusion von H* Protein B mit antimikrobiellen Peptiden erzielt werden kann. AMPs sind kleine (9 bis 50 Aminosäuren) Peptide, die sowohl auf Bakterien als auch auf filamentöse Pilze (Giacometti *et al.*, 1999; Mania *et al.*, 2010) eine antimikrobielle Wirkung haben. Sie sind in der ganzen Natur verbreitet (in Säugetieren, Vögeln, Amphibien, Pflanzen und Mikroorganismen), wo sie in der immunologischen Abwehr eine Rolle spielen (Harder, 2000). Mittlerweile gibt es eine Datenbank in der zur Zeit insgesamt 2.172 antimikrobielle Peptide beschrieben werden (Stand

Februar 2013; Wang und Wang, 2004; Wang *et al.*, 2009). Synthetische AMPs werden als Derivate von natürlichen Peptiden hergestellt, mit dem Hintergrund stärkere Wirkungen zu erzielen (Hilpert *et al.*, 2005). Durch die SPOT Technik ist es möglich solche Peptide synthetisch herzustellen, indem einzelne Aminosäuren schrittweise auf eine Cellulosemembran aneinander gebunden werden (Frank, 1992; Hilpert *et al.*, 2007). Um die antimikrobielle Wirkung angehefteter AMPs auf *P. aeruginosa* zu untersuchen, wurden synthetisierte AMPs auf der Zellulosemembran belassen (Hilpert *et al.*, 2009). Der Stamm luminesziert durch eine eingebrachte Luciferase-Genkassette (*luxABCDE*) und ein Abnehmen der Lumineszenz wird als Indikator für das Absterben verwendet (Hilpert *et al.*, 2005). Zwei Peptide wurden für die folgenden Experimente ausgewählt, Tet009 (RRWKIVVIRWRR) und Tet026 (WIVVIWRRKRRR). Tet009 vermittelt $85 \pm 8 \%$ Lumineszenzverlust und Tet026 $98 \pm 1 \%$ Lumineszenzverlust bei *P. aeruginosa* (Hilpert *et al.*, 2009). Ausgehend von den Peptidsequenzen wurden für beide Leserichtungen Codon optimierte Oligonukleotide mit *EcoRI* und *NcoI* Restriktionsschnittstellen hergestellt. Um eine Doppelstrangbildung zu ermöglichen, wurden diese für eine auf Minute bei 95 °C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die nun doppelsträngigen DNA-Sequenzen können N-terminal an das H* Protein B kloniert werden (Abbildung 17).

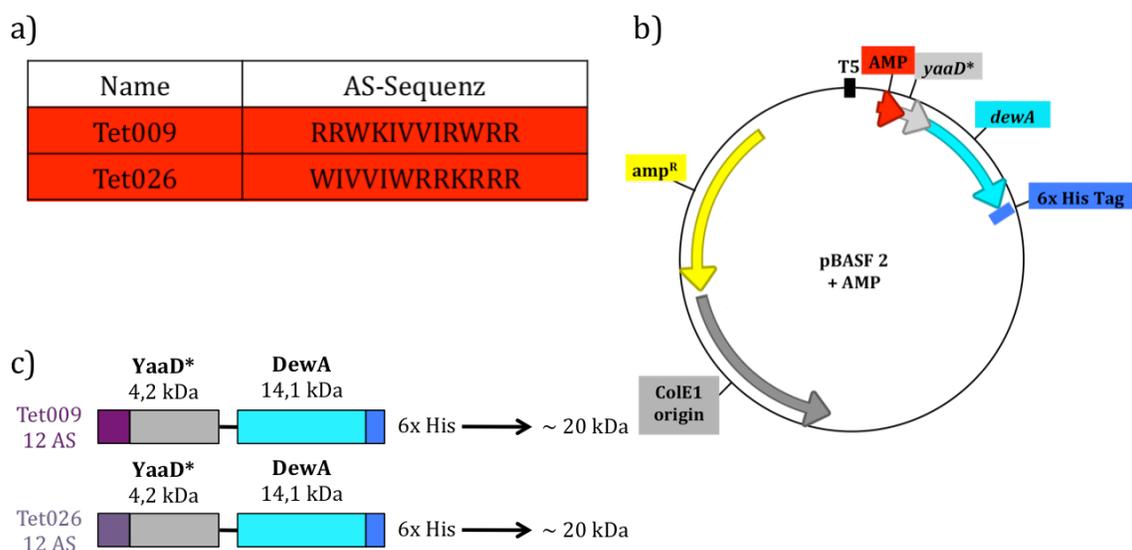


Abbildung 17: Schema zur N-terminalen Anheftung zweier AMPs an H* Protein B. a) Name und

Aminosäuresequenzen, der ausgewählten AMPs: Tet009 und Tet026 sind synthetische AMPs, die in der Lage sind *P. aeruginosa* im angehefteten Zustand abzutöten (Hilpert *et al.*, 2009). b) Schema des Expressionsvektors mit den an den N-Terminus des YaaD* angehefteten AMPs. c) Schema des antimikrobiellen Fusions-Hydrophobins, das eine Größe von etwa 20 kDa besitzt.

Die Herstellung eines korrekten Klons des Vektors mit den fusionierten AMPs war nicht möglich. Dies führte zu der Vermutung, dass eine geringe Expression des Fusionsproteins aus AMP und H* Protein B auch ohne Induktion stattfindet und somit bereits eine antimikrobielle Wirkung auf *E. coli* zeigt. Aus diesem Grund wurde der herkömmliche *E. coli* Stamm Top 10 durch den Stamm M15 ersetzt, welcher das Plasmid pREP4 trägt. Dieses Plasmid kodiert für einen Lac-Repressor und inhibiert infolgedessen den T5-Promotor vor der Sequenz des modifizierten Fusions-Hydrophobins. Bei der Induktion der Expression mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) wird wiederum der Lac-Repressor inhibiert und der T5-Promotor induziert. Mit Hilfe dieses Stammes konnten die Vektoren richtig kloniert werden. Es fand allerdings nach Induktion mit IPTG keine Überexpression des Fusions-Hydrophobins statt. Es konnten weder in SDS-Gelen noch in dazugehörigen *Western Blots* modifizierte Fusions-Hydrophobine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um eine mögliche antimikrobielle Wirkung der fusionierten AMPs auf den Expressionsstamm zu umgehen, sollte GFP als sogenannte „Schutzgruppe“ N-terminal an das modifizierte Fusions-Hydrophobin angeheftet werden. Um nach der Expression des gesamten Fusionsproteins die Schutzgruppe abzuspalten, wurde eine TEV- (*Tobacco Etch Virus*) Proteaseschnittstelle eingefügt. Dies geschah bereits bei der Amplifikation von GFP, indem dem *revers*-Oligonukleotid die entsprechende Sequenz (GAAAACCTGTATTTTCAGGGC = ENLYFQG) angehängt wurde. Zunächst wurde ein Vektor kreiert, der GFP N-terminal an H* Protein B gebunden hat, um später unterschiedliche AMPs einfügen zu können. AMPs lassen sich über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NcoI* klonieren, allerdings findet sich im GFP Gen eine ebensolche Schnittstelle. Diese wurde über eine *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* entfernt, indem eine Base aus der Schnittstelle ausgetauscht wird. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Aminosäuresequenz nicht ändert. Die

III Ergebnisse

neu konstruierten Vektoren wurden zur Proteinexpression mit *E. coli* M15 transformiert und die Kulturen bei einer OD_{600} von ungefähr 0,8 mit 0,5 mM IPTG induziert. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde zunächst ein *Dot Blot* mit dem Anti-His Antikörper (GE Healthcare, Chalfont St Giles) durchgeführt und eine Überexpression des Fusionsproteins festgestellt (Abbildung 18).

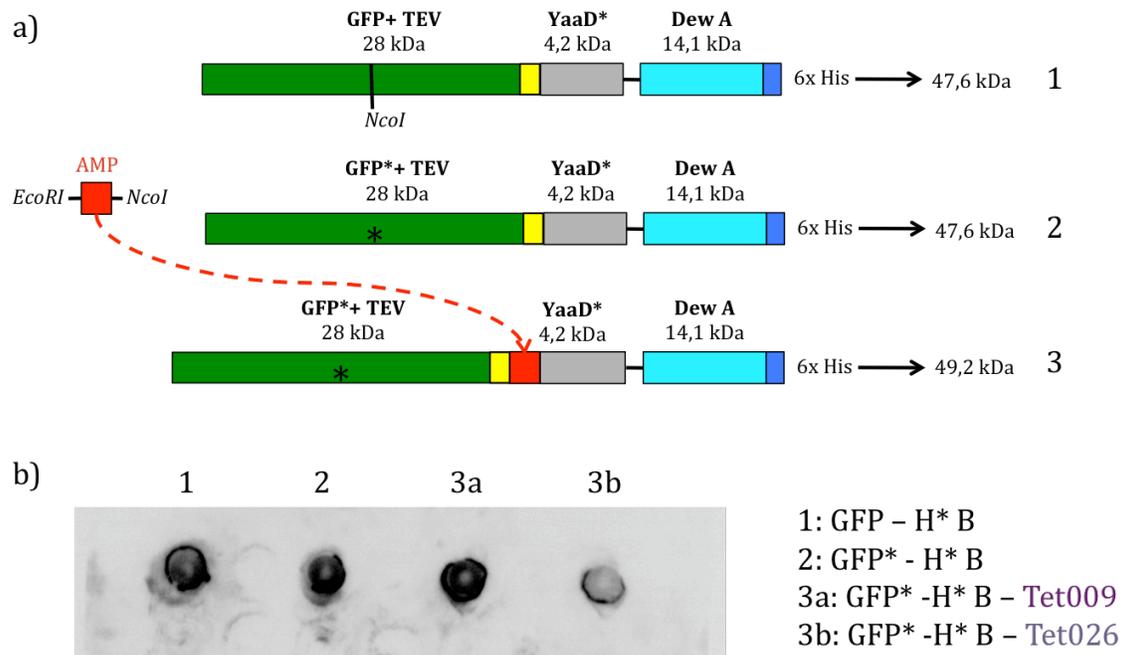


Abbildung 18: Modifikation von H* Protein B mit N-terminal fusioniertem GFP. a) Schema der H* Protein B Modifikation mit GFP. Da GFP ein *NcoI* Schnittstelle besitzt, über die auch die AMPs an H* Protein B kloniert werden müssen, wird diese durch die *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* entfernt. In Gelb markiert ist die TEV- (Tobacco Etch Virus) Proteaseschnittstelle, die es nach der Proteinexpression erlaubt, die GFP-Schutzgruppe abzuspalten. b) *Dot Blot* zur Kontrolle der Proteinexpression: Die neu konstruierten Expressionsvektoren wurden mit *E. coli* M15 transformiert, bei einer OD_{600} von ungefähr 0,8 mit 0,5 mM IPTG induziert und über Nacht inkubiert. Es wurden Proben genommen und auf eine Nitrocellulosemembran getropft. Der Nachweis der Expression wurde mit dem Anti-His Antikörper (Verdünnung 1:2000) durchgeführt. Dabei ist bei allen Konstrukten eine Expression erkennbar.

Mittels *Dot Blot* wurden alle GFP-Konstrukte nachgewiesen. Getestet wurden sowohl die Fusion von GFP mit H* Protein B, die Fusion von GFP* mit H* Protein B und die Konstrukte mit den eingefügten AMPs Tet009 und Tet026.

1.3. Bakterielle Expression funktionalisierter Hydrophobine

Nach dem erfolgreichen *Dot Blot* wurde die Proteinexpression in einem größeren Ansatz durchgeführt. Hierfür wurden von einer Übernackkultur 500 ml EC3-Medium angeimpft, bei einer OD_{600} von 0,8 mit 0,5 mM IPTG induziert und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Da sich die gewünschten Proteine in den Einschlusskörperchen befinden, wurde die Kultur pelletiert. Des Zellpellet wurde in der *French Press* aufgeschlossen. Durch mehrmaliges Waschen und Zentrifugieren wurden übrige Zelltrümmer von den Einschlusskörperchen getrennt, welche durch einen *pH-Shift* (von pH 12 auf pH 8-9) aufgeschlossen wurden. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt sollten sich die modifizierten Fusionshydrophobine im Überstand befinden. In *Western Blots* wurden der Überstand und das Pellet nach dem Zellaufschluss aufgetragen und sowohl mit Anti-His Antikörpern als auch Anti-GFP-Antikörpern (Sigma-Aldrich, Seelze) untersucht. Bei beiden Konstrukten sind Banden bei ungefähr 50 kDa zu erkennen (Abbildung 19).

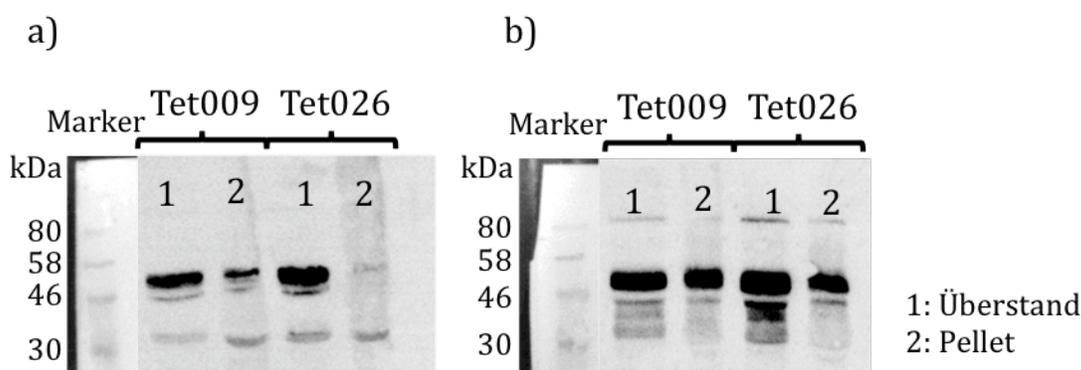


Abbildung 19: Western Blots mit Anti-His und Anti-GFP Antikörpern. Aufgetragen wurden nach dem Aufschluss der Einschlusskörperchen und Zentrifugation sowohl der Überstand als auch das Pellet. In beiden Fraktionen sind Banden erkennbar, was darauf hinweist, dass nicht alle Einschlusskörperchen zerstört wurden. a) Detektion mit Anti-His Antikörpern: Das modifizierte Fusionsprotein besitzt am C-Terminus des Hydrophobins DewA eine sechsfache His-Markierung. Auf einer Höhe von etwa 50 kDa, was der Größe des Proteins mit GFP-Schutzgruppe entspricht (siehe auch Abbildung 18), sind klare Banden erkennbar. b) Detektion mit Anti-GFP Antikörpern: Die Schutzgruppe selbst wird durch diesen Antikörper erkannt. Es zeigen sich klare Banden bei einer Höhe von etwa 50 kDa.

In einem weiteren Schritt wurde die GFP-Schutzgruppe mit Hilfe einer TEV Protease (EURx, Gdansk) abgespalten. Dies geschah über Nacht bei Raumtemperatur. In einem *Western Blot* mit einem Anti-His Antikörper sind nun klare Banden bei

ungefähr 25 kDa erkennbar. Schwache Banden sind auch bei der Ursprungsgröße von etwa 50 kDa sichtbar, was auf einen unvollständigen Verdau schließen lässt (Abbildung 20). Durch die erfolgreiche Expression kann anschließend die antibakterielle Wirkung der Fusionskonstrukte untersucht werden.

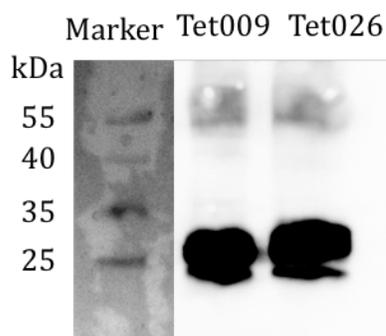


Abbildung 20: Western Blot nach TEV-Protease Verdau des Fusionskonstruktes. Die Abspaltung von GFP durch die TEV-Protease wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Kontrolle der Abspaltung erfolgt mittels *Western Blot* mit dem Anti-His Antikörper. Es sind Banden bei einer Höhe von etwa 25 kDa zu sehen. Bei ungefähr 50 kDa, der Größe eines unverdauten Proteins sind noch schwache Banden erkennbar.

1.4. Erste Tests auf antibakterielle Wirkung der funktionalisierten Hydrophobine

In einem ersten Ansatz wurden *Wells* einer Mikrotiterplatte mit den abgespaltenen antimikrobiellen Fusionshydrophobinen beschichtet. In jeweils zehn *Wells* werden 100 µl Proteinlösung pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine stabilere Beschichtung mit H* Protein B erfolgt zwar nach 16 Stunden bei 80 °C (Rieder *et al.*, 2011), allerdings können Mikrotiterplatten dieser Temperatur nicht standhalten. Die Beschichtung wurde mit dem Anti-His Antikörpern verifiziert (Abbildung 21).

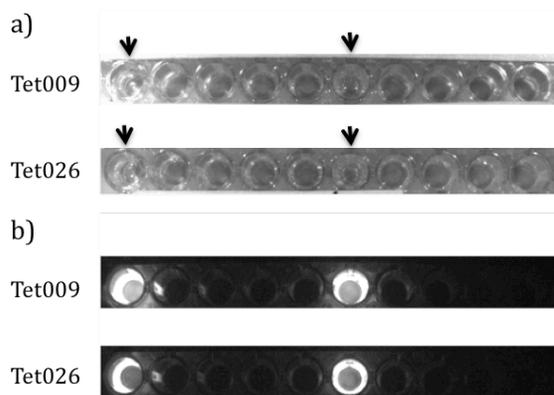


Abbildung 21: Beschichtung von Wells einer Mikrotiterplatte. Nach erfolgreichem TEV-Verdau wurden jeweils 10 *Wells* mit modifizierten Fusionshydrophobinen beschichtet. a) Das Bild zeigt die Wells einer Mikrotiterplatte, die beschichtet wurden. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind diejenigen Wells, deren Beschichtung mit Anti-His Antikörpern nachgewiesen wurden. b) Nachweis der Beschichtung nach dem *Western Blot* Protokoll.

Die Wirkung der AMPs wurde auf *P. aeruginosa* getestet (Hilpert *et al.*, 2009). Zum besseren Vergleich wurde zunächst die antibakterielle Wirkung auf *P. putida* untersucht. Es wurde eine Übernachtskultur angezogen und jeweils 200 µl der Kultur ($OD_{600} = 0,2$) pro *Well* pipettiert. Es wurden auch *Wells* ohne Beschichtung mit der *P. putida*-Kultur versehen. Nach einer Inkubation bei 28 °C über Nacht, wurde die Kultur abgenommen und die *Wells* wurden zweimal mit Zellwaschpuffer gewaschen um lose adhärenzte Zellen zu lösen. Danach wurde jedes *Well* mit einer 5-fachen Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert (Abbildung 22). Zum Vergleich wurde auch ein *Well* ohne Hydrophobinbeschichtung und Biofilm analysiert (Abbildung 22 a). Eine erste qualitativ optische Auswertung ergab, dass der Biofilm in dem unbeschichteten *Well* deutlicher ausgeprägt ist, als die mit den antimikrobiellen Fusionshydrophobin beschichteten *Wells* (Abbildung 22 c und d).

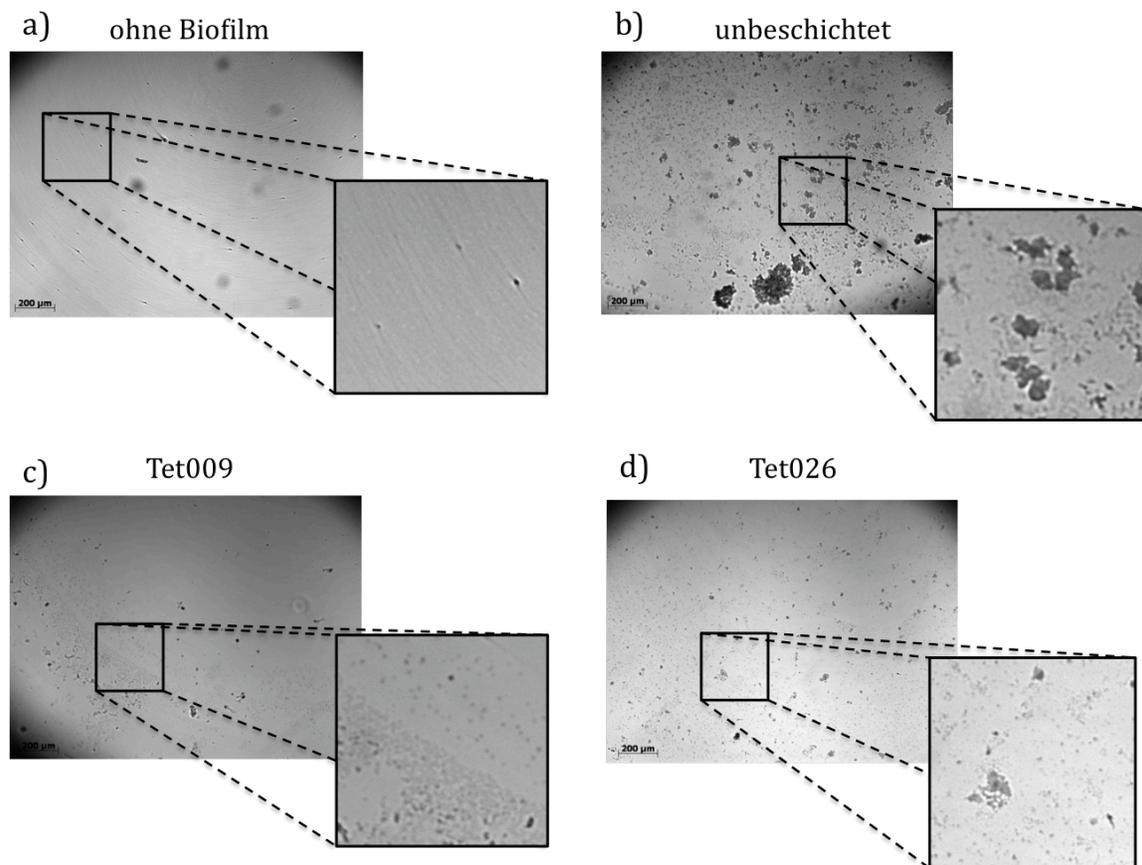


Abbildung 22: Untersuchung der Biofilmbildung von *P. putida*. In die *Wells* einer Mikrotiterplatte wurden 200 µl einer *P. putida* Kultur ($OD_{600} = 0,2$) gegeben und über Nacht bei 28 °C inkubiert. a) Zur Kontrolle wurde ein unbeschichtetes *Well* ohne Biofilm fotografiert. b) Dieses Bild zeigt einen Biofilm

auf unbeschichteter Oberfläche. Es sind größere Zellanhäufungen erkennbar. Bei den Oberflächen mit Beschichtung (c und d) sind deutlich weniger Zellen erkennbar.

1.5. Hydrophobin-Funktionalisierung mit weiteren AMPs

Da für die Fusionskonstrukte mit Tet009 und Tet026 eine antimikrobielle Wirkung gezeigt werden konnte, wurden weitere AMPs zur Funktionalisierung eingesetzt. Dies geschah um die antibakteriellen Aktivitäten vergleichen zu können. Ausgewählt wurden zwei weitere AMPs, die im angehefteten Zustand aktiv gegen *P. aeruginosa* sind (Hilpert *et al.*, 2009). Dabei handelt es sich um Tet008 (RRWRIVVIRVRR) und Tet125 (KRWWKWIRW), die $79 \pm 7,2 \%$ bzw $91 \pm 7 \%$ Lumineszenzverlust bei *P. aeruginosa* verursachen (Hilpert *et al.*, 2009). Beide AMPs wurden zwischen die GFP-Schutzgruppe und die Synthase YaaD* kloniert (Abbildung 23).

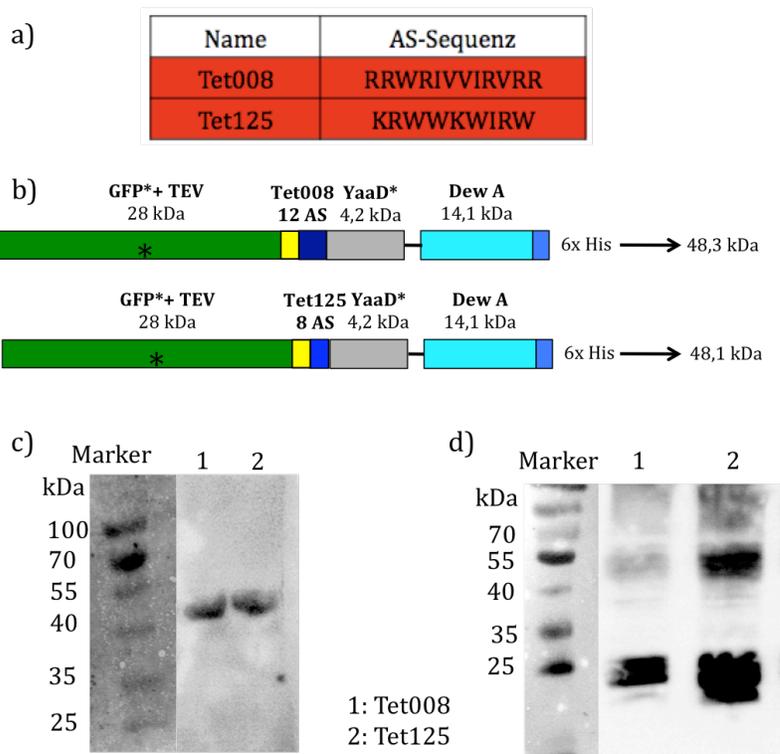


Abbildung 23: Expression zweier weiterer Hydrophobinkonstrukte. a) Die AMPs Tet008 und Tet125 sind ebenfalls im angehefteten Zustand aktiv (Hilpert *et al.*, 2009). b) Tet008 und Tet125 wurden zwischen die GFP-Schutzgruppe und die Synthase YaaD* kloniert. c) Nach der Überexpression der beiden Konstrukte sind im *Western Blot* mit Anti-His Antikörpern bei einer Höhe von ungefähr 48 kDa Banden erkennbar. d) Nach einem TEV-Verdau über Nacht bei Raumtemperatur, sind Banden bei ungefähr 25 kDa zu sehen. Der Verdau war nicht vollständig, da im oberen Bereich bei ungefähr 48 kDa noch Banden sichtbar sind.

Die fertigen Expressionsvektoren wurden mit *E. coli* M15 transformiert und die Proteinexpression mit IPTG induziert. Die Aufreinigung erfolgte aus den Einschlusskörperchen (siehe Kapitel III 1.3.). Nach erfolgreicher Proteinexpression wurde die Schutzgruppe über die TEV-Protease abgespalten. Durch *Western Blot* Analyse mittels Anti-His Antikörper konnte sowohl das Ursprungs-konstrukt von ungefähr 50 kDa (Abbildung 23 c) als auch das durch die TEV-Protease restringierte Konstrukt (25 kDa) nachgewiesen werden (Abbildung 23 d).

1.6. Wirkung auf pathogene Bakterien in Biofilmen

In einem weiteren Schritt wurde die antimikrobielle Wirkung der modifizierten Fusions-Hydrophobine auf pathogene Biofilme (*P. aeruginosa* und *S. aureus*) untersucht und verglichen. Dazu wurden spezielle Maskenobjektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) genutzt (Abbildung 24 a), die im Vergleich zu den Mikrotiterplatten Temperaturen von 80 °C standhalten. Die Beschichtung erfolgte mit 50 µl Beschichtungslösung für zwei Stunden bei 80 °C. Nach der Beschichtung wurden die Objektträger dreimal mit ddH₂O gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet (Rieder *et al.*, 2011). Die Beschichtung eines Objektträgers wurde mittels Anti-His Antikörper getestet (Abbildung 24 b).

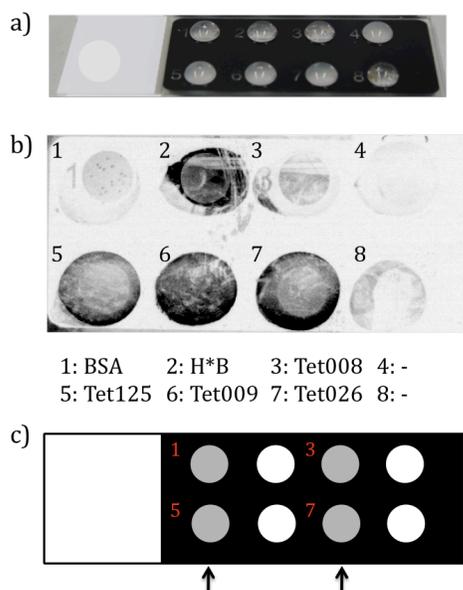


Abbildung 24: Beschichtung von Maskenobjektträgern. a) Dargestellt ist das Foto eines Maskenobjektträgers. Jeweils 50 µl einer Beschichtungslösung sind aufgetragen und liegen tropfenförmig auf. b) Die Beschichtung erfolgte über zwei Stunden bei 80°C und wurde mit Anti-His Antikörpern verifiziert. Zu erkennen ist, dass die Beschichtung mit Tet008 nicht so gut ausgeprägt ist, wie bei den anderen Hydrophobinkonstrukten. c) Zum Einsetzen in die Biofilmreaktoren wurden die Maskenobjektträger mit jeweils zwei Beschichtungslösungen versehen (graue Kammern: BSA (1 und 5) und H* Protein B (3 und 7); Tet009 und Tet026; Tet008 und Tet125).

Für die Versuche im Biofilm-Fermenter wurden Objektträger nach dem Schema in Abbildung 24 c beschichtet. Hierbei wurden BSA und H* Protein B auf einen Objektträger, Tet009 und Tet026 auf den nächsten und Tet008 und Tet125 auf einen dritten Objektträger gegeben. Jedes Konstrukt wurde in doppelter Ausführung auf den Objektträger aufgebracht (graue Kammern, Abbildung 24 c).

Die Biofilmversuche wurden im Labor der AG Overhage (IFG, KIT Campus Nord) durchgeführt. Zur Biofilmbildung wurde von beiden Stämmen eine Übernachtskultur herangezogen und ein Biofilm-Fermenter (Abbildung 40, Material und Methoden 3.1.4.) mit einer OD_{600} von 0,02 angeimpft. Objektträgerhalterungen mit beschichteten und unbeschichteten Objektträgern wurden in die Kultur gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Nachweis des Biofilms auf den Oberflächen wurde eine *Live/Dead* Färbung (Invitrogen) durchgeführt. Es wurden der DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Syto9 und Propidiumiodid, welches DNA toter Zellen markiert, verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Zellwaschpuffer gewaschen um lose adhärierte Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung mit beiden Farbstoffen direkt auf die Oberflächen gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde vorsichtig mit Zellwaschpuffer abgespült und die Oberflächen im Dunkeln trocknen gelassen. Die Proben konnten trocken mit einer zehn - bis 20 - fachen Vergrößerung mikroskopiert werden. *P. aeruginosa* Biofilme wurden mit allen vier modifizierten Fusionshydrophobinen untersucht (Abbildung 25). Zur Auswertung wurden jeweils fünf Quadrate von zwei Mikroskopaufnahmen ausgezählt und auf die ganze Bildfläche hochgerechnet. Dabei wurde zwischen lebenden (grün) und toten Zellen (rot) differenziert. Die Verteilung der Zellen auf den unbeschichteten, mit BSA und H* Protein B beschichteten Oberflächen ist gleich. Auch die Oberflächen mit den an die Fusionshydrophobine gekoppelten AMPs Tet008 und Tet125 zeigen kaum einen Unterschied auf die Gesamtzellzahl. Es ist allerdings im Schnitt eine um zweimal höhere Anzahl toter Zellen zu verzeichnen. Die Oberflächen mit dem Tet009 gekoppelt an das Fusionshydrophobin zeigen den größten Unterschied. Die Gesamtzellzahl liegt 3,5-fach niedriger als bei den Kontrollproben (unbeschichtet,

BSA-Beschichtung, H* Protein B-Beschichtung), dabei ist auch der Hauptteil der Zellen tot (rot). Die Anzahl der lebenden Zellen ist etwa 200-fach niedriger als bei den Kontrollproben. Die Oberflächen mit Tet026 beschichtet zeigen eine um 1,7-fach höhere Gesamtzellzahl im Vergleich zu den Kontrollen an, allerdings sind die meisten Zellen tot (rot).

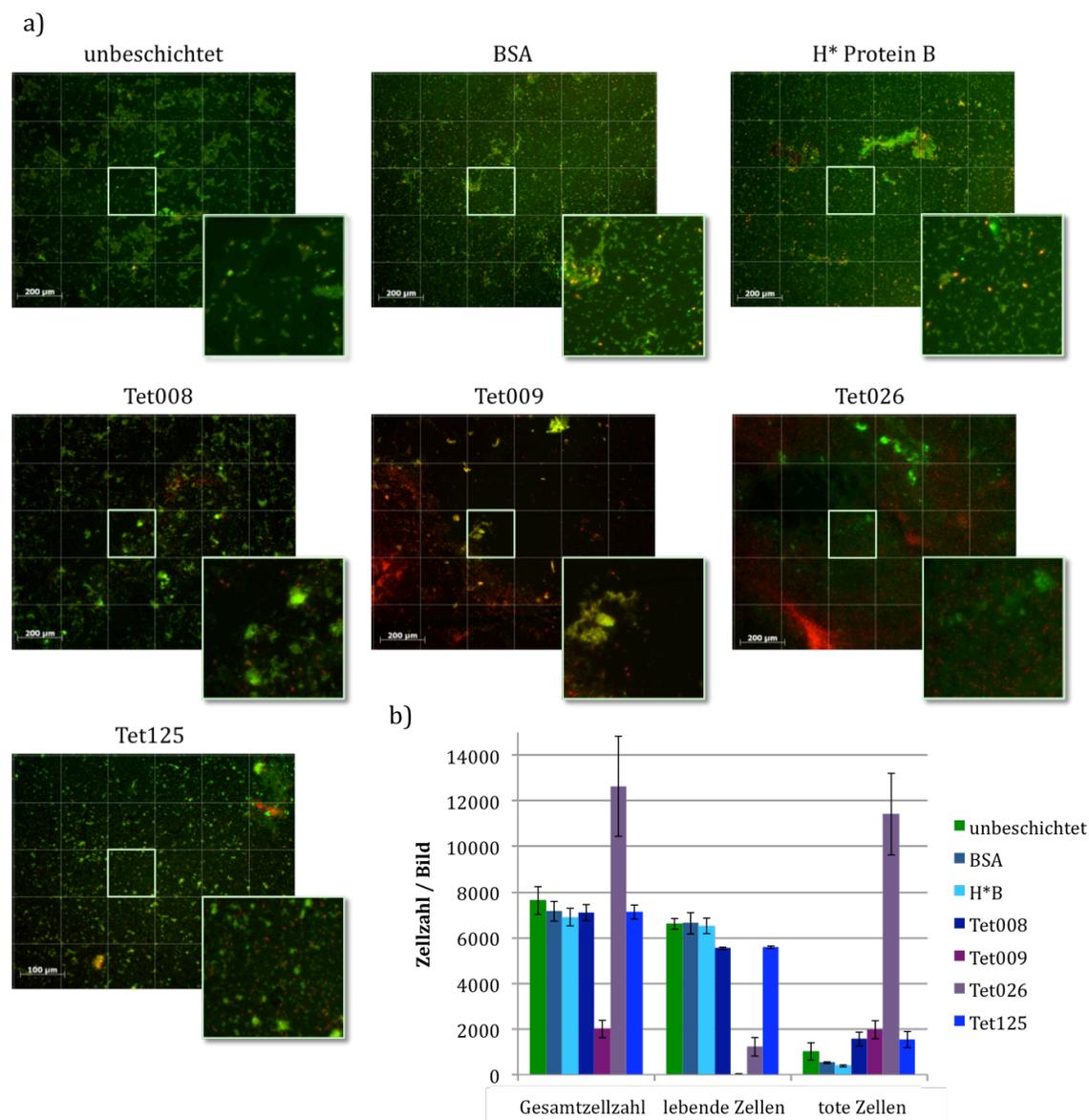


Abbildung 25: Biofilmbildung von *P. aeruginosa*. Die beschichteten Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit *P. aeruginosa* inkubiert und die entstandenen Biofilme verglichen. a) Beispielhafte Mikroskopbilder (10-fache Vergrößerung) der unterschiedlichen Oberflächen mit *P. aeruginosa* Biofilmen: Die Biofilme auf der unbeschichteten Probe wie auf denen mit BSA und H* Protein B beschichteten, zeigen eine ähnliche Verteilung. Oberflächen, die mit Tet008 und Tet125 beschichtet wurden, zeigen mehr rote Zellen (= tot). Allerdings ist die Verteilung ansonsten mit den

III Ergebnisse

Kontrollproben vergleichbar. Eine Beschichtung mit Tet009 gekoppelt an das Fusionshydrophobin führt zu geringerer Zellanhaftung, wobei die meisten Zellen tot (rot) sind. Auf Beschichtungen mit Tet026 konnte eine höhere Zellzahl ausgezählt werden, wovon der Großteil tot (rot) ist. b) Es wurden jeweils fünf Quadrate zweier Bilder ausgezählt und die Zellzahl wurde auf ein Bild hochgerechnet. Der linke Block zeigt die Gesamtzellzahl, der Mittlere die lebenden Zellen (grün fluoreszierend) und der rechte Block die toten Zellen (rot fluoreszierend).

Biofilme von *S. aureus* wurden nur mit den Fusionshydrophobinen mit den angekoppelten AMPs Tet009 und Tet026 untersucht. Dabei wurde ausschließlich die Lebendzellzahl ausgewertet, da kaum tote Zellen zählbar waren. Die Biofilme von *S. aureus* sind nicht so gut ausgeprägt wie die *P. aeruginosa*-Biofilme. Die Oberflächen mit den antimikrobiellen Fusionshydrophobinen zeigen eine um drei- bis vierfach verringerte Verteilung von lebenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollflächen (unbeschichtet, BSA-Beschichtung, H* Protein B-Beschichtung) (Abbildung 26).

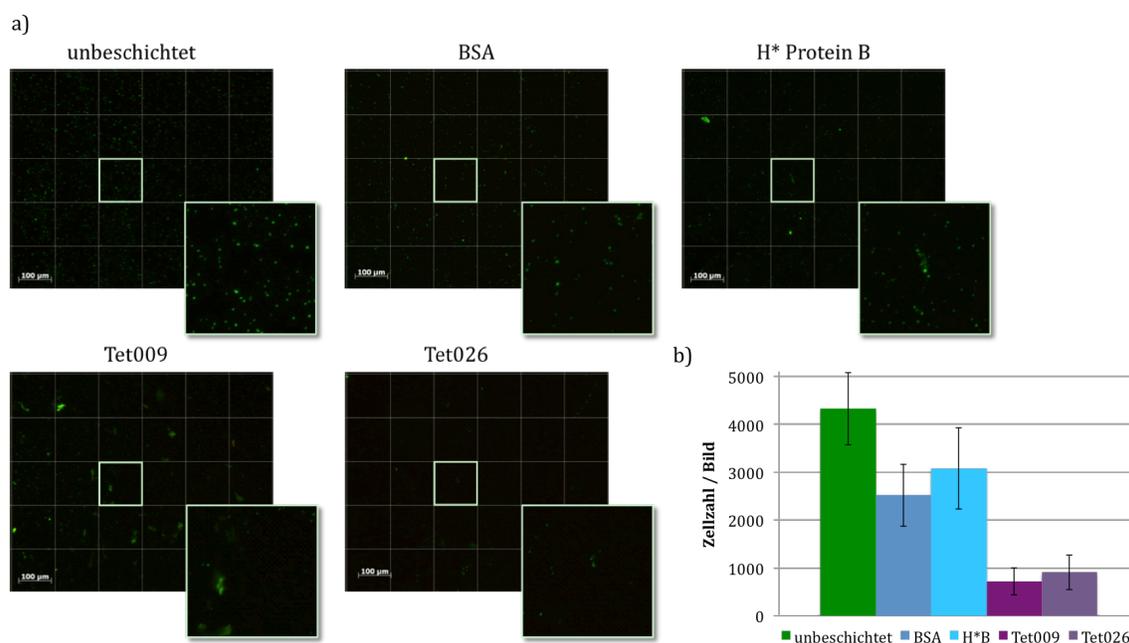


Abbildung 26: Biofilmbildung von *S. aureus*. Die beschichteten Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit *S. aureus* inkubiert und die entstandenen Biofilme verglichen. a) Beispielhafte Mikroskopiebilder (10-fache Vergrößerung) der unterschiedlichen Oberflächen mit *A. aureus* Biofilmen: Die Biofilme auf der unbeschichteten Probe zeigen die höchste Dichte. Die BSA und H* Protein B Beschichtungen zeigen eine ähnliche Verteilung. Beschichtete Oberflächen mit Tet009 und Tet026 haben eine geringere Zelldichte. b) Ausgezählt wurden lebende Zellen auf jeweils fünf Quadraten zweier Bilder. Die Zellzahl wurde auf ein Bild hochgerechnet. Oberflächen mit den an die Fusionshydrophobine angekoppelten AMPs zeigen eine um drei- bis vierfach geringere Zellzahl.

Kapitel 2

Untersuchung der Wirkung antimikrobieller Peptide auf *A. nidulans*

AMPs haben ein breites Wirkspektrum, das sich über Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze erstreckt (Hancock, 2006; Jenssen *et al.*, 2006). Biofilme bestehen in den meisten Fällen in ihrer Zusammensetzung aus einer Mischung verschiedener Mikroorganismen, also auch Pilzen. Die Wirkungsweise antimikrobieller Peptide auf Bakterien ist untersucht. So ist die Zellhülle das Ziel des AMP-Angriffs, wobei Zweikomponentensysteme induziert werden (Pietiäinen *et al.*, 2005; Staron *et al.*, 2010). Zweikomponentensysteme (TCS = *two-component systems*) bestehen aus einer Histidin-Kinase und einem Response-Regulator. Bei diesen Systemen basiert die Signalübertragung zwischen den beiden Komponenten auf Phosphorylierungen. Dabei stellt eine Histidin-Kinase den Sensor dar. Sie besteht aus zwei Domänen, einer stark variierenden, stimulusspezifischen Sensor-Domäne und einer hochkonservierten Kinase-Domäne. Bei der Erkennung eines Signals kommt es zu einer Konformationsänderung der Kinase, die in einer Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes mündet. Die zweite Komponente, der Response-Regulator, wird nun phosphoryliert. Er besitzt neben der regulatorischen Domäne eine Effektor-Domäne, welche die zelluläre Reaktion vermittelt. Die Phosphatgruppe wird vom Histidinrest der Histidin-Kinase auf einen Aspartatrest innerhalb der regulatorischen Domäne des Response-Regulators übertragen. Die Effektor-Domäne des Response-Regulators ist im Normalfall eine DNA-Binde-Domäne somit kann man die Response-Regulatoren als Transkriptionsfaktoren bezeichnen. Der Response-Regulator kann entweder als Aktivator oder Repressor die Expression der Zielgene regulieren. Die Inaktivierung des Response-Regulators erfolgt durch Dephosphorylierung, welche vom Response-Regulator selbst, durch die zugehörige Histidin-Kinase oder einer externen Aspartat-Phosphatase katalysiert wird.

Zweikomponentensysteme sind auch in Pilzen zu finden, wobei diese zusätzlich über ein Histidin-enhaltenes Phosphotransferprotein (HPt factor) verfügen. *A. nidulans* besitzt 15 Histidin-Kinasen (HKs), vier Response-Regulatoren und ein Phosphotransferprotein (HPt) (Abbildung 27).

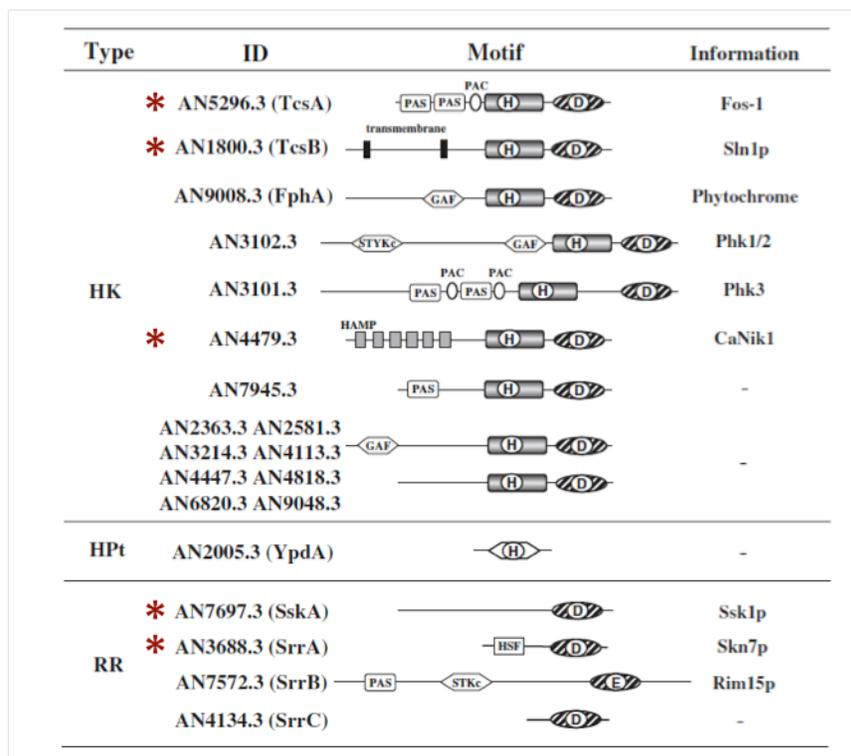


Abbildung 27: Schema der Elemente der *A. nidulans* Zweikomponentensysteme *A. nidulans* besitzt 15 Histidin-Kinasen, vier Response-Regulatoren und ein Phosphotransferprotein (HPt). Die in dieser Arbeit näher betrachteten Histidin-Kinasen AN5296 (TcsA), AN1800 (TcsB) und AN4479 (NikA) und die untersuchten Response-Regulatoren AN7697 (SskA) und AN3688 (SrrA) sind mit roten Sternen gekennzeichnet (verändert nach (Hagiwara *et al.*, 2007a)).

2.1. Deletionen von Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren

Um die Auswirkung der AMPs auf die Zweikomponentensysteme von *A. nidulans* zu untersuchen, erhielten wir vom *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC; Kansas City, Missouri, USA; www.fgsc.net) zu 14 der HKs die jeweiligen Deletionsstämme (Abbildung 28).

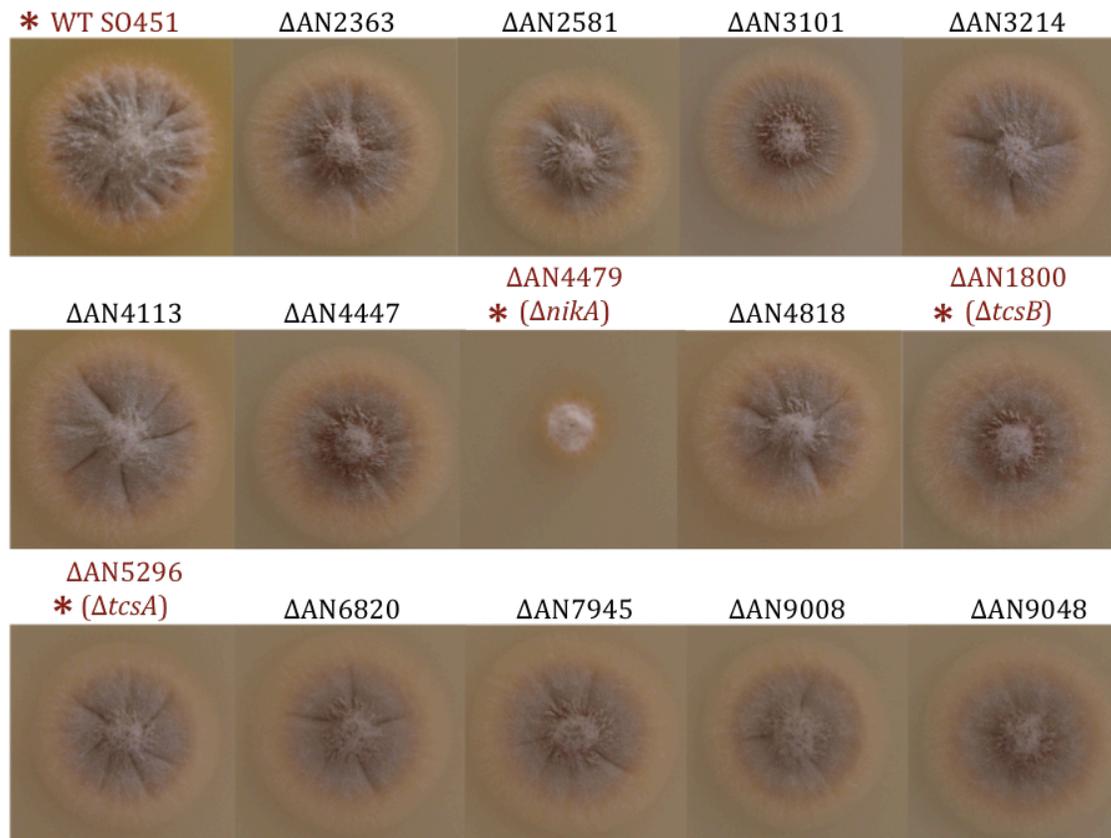


Abbildung 28: Wachstum der Histidin-Kinase-Deletionsstäme auf Minimalmedium mit den jeweilig benötigten Zusätzen. Der Wildtypstamm und die später genauer betrachteten Deletionsstäme sind rot markiert und mit einem roten Stern versehen. Der *A. nidulans* Wildtypstamm S0451 generiert weiße Sporen. Die jeweiligen Zielgene wurden durch homologe Rekombination mit dem Auxotrophiemarker *PyrG^{Af}* ersetzt (FGSC; Kansas City, Missouri, USA). Der Stamm *ΔnikA* zeigt ein stark vermindertes Wachstum, generiert aber immer noch Sporen. Die übrigen Deletionsstäme zeigen keinen Phänotyp.

Der Ausgangsstamm aller Deletionsstäme ist der Stamm *A. nidulans* S0451, welcher weiße Sporen und unter anderem eine *pyrG* Auxotrophie besitzt. Die jeweiligen Zielgene wurden mittels homologer Rekombination durch den Auxotrophiemarker *pyrG^{Af}* (Oakley *et al.*, 1987) ersetzt. Der Marker kodiert für die Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase und dient der Pyrimidinbiosynthese. Somit sind die Deletionsstäme nicht mehr auf die Zugabe von Uracil und Uridin in das Wachstumsmedium angewiesen.

Für die Deletionen der Response-Regulatoren erhielten wir vom *FGSC* Deletionskassetten mit etwa 1kb genspezifische flankierende Sequenzen, die das Zielgen gegen den Auxotrophiemarker *pyrG^{Af}* (Oakley *et al.*, 1987) durch homologe

Rekombination austauschen. Die Deletionskassetten wurden zunächst mit Hilfe der mitgelieferten Oligonukleotide amplifiziert und mittels Protoplastentransformation in den *A. nidulans* Stamm S0451 integriert. Durch die Integration der Deletionskassette verlieren positive Transformanten die *pyrG* Auxotrophie und benötigen im Gegensatz zum Ausgangsstamm S0451 keine Zugabe von Uracil und Uridin ins Medium. Um die generierten Deletionsstämme zu verifizieren wurde sowohl vom Wildtypstamm S0451 als auch von den jeweiligen Transformanten genomische DNA gewonnen und eine PCR zur Kontrolle durchgeführt. Es wurden Oligonukleotide gewählt, die im *pyrG* und in der stromabwärts gelegenen Region binden. Somit konnten die Stämme selektioniert werden, die das *pyrG* vermeintlich an der richtigen Stelle des Genoms integriert haben. Als weitere Kontrolle einer gelungenen Integration wurden *Southern Blots* durchgeführt.

2.1.2 Funktionsanalyse des Response - Regulators SrrA

Um die erfolgreiche Integration der *pyrG^Δ* Deletionskassette an Stelle des *srrA*-Gens nachzuweisen, wurde eine spezifische Sonde gewählt. Diese Sonde unterscheidet zwischen dem Ausgangsstamm und den daraus entstandenen Deletionsstämmen, indem sie sich in der stromaufwärts gelegenen linken Flanke (*left border* = LB) befindet und nach der Restriktion der genomischen DNA mit den Enzymen *XhoI* und *XbaI* an die Zielsequenz bindet. Die Bande des Ausgangsstammes S0451 um das Gen *srrA* hat eine Größe um 4,7 kb. Die Bande der vermeintlich richtigen Deletionsstämme ca. 1,7 kb.

Die genomische DNA wurde über Nacht mit *XhoI* und *XbaI* geschnitten, am folgenden Tag in einem 1 %iges Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Die Sonde wurde mittels PCR amplifiziert und mit DIG-markierten Basen markiert. Die homologe Integration konnte anschließend mittels *Southern Blot* bestätigt werden. Der entstandene Deletionsstamm zeigt ein verlangsamtes Wachstum, eine rötliche Färbung und weiße Sporen (Abbildung 29).

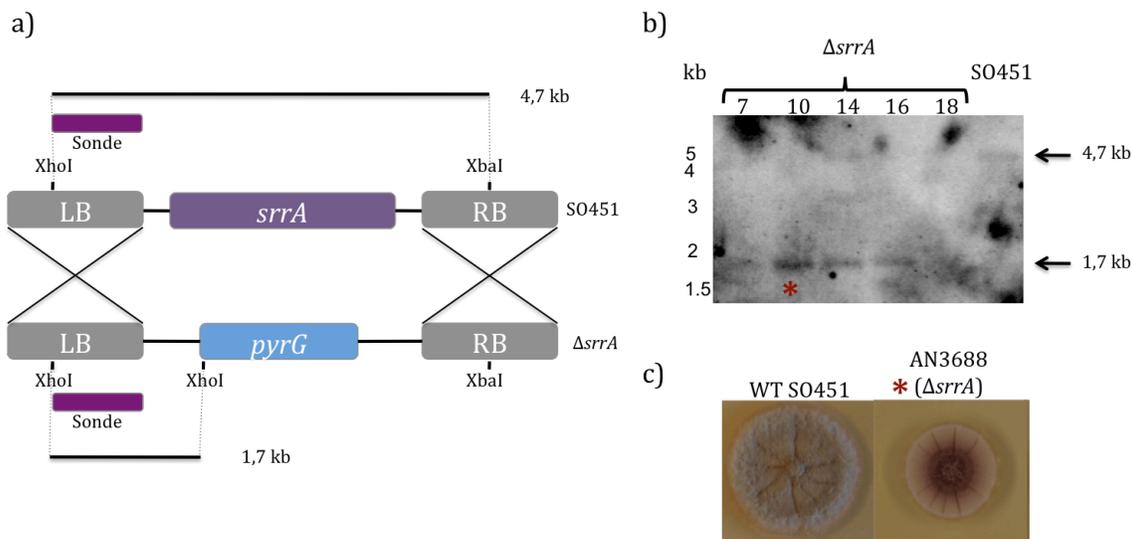


Abbildung 29: Southern Blot zur Verifizierung des $\Delta srrA$ Deletionsstammes. a) Schema der homologen Rekombination der *pyrG^{Af}* Kasette zum Ersetzen des *srrA* Gens. Angedeutet ist die Sonde, die sich im *left border* (LB)- Bereich des Konstrukts befindet. Ebenfalls markiert sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI* und *XbaI* und die daraus resultierende Größe der zu erwartenden Banden, die bei S0451 bei 4,7 kb und bei der Deletionsmutante bei 1,7 kb liegt. b) *Southern Blot*: Anhand der gewählten Sonde konnte nachgewiesen werden, dass die Deletionsstämme $\Delta srrA$ 10 und $\Delta srrA$ 16 eine einzige Bande auf der Höhe von 1,7 kb aufweisen. Die Stämme $\Delta srrA$ 7 und $\Delta srrA$ 18 zeigen keine Bande und Stamm $\Delta srrA$ 14 zeigt neben der 1,7 kb-Bande zusätzlich Banden auf ungefähr 3 kb und 4,7 kb. Beim Wildtypstamm S0451 ist eine Bande bei 4,7 kb erkennbar. c) Vergleich des Wildtyps mit der Deletionsmutante $\Delta srrA$ 10, die im Folgenden nur noch als $\Delta srrA$ bezeichnet wird. Die Deletionsmutante zeigt ein etwas vermindertes Wachstum.

2.1.2 Funktionsanalyse des Response - Regulators SskA

Um die erfolgreiche Integration der *pyrG^{Af}*-Deletionskassette an Stelle des *sskA*-Gens nachzuweisen, wurde ebenfalls eine Sonde gewählt, die sich in der stromaufwärts gelegenen *left border* (LB) befindet und nach der Restriktion der genomischen DNA mit den Enzymen *EcoNI* und *XhoI* an die Zielsequenz bindet. Die Bande des Ausgangsstammes S0451 um das Gen *sskA* hat eine Größe um 3,5 kb und die Bande der vermeintlich richtigen Deletionsstämme von ca. 2,2 kb.

Die genomische DNA wurde über Nacht mit *EcoNI* und *XhoI* geschnitten, am folgenden Tag in einem 1 %iges Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Die Sonde wurde mittels PCR amplifiziert und mit DIG-markierten Basen markiert. Die homologe Integration konnte mittels *Southern Blot* bestätigt werden. Die Deletionsmutante zeigt keinen Wachstumsunterschied zum Wildtyp S0451 (Abbildung 30).

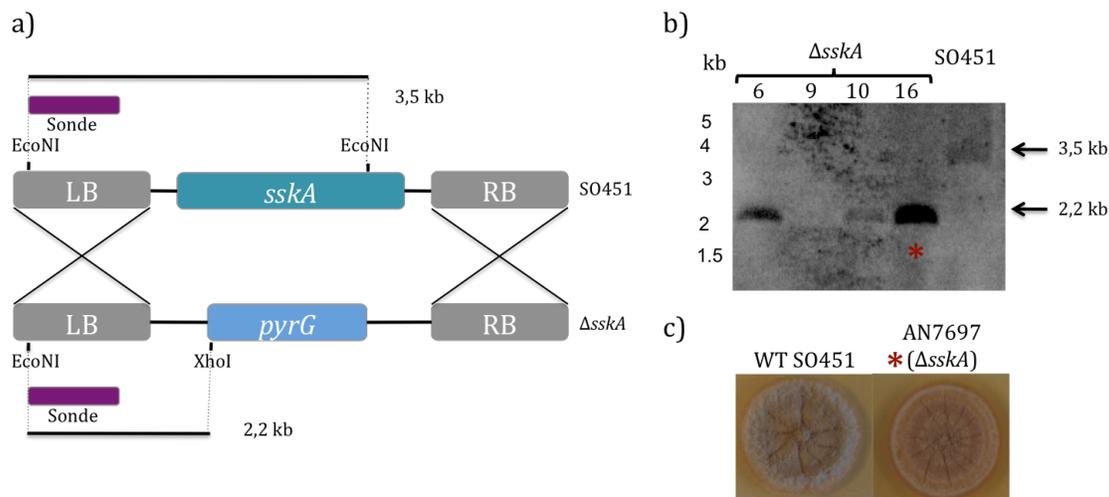


Abbildung 30: Southern Blot zur Verifizierung des $\Delta sskA$ Deletionsstammes. a) Schema der homologen Rekombination der *pyrG*^{Af} Kasette zum Ersetzen des *sskA* Gens. Angedeutet ist die Sonde, die sich im left border (LB) - Bereich des Konstrukts befindet. Ebenfalls markiert sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Eco*NI und *Xho*I und die daraus resultierende Größe der zu erwartenden Banden, die bei SO451 bei 3,5 kb und bei der Deletionsmutante bei 2,2 kb liegt. b) Southern Blot: Anhand der gewählten Sonde konnte nachgewiesen werden, dass die Deletionsstämme $\Delta sskA$ 6, $\Delta sskA$ 10 und $\Delta sskA$ 16 eine einzige Bande auf der Höhe von 2,2 kb aufweisen. Der Stamm $\Delta sskA$ 9 zeigt keine Bande. Beim Wildtypstamm SO451 ist eine Bande bei 3,5 kb auszumachen. c) Vergleich des Wildtyps mit der Deletionsmutante $\Delta sskA$ 16, die im Folgenden nur noch als $\Delta sskA$ bezeichnet wird. Die Deletionsmutante zeigt keinen Unterschied zum Wildtypstamm SO451.

2.2. Microtiter Screening Assays zur Bestimmung der antimykotischen Aktivität von Amphotericin B und dem AMP F1

Zur Beobachtung von Wachstumseinschränkungen im Zusammenhang mit AMPs wurde der Wildtyp SO451 und alle vorhandenen Deletionsstämme mit dem Redoxfarbstoff Resazurin getestet. Der blaue Farbstoff wird durch metabolisch aktive Zellen irreversibel zu rosafarbenem fluoreszierendem Resorufin reduziert und dient somit als Indikator für Zellviabilität.

2.2.1. Vortest zur antimykotischen Aktivität von Amphotericin B

Zur Voruntersuchung wurden die Stämme mit dem Antimycotikum Amphotericin B getestet. Amphotericin B wirkt sich auf das Ergosterol in der pilzlichen Zellmembran und formt Poren, was durch erhöhte Membranpermeabilität von K⁺ und somit zum Absterben führt (Brajtburg *et al.*, 1990; Finkelstein und Holz, 1973). AMPs verursachen Poren in der Zellhülle von Bakterien, daher ist davon

auszugehen, dass dies in Pilzen ebenfalls der Fall ist. Diese Vortests waren nötig um die knappen Reserven der vorhandenen antimikrobiellen Peptide zu schonen.

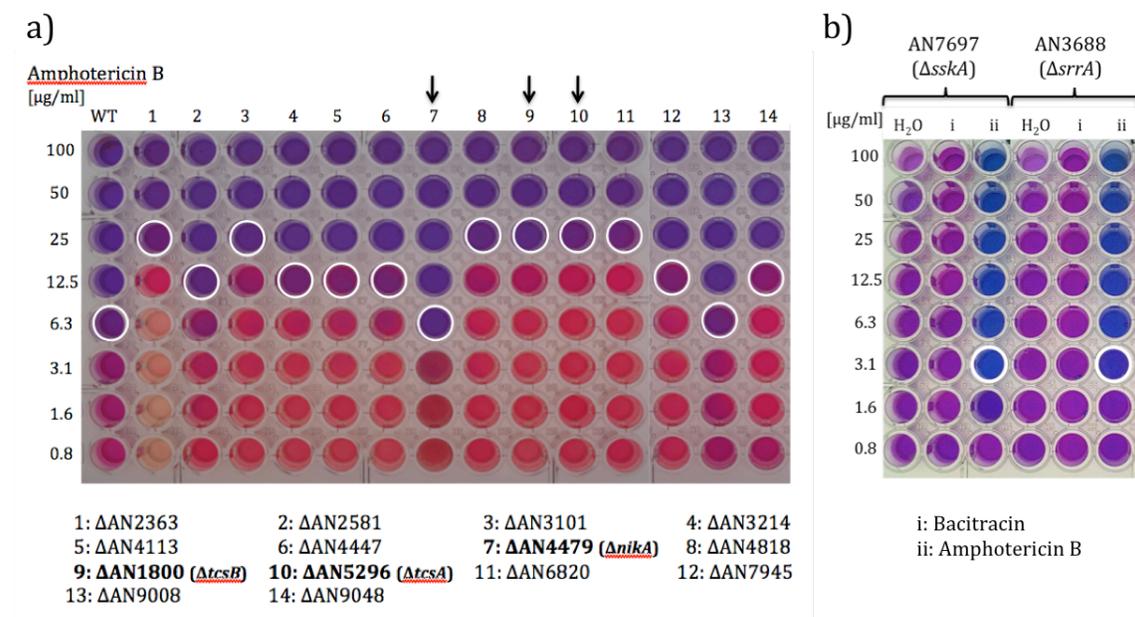


Abbildung 31: Microtiterscreening Assays mit Amphotericin B. Sowohl der Wildtyp *A. nidulans* SO451 als auch alle 14 Histidin-Kinase- und beide Response-Regulator - Deletionsstämme wurden auf ihre Sensitivität gegenüber dem Antimycotikum Amphotericin B untersucht. In jede Mulde wurde die gleiche Sporenanzahl (10^3 Sporen/ 200µl Medium) pipettiert. Der blaue Indikatorfarbstoff Resazurin wird durch Zellatmung zum pinkfarbenen Resorufin reduziert. Bleibt eine Mulde blau, ist keine lebende Zelle vorzufinden. Die Konzentrationen an Amphotericin B, bei denen kein Wachstum mehr stattfindet, sind mit weißen Umrandungen gekennzeichnet. a) Ab einer Konzentration von 6,3 µg/ml kommt es beim Wildtyp, der Δ *nikA*-Mutante und der Δ AN9008-Mutante zu keinem Wachstum mehr. Man findet bei den weiteren Histidin-Kinase Deletionsmutanten geringere Sensitivitäten gegenüber Amphotericin B. b) Im Vergleich zum Wildtyp zeigen beide Response-Regulator Deletionen höhere Sensitivität (1,6 µg/ml) gegenüber Amphotericin B. Zusätzlich wurde die Sensitivität gegenüber Bacitracin getestet, welches in Gram-positiven Bakterien die Zellwandsynthese hemmt und somit zum Zelltod führt. Hier zeigt sich keine Beeinträchtigung des Wachstums. Sowohl der Wildtyp als auch alle Histidin-Kinase Deletionen wurden ebenfalls mit Bacitracin getestet. In keinem der Stämme kam es zur Wachstumsbeeinträchtigung.

Es wurden verschiedene Konzentrationen von 0,8 µg/ml bis zu 100 µg/ml getestet. Sporensuspensionen aller Mutanten wurden bei einer Konzentration von $10^4/10 \mu$ l pro Mulde einer Mikrotiterplatte in Resazurin-Medium gegeben und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Amphotericin B hemmt das Wachstum des Wildtyps ab einer Konzentration von 6,3 µg/ml. Die Histidin-Kinase-Deletionen Δ *nikA* und Δ AN9008 zeigen bei der gleichen Konzentration eine Wachstumshemmung. Alle anderen Deletionsstämme zeigen unterschiedliche Hemmkonzentrationen, was durchaus auf

eine Korrelation der Zweikomponentensysteme auf Zellhüllstress führen lässt (Abbildung 31). Es wurde neben Amphotericin B auch das Polypeptid-Antibiotikum Bacitracin getestet, welches bei Gram-positiven Bakterien die Zellwandsynthese hemmt. Allerdings wurde bei keinem der getesteten Stämme eine Wachstumshemmung beobachtet.

2.2.2. Antimykotische Aktivität des antimikrobiellen Peptids F1

In der Literatur sind Zusammenhänge zwischen den Histidin-Kinasen $\Delta nikA$, $\Delta tcsB$, $\Delta tcsA$, den Response-Regulatoren $\Delta srrA$, $\Delta sskA$ und den Stressantworten auf pH-, Temperatur-, osmotischen und durch Fungizide verursachten Stress bekannt (Furukawa *et al.*, 2005; Hagiwara *et al.*, 2007a; Hagiwara *et al.*, 2007b; Miskei *et al.*, 2009). Diese Deletionsstämme wurden mit dem antimikrobiellen Peptid F1 die lösliche Form von Tet009 (Aminosäuresequenz: RRWKIVVIRWRR) behandelt, dessen Aktivität bereits auf den Wildtyp von *A. nidulans* untersucht wurde (Mania *et al.*, 2010).

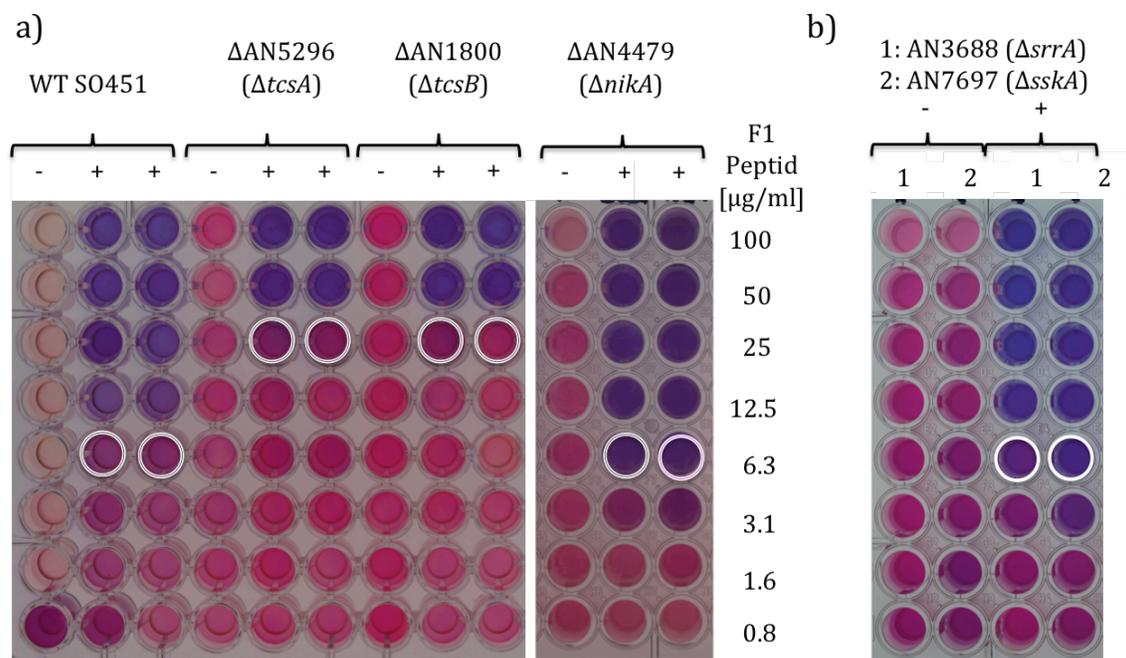


Abbildung 32: Microtiterscreening Assays mit dem AMP F1. Sowohl der Wildtyp *A. nidulans* SO451 als auch drei Histidin-Kinase- und beide Response-Regulator-Deletionsstämme wurden auf ihre Sensitivität gegenüber dem antimikrobiellen Peptid F1 untersucht. In jede Mulde wurde die gleiche Sporenanzahl (10^3 Sporen/ 200 μ l Medium) pipettiert. Der blaue Indikatorfarbstoff Resazurin wird durch Zellatmung zum pink-farbenen Resorufin reduziert. Bleibt eine Mulde blau, ist keine

lebende Zelle vorzufinden. Die Konzentrationen an F1, bei denen kein Wachstum mehr stattfindet, sind mit weißen Umrandungen gekennzeichnet. Die Säulen, die mit einem Minus gekennzeichnet sind, enthalten kein Peptid und dienen als Nachweis der generellen Viabilität der Sporensuspensionen. a) Ab einer Konzentration von 6,3 µg/ml kommt es beim Wildtyp und der *ΔnikA*-Mutante zu keinem Wachstum mehr. Man findet bei den beiden weiteren Histidin-Kinase Deletionsmutanten geringere Sensitivitäten gegenüber F1 (25 µg/ml). b) Beide Response-Regulator Deletionen zeigen im Vergleich zum Wildtyp die gleiche minimale Hemmkonzentration (MHK) von 6,3 µg/ml. Die beiden linken Säulen zeigen dabei die Sporensuspension ohne F1 Zusatz.

Wiederum wurde der Indikatorfarbstoff Resazurin eingesetzt um die Bioviabilität der einzelnen Stämme zu untersuchen und zu vergleichen. Der Wildtypstamm besitzt genau wie bei den Voruntersuchungen mit Amphotericin B eine minimale Hemmkonzentration (MHK) von 6,3 µg/ml. Gleiche Ergebnisse zeigen die Stämme *ΔnikA*, *ΔsrrA* und *ΔsskA*. *ΔtcsA* und *ΔtcsB* zeigen hingegen eine weit höhere Resistenz gegenüber F1 (25 µg/ml).

2.3. Expressionsanalysen F1-induzierter Stämme

Nachfolgend wurden Gene gewählt, die in Stresssituationen unterschiedlich exprimiert werden (Hagiwara *et al.*, 2009; Miskei *et al.*, 2009; Ruger-Herreros *et al.*, 2011) und quantitative *Real-Time* RT Expressionsanalysen durchgeführt. Sowohl vom Wildtyp als auch von den fünf Deletionsstämmen wurden Übernackulturen mit exakt 10^3 Sporen pro ml angeimpft und für 16 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Bei der Inkubation über Nacht wurde nicht auf absolute Dunkelheit geachtet, so waren alle Kulturen gleichmäßig Licht und Dunkel ausgesetzt. Diese Kulturen wurden aufgeteilt und ein Teil mit jeweils 6,3 µg/ml bzw 25 µg/ml F1 für 20 Minuten induziert. Nach dieser Behandlung wurde aus allen Kulturen RNA extrahiert um die Expression zu quantifizieren (Hagiwara *et al.*, 2009). Es wurden drei biologische und zwei technische Replikate eingesetzt und als Haushaltsgen wurde H2B (Histon 2 B) verwendet (Hagiwara *et al.*, 2009).

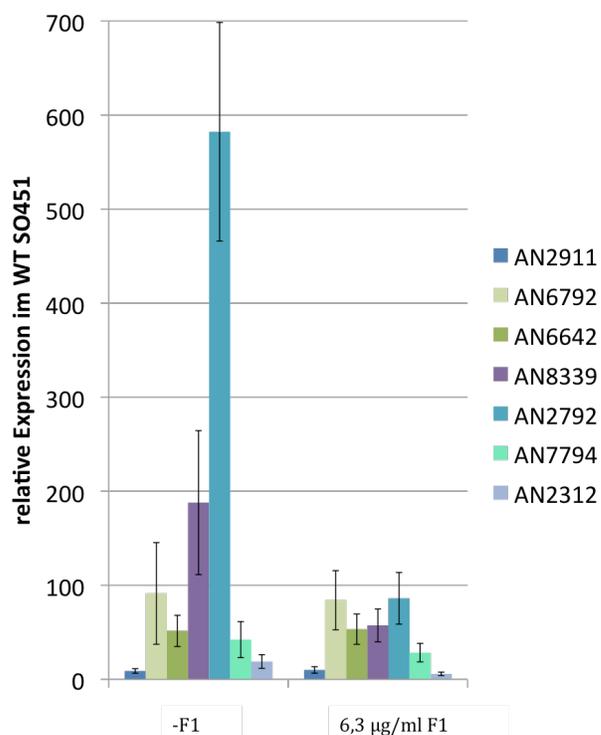


Abbildung 33: Relative Expression vom F1 stressinduzierten Wildtyp S0451. Es wurden sieben Gene untersucht, die bei *A. nidulans* bereits als stressinduzierende Gene bekannt sind (Miskei et al., 2009; Ruger et al., 2011). Die Balken auf der linken Seite zeigen die Expression der unterschiedlichen Gene im nicht induzierten Zustand. Die Balken auf der rechten Seite zeigen die Expression nach einer 20 minütigen Behandlung mit 6,3 µg/ml F1 an. Hierbei fallen nur zwei Gene auf, die einen signifikanten Unterschied zwischen nicht induziertem und induziertem Zustand aufzeigen. AN8339 ist ein durch Licht induziertes Gen (Ruger *et al.*, 2011) und zeigt eine hohe Expression im nicht induzierten Zustand. Durch F1 Induktion sinkt die Expression auf ein Drittel. Eine etwa 6,8-fache höhere Expression im nicht induzierten Zustand im Vergleich zum induzierten Zustand zeigt das Gen AN2792, welches ebenfalls durch Licht induziert wird (Ruger-Herreros *et al.*, 2011). Beide Gene werden ebenfalls bei Fludioxonil Stress reguliert (Hagiwara *et al.*, 2009b).

Die Ergebnisse der ersten Expressionsanalysen zeigen zwei Gene auf, die im nicht induzierten Zustand eine höhere Expression aufweisen als im induzierten Zustand. Diese Gene werden für weitere Expressionsanalysen der Deletionsstämmen eingesetzt. Die Induktion erfolgt gemäß der MHKs der verschiedenen Stämme. So wurden bei den Deletionsstämmen $\Delta tcsB$ und $\Delta tcsA$ sowohl die Konzentration von 6,3 µg/ml als auch 25 µg/ml F1 eingesetzt. Alle Deletionsstämmen haben die hohe basale Expression der beiden untersuchten Gene im nicht induzierten Zustand verloren und zeigen sowohl im nicht induzierten als auch im induzierten Zustand die gleiche Expression wie der Wildtyp im induzierten Zustand.

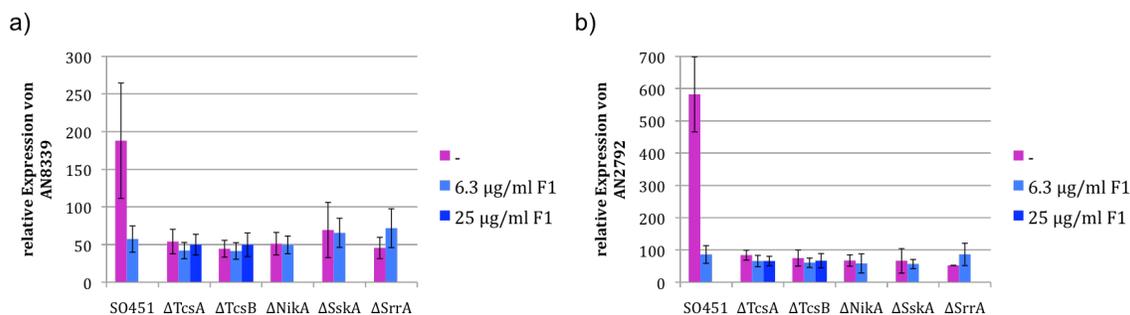


Abbildung 34: Relative Expression vom F1 stressinduzierten Wildtyp SO451 und fünf Deletionsstämmen. Die pinkfarbenen Balken zeigen die Höhe der Expression im nicht induzierten Zustand an. Hellblau (6,3 µg/ml) und dunkelblau (25 µg/ml) zeigen die Expression nach 20 minütiger Expression mit F1 an. a) Das im Wildtyp etwa dreifach höher regulierte Gen AN8339 im nicht induzierten Zustand zeigt in allen Deletionsstämmen sowohl im nicht induzierten als auch im induzierten Zustand keine erhöhte Regulation. Die Expressionen liegen in beiden Zuständen auf dem Level des induzierten Wildtyps. b) Auch die etwa 6,8-fach höhere Expression des Gens AN2792 im nicht induzierten Wildtyp ist in allen Deletionsstämmen verloren gegangen.

Kapitel 3

Funktionalisierung der Sporenoberflächen von *A. nidulans*

Durch die Koppelung antimikrobieller Peptide ist es gelungen technische Oberflächen zu funktionalisieren. Hier wird in einem weiteren Schritt die natürliche Oberfläche einer Spore verändert. In der Biotechnologie sind an Zelloberflächen gekoppelte Peptide und Proteine schon seit Mitte der 1980er Jahre von Interesse (Smith, 1985). Damals wurden Peptide und kleine Proteine zusammen mit dem PIII Protein eines filamentösen Phagen exprimiert. Mittlerweile werden zu unterschiedlichen Zwecken Proteine an Zelloberflächen gebunden, zum Beispiel als Ganzzell-Biokatalysator zur Biodegradation von Pestiziden (Richins *et al.*, 1997). Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien und Hefen werden mittlerweile zur Exponierung von Peptiden und Proteinen an Zelloberflächen genutzt (Lee *et al.*, 2003).

Um Enzyme an Sporenoberflächen von *A. nidulans* zu exprimieren, sollten diese an das Hydrophobin RodA fusioniert werden. RodA besitzt einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-)Anker und ist an der Sporenoberfläche verankert (de Groot *et al.*, 2009).

3.1. Funktionalisierung von RodA mit Enzymen

Bei RodA handelt es sich um eines der Hydrophobine in *A. nidulans*, das für die Rodlet-Struktur auf der Sporenoberfläche verantwortlich ist. RodA besitzt einen sehr starken natürlichen Promotor, ein Signalpeptid (SP) und einen GPI-Anker. Die Enzyme, die an das RodA gekoppelt werden, sind eine Mutanase (MutA) und eine Glukose-6-Phosphat-Isomerase (SwoM).

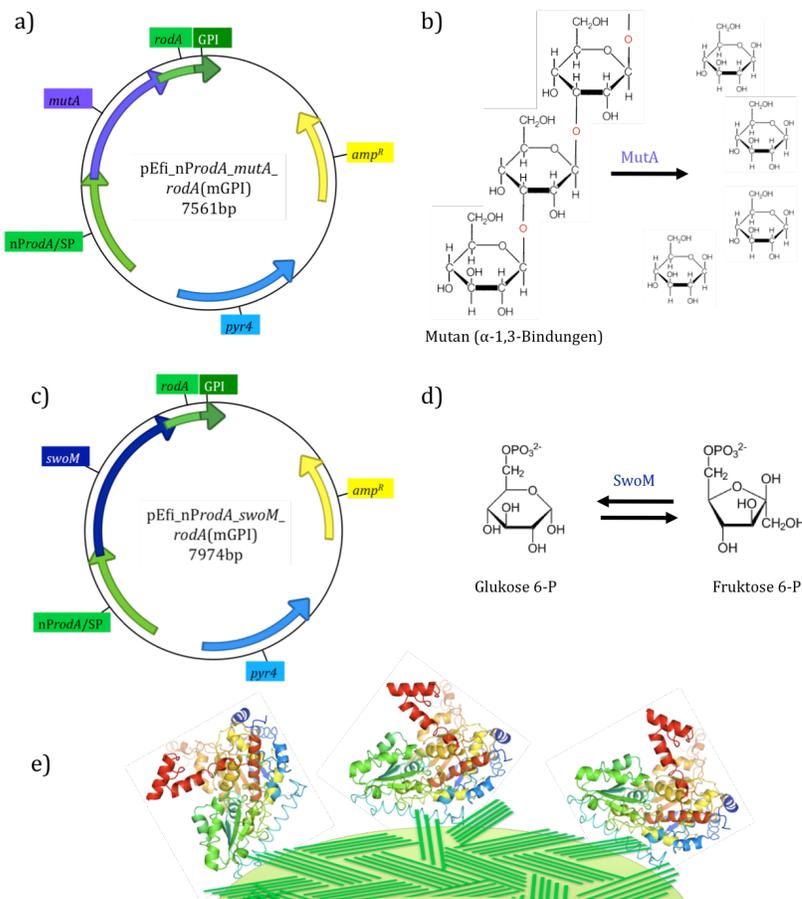


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Vektoren zur Enzymexpression an den Sporenoberflächen. Der Vektor enthält zur Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen (gelber Pfeil) und ein *pyr4* Markergen (hellblauer Pfeil) als Auxotrophiemarker zur Selektion in *A. nidulans*. Mit hellgrün markiert ist die 1056 bp große Sequenz, die den natürlichen Promotor und das Signalpeptid enthält, und das Gen für *rodA* (528 bp). a) *MutA* ist ein 1293 bp langes Gen (lila Pfeil), welches für das Enzym Mutanase kodiert. b) Das Enzym ist in der Lage das Polysaccharid Mutan α -1,3-glykosidisch zu Glukose zu spalten. c) Das Gen *swoM* (1714 bp), das für die Glukose-6-Phosphat-Isomerase kodiert, ist als dunkelblauer Pfeil dargestellt. d) Die Glukose-6-Phosphat-Isomerase kann in einer umkehrbaren Reaktion Glukose zu Fruktose invertieren. e) Modell einer Sporenoberfläche mit Rodlet-Strukturen (grün) und angekoppelten Glukose-6-Phosphat-Isomerasen. Da die Vektoren mit dem *A. nidulans* Wilttyp TN02A3 transformiert werden, konkurriert das modifizierte RodA mit dem natürlichen RodA.

Mutanase spaltet das Polysaccharid Mutan α -1,3-glykosidisch in Glukoseeinheiten. Die Glukose-6-Phosphat-Isomerase ist in der Lage Fruktose in Glukose und andersherum zu invertieren. Beide Gene stammen aus *A. nidulans* und wurden via PCR aus der DNA des Wildtypstammes TN02A3 amplifiziert. Sie wurden zwischen eine etwa 1000bp lange Sequenz, die den natürlichen *rodA*-Promotor (*nProDA*) und das Signalpeptid (SP) enthält, und *rodA* kloniert (Abbildung 35). Dabei werden die enzymkodierenden Gene gegen das RFP des Ausgangsvektors pTT07 (Throm, 2011) getauscht. Die Vektoren wurden mit dem *A. nidulans* Wildtyp TN02A3 transformiert und durch den Auxotrophiemarker *pyr4* selektioniert. Die Transformanten sind nicht mehr auf die Zugabe von Uracil und Uridin ins Wachstumsmedium angewiesen. Die Integration ins Genom wurde mittels PCR nachgewiesen. Beide Transformanten zeigen keine Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings hat der Stamm MutA-RodA-Stamm weiße Sporen, was auf eine ektopische Integration in ein Gen der Pigmentbiosynthese hindeutet. Die Sporenoberflächen beider Transformanten wurden mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM = engl. *atomic force microscopy*) auf den Einfluß der Enzymkoppelung an RodA auf die *Rodlet*-Struktur untersucht. Hierbei werden die Wechselwirkungen zwischen einer die Probe zeilenweise abtastenden Sonde und der zu untersuchenden Oberfläche aufgezeichnet (Binning *et al.*, 1986). Die Aufnahmen, bei denen es möglich ist eine atomare Auflösung zu erzielen und somit einzelne Atome abzubilden (Winterlin *et al.*, 1989), wurden im Institut für Nanotechnologie (INT, KIT Campus Nord) von Paul Vincze durchgeführt. Mittels spezieller Software können die Daten als Bildkontrast dargestellt werden. Für die Untersuchung der Oberflächen wurde der *tapping mode* verwendet, bei der die Sonde, auch *cantilever* genannt, in Schwingung versetzt wird und dabei nur kurzzeitig die Oberfläche berührt (Zhong *et al.*, 1993). Im Amplitudenbild wird der Ausschlag der Spitze durch den Detektor aufgezeichnet, d. h. die Oberfläche abgebildet. Es wird ein 750 nm² Bild dargestellt, wobei bei allen Stämmen die *Rodlet*-Struktur sichtbar ist (Abbildung 36 b). Zum Vergleich der Unterschiede in der *Rodlet*-Struktur wurden jeweils elf *Rodlets* von zwei Sporen pro Stamm berechnet und als Graphik dargestellt (Abbildung 36 c). In der Höhe und der Breite der Strukturen ist dabei

kaum ein Unterschied erkennbar. Die *Rodlets* des Wildtypstammes sind etwas länger als in den beiden Transformantenstämmen, was man in den Amplitudenbildern erkennbar ist. Um die Bündelung der *Rodlets* zu untersuchen wurden von elf Strängen auf zwei Sporenoberflächen die Anzahl der *Rodlets* ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dabei befinden sich im Wildtyp im Durchschnitt 8,6 *Rodlets* in einem Bündel. Bei den Transformanten sind weniger *Rodlets* pro Bündel. RodA_MutA-Stränge umgreifen etwa 6,8 *Rodlets* und RodA_SwoM hat 5,1 *Rodlets* pro Bündel.

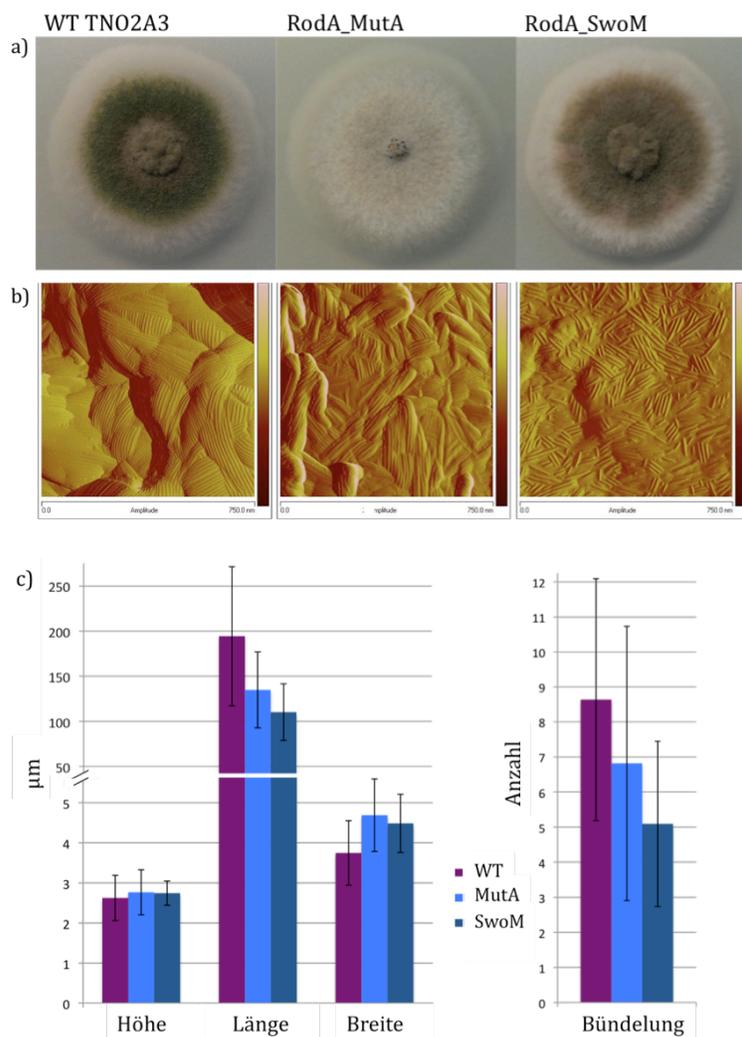


Abbildung 36: Analyse der *Rodlet*-Strukturen. a) Wachstum des Wildtyps TN02A3 im Vergleich zu den Stämmen RodA_MutA und RodA_SwoM: Der Stamm RodA_MutA zeigt weiße Sporen, was auf eine Integration in ein Gen der Pigmentbiosynthese hindeutet. b) AFM-Aufnahmen der Sporenoberflächen: Die Oberfläche der Sporen wurde mit einer Sonde (*cantilever*) abgetastet und mittels eines Auswertungsprogrammes graphisch dargestellt. Das Amplitudenbild stellt ein Abbild

der Oberfläche dar. Bei allen Stämmen sind die *Rodlet*-Strukturen erkennbar, wobei die *Rodlets* bei den Transformanten kürzer sind. Auch die Stränge der gebündelten *Rodlets* wirken bei den Transformanten schmaler. c) Auswertung der AFM-Aufnahmen: Es wurden jeweils elf *Rodlets* auf zwei Sporen pro Stamm ausgewertet. Sowohl bei der Höhe als auch bei der Breite der einzelnen *Rodlets* ist im Durchschnitt kaum ein Unterschied messbar. Die *Rodlets* des Wildtyps sind im Durchschnitt 194nm lang, die der Transformanten sind kürzer (RodA_MutA: ca. 135 nm; RodA_SwoM: ca. 110 nm), was auf den AFM Aufnahmen ebenfalls erkennbar ist. Auch die Anzahl der *Rodlets* pro Strang ist in den Transformanten geringer (WT: ca. 8,6 *Rodlets*; RodA_MutA: ca. 6,8; RodA_SwoM: 5,1).

3.2 Substratherstellung zur Aktivitätsbestimmung der Mutanase

Um die Aktivität der an das Hydrophobin angebundene Mutanase MutA zu untersuchen, musste zunächst Mutan hergestellt werden. Mutan ist ein α -1,3-glykosidisch verknüpftes Polysaccharid, welches kommerziell nicht erhältlich ist. Es wird unter anderem von *Streptococcus mutans* produziert, der es als Adhärenz zum Anheften an den Zahnschmelz nutzt und dort einen Biofilm bildet (Koga *et al.*, 1983). Zur Mutanherstellung wurde *S. mutans* in 500 ml speziellem Wachstumsmedium (Hirn-Herz-Glucose Bouillon; Roth, Karlsruhe) über 24 Stunden bei 37 °C schüttelnd kultiviert. In dieser Zeit werden Glucosyltransferasen gebildet, die sich nach Abzentrifugation der Bakterienzellen im Überstand befinden. In der Mundhöhle werden zuckerhaltigen Getränke und Lebensmittel durch dieses Enzym zu Mutan umgewandelt. Im Labor wurde der Glucosyltransferase-enthaltende Überstand mit 500 ml einer sechsprozentigen Saccharoselösung für 24 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert (Wiater *et al.*, 1999). Das daraus entstandene Mutan wurde abzentrifugiert und gefriergetrocknet (60 mg). Es wurden 10 mg Mutan abgewogen, in 1 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH = 5,5) gelöst, 2 Stunden bei 37 °C quellen gelassen und der Überstand nach einer zweiminütigen Zentrifugation für weitere Versuche genutzt. Mittels Glukose-Messstreifen für Diabetiker aus der Apotheke (Diabur-Test® 5000, Roche) wurde in einem ersten Schnelltest untersucht, ob sich in dem Mutan-Gemisch Glukose befindet. Auf den Streifen befinden sich zwei Enzyme und ein farbloser Farbstoff. Glukose wird zunächst mit Hilfe der Glukoseoxidase (GOD) zu Glukonolacton oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid (H₂O₂) entsteht. Das H₂O₂ wird durch eine Peroxidase zu zwei Wassermolekülen reduziert und der Farbstoff oxidiert. Je nach Höhe der Glukosekonzentration zeigt sich eine stärker werdende Blaufärbung. Die Mutan-

Lösung zeigt keine Blaufärbung, das heißt es ist keine Glukose enthalten. (Abbildung 37).

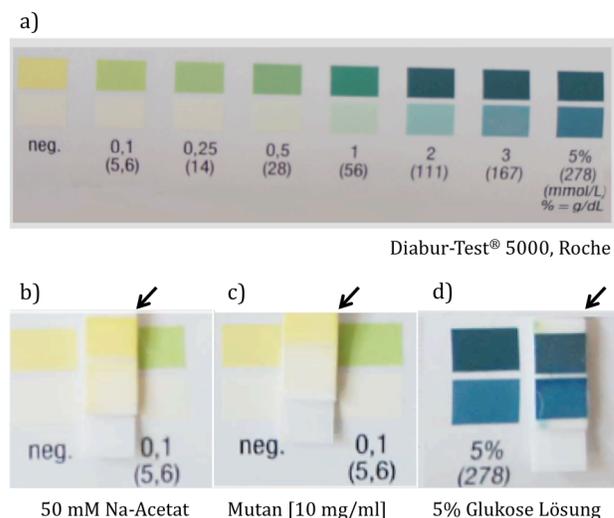


Abbildung 37: Nachweis der Reinheit der Mutan-Lösung. a) Farbskala der nachweisbaren Glukosekonzentrationen mit dem Diabur-Test® 5000 (Roche): Hierbei wird Glukose durch die Glukoseoxidase (GOD) zu Gluconolacton oxidiert, H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) wird gebildet. Eine Peroxidase reduziert H_2O_2 zu zwei Wassermolekülen, dabei kommt es bei einem zunächst farblosen Stoff zum Farbumschlag proportional zur Menge der Glukose. b) Negativkontrolle: 50 mM Na-Acetatpuffer pH 5,5, c) 10 mg Mutan/ml 50 mM Na-Acetat-Puffer, d) Positivkontrolle: 5% Glukose Lösung: Die Glukose-Teststäbchen (schwarzer Pfeil) wurden dabei gegen die Farbskala gehalten fotografiert. Sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei der Mutan Lösung kommt es nicht zum Farbumschlag, was das Fehlen von Glukose beweist (Winandy, 2012).

3.3. Untersuchungen der Enzymaktivität von MutA und SwoM

Das Enzym Mutanase hydrolisiert α -1,3-glykosidische Bindungen, somit wird das Polysaccharid Mutan in Glukosebausteine zerlegt. Die Glukose-6-Phosphat-Isomerase kann Fruktose in einer umkehrbaren Reaktion zu Glukose umwandeln. Infolgedessen wurde, um die Enzymaktivität zu bestimmen, ein Glukosenachweis durchgeführt (Glucose (GO) Assay Kit; Sigma-Aldrich, Seelze). Das Prinzip des Nachweises entspricht den bereits verwendeten Glukose-Messstreifen. Wiederum wird Glukose durch ein Enzymgemisch aus Glukoseoxidase und Peroxidase umgesetzt. Hierbei entsteht ein pinker Farbstoff, der bei 540 nm photometrisch nachgewiesen werden kann. Es wird zunächst eine Eichgerade erstellt, durch deren Steigung die Glukosekonzentration berechnet werden kann.

Um die Enzymaktivität auf der Sporenoberfläche der Transformanten zu bestimmen, wurden zunächst Sporensuspensionen hergestellt und ausgezählt. 300 μ l einer Sporensuspension (10^8 Sporen/ml) wurden mit 100 μ l einer Zuckerlösung (Mutan 2 mg/ml; Fruktose 10 mg/ml) für eine Stunde bei 30-80 °C inkubiert um das

Temperaturoptimum zu bestimmen. Als Standard wurden ebenfalls TN02A3 Wildtypsporen gemessen. Aus der gemessenen Glukosekonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$] wurde die Stoffmengenkonzentration (Molarität [mol/l]) der gemessenen Glukose bestimmt.

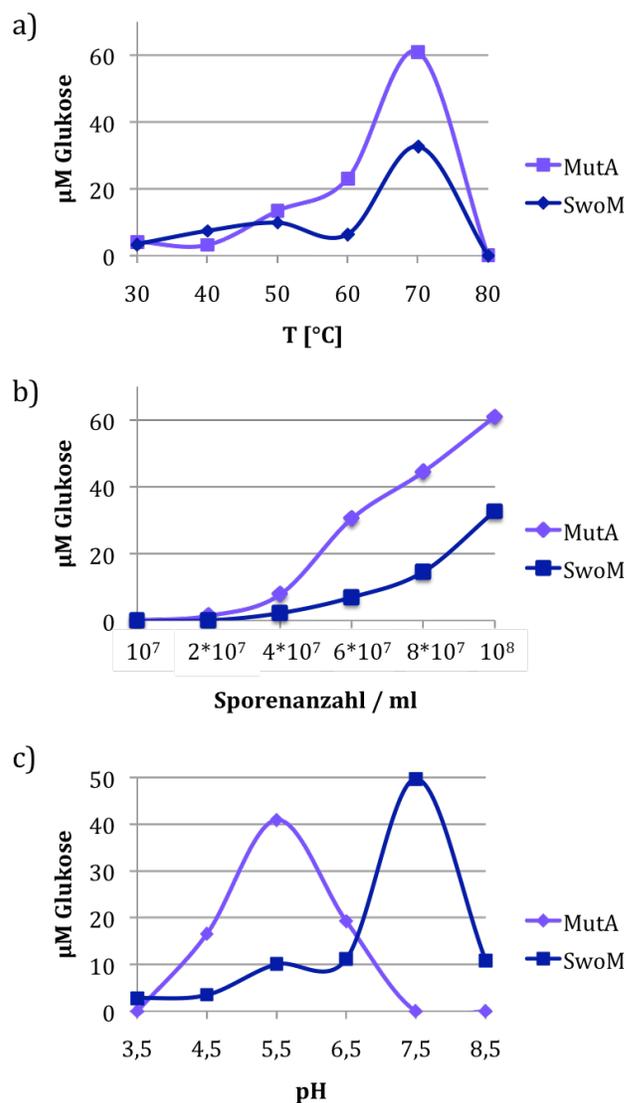


Abbildung 38: Enzymaktivitätstests auf den Sporenoberflächen der Transformanten. Mit Hilfe des Glucose (GO) Assay Kits (Sigma-Aldrich, Seelze) wurde die aus Mutan bzw. Fruktose gebildete Glukosemenge bestimmt. Daraus wurde die Glukose - Stoffmengenkonzentration errechnet. 100 μl einer Zuckerlösung (Mutan 2mg/ml; Fruktose 10mg/ml) wurden mit 300 μl einer Sporensuspension zu unterschiedlichen Bedingungen inkubiert. Zum Vergleich wurden auch Wildtypsporen gemessen und die umgesetzte Glukose-Menge abgezogen. a) Das Temperaturoptimum liegt bei beiden an die Sporenoberfläche geknüpften Enzymen bei 70 $^{\circ}\text{C}$. b) Es ist eine proportional aufsteigende Enzymaktivität zur Sporenkonzentration zu erkennen. c) Beim Temperaturoptimum von 70 $^{\circ}\text{C}$ wurde die Wirkung unterschiedlicher pH-Werte auf die Enzymaktivität untersucht. MutA hat ein pH-Optimum von pH 5,5 und SwoM bei pH 7,5. Beides entspricht den Literaturwerten (Gaikwad und Deshpande, 1992; Wiater und Szczodrak, 2002).

Bei beiden Stämmen liegt das Temperaturoptimum bei 70 $^{\circ}\text{C}$. Nun wurden bei dieser Temperatur steigende Sporenkonzentrationen (10^7 bis 10^8 Sporen/ml) auf ihre Enzymaktivität gemessen. Dabei konnte eine Proportionalität der Sporenkonzentration zur Enzymaktivität festgestellt werden. In einem letzten Schritt wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität gemessen. Dies geschah

wiederum beim Temperaturoptimum von 70 °C und mit 10^8 Sporen/ml. Dabei konnte bei SwoM (Glucose-6-Phosphat-Isomerase) ein pH-Optimum von pH 7,5 und bei MutA (Mutanase) ein Optimum bei pH 5,5 beobachtet werden. Beides entspricht den Literaturangaben (Gaikwad und Deshpande, 1992; Wiater und Szczodrak, 2002).

IV Diskussion

Kapitel 1

Oberflächenfunktionalisierung mittels rekombinanter Hydrophobine

1.1. Expression rekombinanter antibakterieller Hydrophobine in *E. coli*

Hydrophobine sind eine Klasse von oberflächenaktiven Proteinen, die in der Lage sind sehr strapazierfähige Monolagen zu bilden. Besonders Klasse I Hydrophobine zeichnen sich durch die Stabilität ihrer gebildeten Polymere genannt *Rodlets* aus, die nur durch starke Säuren gelöst werden können (Linder *et al.*, 2005; Vries *et al.*, 1993; Wessels *et al.*, 1991). Die Gewinnung dieser Proteine aus ihren Ursprungsproduzenten erwies sich als schwierig und wenig ertragreich (Scholtmeijer *et al.*, 2001). Erst im Jahr 2006 gelang es das Klasse I Hydrophobin EAS rekombinant in *E. coli* zu exprimieren (Kwan *et al.*, 2006). Dies geschah um die Kristallstruktur des Hydrophobins darstellen zu können. Es folgte die Expression der Klasse I Hydrophobine DewA aus *A. nidulans* als auch Hyd2 aus *Beauveria bassiana* in *E. coli* (Kirkland und Keyhani, 2010; Wohlleben *et al.*, 2009). Die Überexpression gelang bei allen Hydrophobinen nur als Fusionskonstrukt und der daraus folgenden Aufreinigung aus Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) (Kwan *et al.*, 2006; Wohlleben *et al.*, 2009; Kirkland und Keyhani, 2010). Rekombinante Fusionsproteine von Hyd2 und DewA wurden zu Oberflächenbeschichtungen genutzt und dabei festgestellt, dass sich auch diese Hydrophobine auf Oberflächen anlagern (Wohlleben *et al.*, 2009; Kirkland und Keyhani, 2010; Rieder *et al.*, 2011). Zur Expression von DewA wurde von der BASF SE eine Synthase (YaaD) und ihre auf 40 Aminosäuren verkürzte Version (YaaD*) aus *B. subtilis* N-terminal an das Hydrophobin geheftet und das Produkt H* Protein A bzw H* Protein B genannt (Wohlleben *et al.*, 2009). Damit gelang die Produktion des Hydrophobins im Kilogramm-Maßstab (Wohlleben *et al.*, 2009). Eine heterologe Expression von DewA ohne Fusionspartner konnte in *Hypocrea jecorina* (im sexuellen Entwicklungsstadium befindliche Form von *T. reesei*) durchgeführt werden (Schmoll

et al., 2010). Ein Vergleich der Kontaktwinkeldaten der mit H* Protein A, H* Protein B und DewA ohne Fusionspartner beschichteten Oberflächen zeigt keinen Einfluss des Fusionspartners auf die Beschichtung (Rieder, 2012; Schmoll *et al.*, 2010). Die Expression von H* Protein B konnte in dieser Arbeit mit Hilfe des im Labor der BASF SE erlernten Protokolls erfolgreich durchgeführt werden.

Zur Vermeidung der initialen Anheftung bakterieller Biofilme wurden mit H* Protein A und H* Protein B beschichtete Oberflächen untersucht. Mit dem Ergebnis, dass keine antibakterielle Wirkung festgestellt werden konnte (Rieder *et al.*, 2011; Rieder, 2012). Auf Grund dessen sollten Peptide eingesetzt werden, die antibakteriell aktiv sind, wenn sie an Oberflächen angehaftet sind (Hilpert *et al.*, 2009). Zum *Screening* solcher kurzer kompetenter Peptide wurde von Hilpert *et al.* (2005) ein Verfahren entwickelt, das in einem großen Durchsatz Aminosäuresequenzen eines antimikrobiellen Peptides verändert und direkt auf ihre Aktivität testet. Diese antimikrobiellen Peptide sollen N-terminal an die verkürzte Synthese des H* Protein B fusioniert werden. Eine solche Modifizierung und Überexpression wurde bereits mit adhäsiv wirkenden Peptiden durchgeführt, mit dem Ziel eine Adhäsion mesenchymaler Stammzellen auf Oberflächen zu erhöhen um dies später bei Implantaten einsetzen zu können (Boeuf *et al.*, 2012; Throm, 2011). Bei den eingesetzten Peptiden handelte es sich um RGD (drei AS) aus Fibronectin und der globulären Domäne LG3 (12 AS) aus dem humanen Laminin-5 (Throm, 2011; Boeuf *et al.*, 2012). Die Insertion der Peptide geschah durch Primerligation und Klonierung in das pBASF 2 Plasmid über EcoRI- und NcoI-Schnittstellen (Throm, 2011; Boeuf *et al.*, 2012; Kapitel V 4.3.). Das gleiche Verfahren sollte für die Fusion antimikrobieller Peptide an H* Protein B eingesetzt werden. Hierbei konnte keine erfolgreiche Klonierung durchgeführt werden, was darauf hindeutet, dass der verwendete Promotor auch ohne Induktion durch IPTG aktiv ist und eine Expression des antibakteriellen Fusionskonstrukts stattfindet. Erfolgreich transformierte Bakterienzellen werden daher durch die antibakterielle Wirkung abgetötet. Zur Vermeidung der frühzeitigen Expression eines toxischen Proteins gibt es verschiedene bekannte Ansätze. Ein erfolgreiches System der

Proteinexpression in *E. coli* beruht auf der RNA-Polymerase des T7 Bakteriophagen, die selektiv nur ihre eigenen Promotoren bindet und somit zur heterologen Proteinexpression eingesetzt werden kann (Studier und Moffatt, 1986). Eine Expressionskassette der T7 Polymerase wurde dabei in das Genom des Bakteriums integriert und unter die Kontrolle des lacUV5 Promotor gesetzt, der durch IPTG induzierbar ist. Es kommt allerdings zu einer geringen aber ständigen Expression der T7 Polymerase, die zum Beispiel durch das Einsetzen von Lysozym inhibiert werden kann (Dubendorff und Studier, 1991; Saida *et al.*, 2006; Studier, 1991).

In dieser Arbeit wurde zur Vermeidung der frühzeitigen nicht induzierten Expression des Fusionshydrophobins der Stamm *E. coli* M15 eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein von Qiagen (Hilden) entwickeltes System toxische Proteine exprimieren zu können. M15 enthält das *multicopy* Plasmid pREP4, welches einen *lac* Repressor konstitutiv exprimiert und somit die frühzeitige Expression der RNA-Polymerase verhindert. Durch Induktion mit IPTG wird der *lac* Repressor inaktiviert wodurch die Proteinexpression beginnen kann. Der Vektor pBASF2, welcher zur Expression von H* Protein B dient, stammt dem pQE60 Plasmid von Qiagen ab, das den T5 Promotor trägt. Dieser Promotor wird ebenfalls von der T7 RNA - Polymerase erkannt. Durch den Einsatz des Stammes M15 konnte zwar ein korrekter Vektor mit Tet009 N-terminal fusioniert an H Protein B konstruiert werden, allerdings kam es zu keiner Proteinexpression. Das Fusionskonstrukt ist demzufolge nach Induktion der Expression toxisch für den *E. coli* Stamm.

Antimikrobielle Peptide werden auf Grund ihrer antibakteriellen Aktivität vor allem synthetisch hergestellt. Allerdings gibt es auch immer mehr Ansätze diese heterolog zu exprimieren (Li und Krumholz, 2009; Moore und Ingham, 2007). In allen Fällen werden Fusionen mit anderen Proteinen genutzt um die antibakterielle Aktivität zu maskieren. Das am häufigsten eingesetzte Protein zur Fusion ist Thioredoxin (Li und Krumholz, 2009), welches benutzt wird um die Bildung von Einschlusskörperchen zu verhindern und Proteine aus dem Cyoplasma aufreinigen zu können (LaVallie *et al.*, 1993). Nach einer gelungenen Expression wird das Peptid abgespalten. Ein erfolgreiches System stellt dabei die SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) –

Fusion dar (Butt *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Malakhov *et al.*, 2004). Dieses Fusionsprotein wird durch die Protease SUMO I, die nur die tertiäre Struktur des Proteins erkennt, abgespalten. Verschiedene antimikrobielle Peptide unter anderem das menschliche AMP LL-37 wurden über die Fusion mit SUMO exprimiert (Bommarius *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Li, 2013). Die in dieser Arbeit eingesetzten AMPs sind trotz Bindung an Zellulosemembranen aktiv (Hilpert *et al.*, 2009) und lassen sich trotz einer Fusion mit einem Hydrophobin nicht exprimieren. Aus diesem Grund wurde GFP eingesetzt um als weiterer Fusionspartner die AMPs abzuschirmen. Zur Abspaltung der GFP-Schutzgruppe wurde eine TEV – Protease – Schnittstelle integriert (Kapust *et al.*, 2002). Durch diese Modifikationen konnte nun ein Fusionsprotein bestehend aus H* Protein B, einem AMP und GFP exprimiert werden und sowohl im Anschluss mit Anti-His Antikörpern als auch Anti-GFP Antikörpern nachgewiesen werden. Auch konnte die GFP-Schutzgruppe durch die TEV – Protease abgespalten werden. Durch eine Insertion einer weiteren TEV – Protease – Schnittstelle zwischen dem AMP und YaaD*, könnte man so ebenfalls antimikrobielle Peptide gewinnen. Vektoren dazu wurden schon konstruiert, aber bisher nicht getestet.

1.2. Oberflächenbeschichtung und Vermeidung der initialen Biofilmbildung

Technische Oberflächen industrieller Anlagen und medizinischer Geräte können durch Biofilmbewuchs erheblich gestört werden. Auch die menschliche Gesundheit ist durch den Biofilmbewuchs auf medizinischen Geräten gefährdet. Dabei gilt es die initiale Anheftung zu verhindern, denn ausgereifte Biofilme mit ihrer schützenden Matrix (EPS = extrazellulär polymerer Substanzen) zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber UV-Strahlung, Schwermetallen, Säuren, Dehydrierung und antimikrobiellen Substanzen (Espeland und Wetzel, 2001; Gilbert *et al.*, 2002; Mah und O'Toole, 2001; McNeill und Hamilton, 2003; Stewart und Costerton, 2001; Teitzel und Parsek, 2003). Bakterien innerhalb eines Biofilms können eine bis zu 1000fach höhere Resistenz gegenüber Antibiotika aufweisen (Anderl *et al.*, 2003; Stewart und Costerton, 2001). Um Oberflächen vor der Anhaftung von Mikroorganismen zu schützen gibt es diverse Ansätze. So wurden natürliche

Systeme wie das Blatt einer Lotusblume als Vorbild genommen um besonders hydrophobe Oberflächen zu generieren und somit Mikroorganismen das Anheften zu erschweren und das Abwaschen dieser zu erleichtern (Bixler und Bhushan, 2012). Auch die Nutzung von Materialien, die nicht antibiotisch aber antimikrobiell wirken wie zum Beispiel Silber wurden erprobt (Monteiro *et al.*, 2009). Immobilisierung von Antibiotika, wie Vancomycin, durch Aufsprühen auf Implantate zeigt eine Wirkung *in vivo* bei Ratten gegen MRSA *S. aureus* (Cevher *et al.*, 2006). Allerdings führt der übermäßige Einsatz von Antibiotika zu immer stärkeren und weiter verbreiteten Resistenzen und somit zu einem Teufelskreis. Antimikrobielle Peptide hingegen zeigen ein großes Wirkspektrum bei kaum vorhandener Resistenzentwicklung (Hancock und Sahl, 2006) und sind daher von großem Interesse zur Vermeidung eines Biofilmbefalls auf Oberflächen. Die Immobilisierung antimikrobieller Peptide wurde bereits in verschiedenen Formen getestet. So wurden zum Beispiel Magain I und II (AMPs gefunden auf der Haut des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*) und aktive kürzere synthetische Derivate mittels verschiedener *Spacer* auf Oberflächen immobilisiert und deren Wirkung auf verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien untersucht (Bagheri *et al.*, 2010; Glinel *et al.*, 2009; Haynie *et al.*, 1995; Humblot *et al.*, 2009). Die Nutzung von *Spacern* und polymeren Bürsten soll die Verfügbarkeit immobilisierter Peptide erhöhen. Allerdings konnten Hilpert *et al.* (2009) zeigen, dass auch direkt auf Zellulosemembranen aufgebrachte antimikrobielle Peptide aktiv sind. In diesem Ansatz wurden 122 verschiedene Varianten der AMPs Bac2A (linearisierte Form von Bactenicin) und Indolicidin direkt auf Zellulosemembranen synthetisiert und ihre Aktivität auf *P. aeruginosa* getestet.

Vier der so getesteten antimikrobiellen Peptide wurden in dieser Arbeit zur Immobilisierung auf Oberflächen durch eine Hydrophobinbeschichtung untersucht. Dies stellt den ersten Ansatz dar antimikrobielle Peptide in einem bakteriellen System zu exprimieren und sofort zur Beschichtung nutzen zu können. Eine direkte Beschichtung von Oberflächen mit H* Protein B und durch eine Streptavidin Brücke nachträgliche Anbindung von Lysozym, Polymyxin B und Vancomycin führte zu

keiner Hemmung der initialen Anheftung und sogar zu einem stärker ausgeprägten bakteriellen Biofilm (Rieder, 2012).

Nach der erfolgreichen Produktion der modifizierten Fusionshydrophobine konnten fortan Oberflächen beschichtet und auf ihre Aktivität getestet werden. In einem ersten Ansatz wurden *Wells* von Microtiterplatten bei 37 °C beschichtet und die Wirkung auf *P. putida* getestet. Die Auswertung erfolgte qualitativ optisch und ergab eine deutlich geringere Ausprägung eines Biofilms auf Oberflächen, die mit an H* Protein B angekoppelten AMPs Tet009 und Tet026 beschichtet waren. Bei Tet009 handelt es sich um ein besonders aktives Derivat von Bac2A, welches bei *P. aeruginosa* eine Sterberate (Verlust der Lumineszenz) von 85 % ± 8 % vermittelt (Hilpert *et al.*, 2009). Um die antibakterielle Aktivität von Tet009 zu verbessern wurden verschiedene Varianten mit den zusätzlichen Aminosäurenresten Arginin und Lysin kreiert (Hilpert *et al.*, 2009). Neu angeordnete Peptide, die alle positiv geladenen Resten am weitesten von der Zellulosemembran entfernt oder in der Mitte des Peptides aufweisen, führten zu einer Reduktion der antimikrobiellen Aktivität. Hingegen wurde eine erhöhte Aktivität beobachtet, wenn sich alle geladenen Aminosäuren am C-Terminus und somit direkt an der Zellulosemembran befinden. Dies deutet darauf hin, dass hydrophobe Aminosäuren direkt exponiert werden sollten um in den direkten Kontakt mit den Bakterien treten zu können (Hilpert *et al.*, 2009), da sie sich somit besser in die Zellmembranen integrieren können. Das so modifizierte Tet026 zeigt auf *P. aeruginosa* 98 % ± 1 % Sterberate. Die stärkere Wirkung von Tet026 auf *P. putida* konnte optisch nicht bestätigt werden. Allerdings zeigt diese Methode nicht den Vergleich von noch lebenden zu bereits abgetöteten Bakterien an. Um die Aktivität der immobilisierten AMPs auf den pathogenen Stamm *P. aeruginosa* zu testen, wurden Versuche im Labor der AG Overhage (IFG, Campus Nord) durchgeführt. Es wurden zwei zusätzliche AMPs Tet008 und Tet125 an H* Protein B fusioniert und getestet. Tet008 ist ein Derivat von Bac2A und vermittelt bei *P. aeruginosa* einen Lumineszenzverlust von 79 % ± 7,2 % (Hilpert *et al.*, 2009). Tet125 hingegen ist ein auf neun Aminosäuren verkürztes Derivat von Indolicidin (in Neutrophilen von Rindern gefunden) und

induziert einen Lumineszenzverlust von $91 \% \pm 7 \%$ (Hilpert *et al.*, 2009). Spezielle Maskenobjektträger mit acht Aussparungen, die beschichtet werden können, wurden genutzt. Beschichtungen erfolgten bei $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, was eine stabilere Beschichtung als bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bewirkt (Rieder *et al.*, 2011). Zur Kontrolle wurden auch Beschichtungen mit BSA und H* Protein B durchgeführt und die Bakterienzellen mit einer *Live/Dead* Färbung (Invitrogen) visualisiert. Hierbei wurden lebende Zellen durch den DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Syto9 grün angefärbt und DNA toter Zellen durch Propidiumiodid markiert. Tote Zellen erscheinen rot. Nach einer ersten optischen Auswertung sind im Biofilmbewuchs der mit BSA, H* Protein B, Tet008, Tet125 beschichteten und der unbeschichteten Probe kaum ein Unterschied erkennbar. Hingegen sind auf mit Tet009 beschichteten Oberflächen nur vereinzelt Bakterienzellen sichtbar. Tet026 zeigt zwar Biofilmbewuchs an, allerdings sind die meisten der Zellen rot und somit tot. Auch die Auszählung von fünf Quadraten zweier Mikroskopiebilder bestätigte diesen ersten optischen Eindruck. Die Verteilung lebender Zellen auf mit BSA und H* Protein B beschichteten und unbeschichteten Oberflächen ist gleich und minimal niedriger bei Tet008 und Tet125 Beschichtungen. Hier ist die Anzahl an toten Zellen etwas höher. Die schwache Auswirkung dieser antimikrobiellen Peptide lässt sich im Fall von Tet008 durch die schwächere Wirkung bei Hilpert *et al.* (2009) erklären. Tet125 zeigte jedoch eine höhere antibakterielle Aktivität gegenüber *P. aeruginosa* in den Beobachtungen von Hilpert *et al.* (2009). Die schwache Wirkung könnte mit der kürzeren Peptidstruktur zusammenhängen, die nicht mehr ausreicht um die bakterielle Zellhülle ausreichend zu stören. Eine Beschichtung mit Tet009 zeigt eine um etwa 200-fach niedrigere Anzahl lebender Zellen gegenüber den Kontrollen (unbeschichtet, mit BSA und H* Protein B beschichtet) und ähnlich viele tote Zellen wie auch bei Tet008 und Tet125 beobachtet werden konnten. Somit zeigt Tet009 eine beachtliche antibakterielle Aktivität im an H* Protein B angehefteten Zustand. Tet026 zeigt eine etwa sechsfache Verringerung der Lebendzellzahl gegenüber den Kontrollen, allerdings ist die Anzahl der toten Zellen etwa 1,7-fach höher als die Gesamtzellzahl der Kontrollen. Dies deutet darauf hin, dass Tet026 zwar Zellen abtötet, die toten Zellen aber an der Beschichtung hängen bleiben. Es könnte also

sein, dass Tet026 zwar Poren in der Zellhülle formt, die Zellen dadurch aber nicht platzen. Die Wirkungsweise spricht für das *torodial* Modell, wo Poren geformt werden, die aus den hydrophilen Bereichen der AMPs und Phospholipiden bestehen. Es würde aber auch bedeuten, dass Tet026 abgespaltet wurde und sich die toten Zellen auf der Hydrophobinschicht ansammeln. Die Wirkungsweise von Tet009 hingegen spricht für das *carpet-like* Modell, in dem sich AMP auf der Zellhülle anreichern und durch Oberflächenspannung die komplette Zellhülle zerstören. Dieses Modell ist ohnehin für kurze AMP vorgeschlagen, die nicht in der Lage sind durch ihre Länge die gesamte Zellmembran zu durchspannen wie beim *barrel-stave* Modell (Hancock und Chapple, 1999).

Die Auswirkung immobilisierter Tet009 und Tet026 wurden auch auf Biofilme Gram-positiver Bakterien untersucht. Hierzu wurde der ebenfalls pathogene Stamm *S. aureus* gewählt. Nach einer *Live/Dead* Färbung konnten kaum tote Zellen ausgemacht werden, daher wurden lediglich die lebenden Zellen ausgewertet. *S. aureus* Biofilme sind viel schwächer ausgeprägt, was bereits mehrfach beobachtet wurde (persönliche Kommunikation Nikola Stempel, IFG, Campus Nord). Oberflächen mit Tet009 und Tet026 beschichtet zeigen eine um drei- bis vierfach verringerte Anzahl an lebenden Zellen. Es ist allerdings hierbei kaum ein Unterschied zwischen Tet009 und Tet026 erkennbar. Die Wirkung der AMPs auf Gram-positive Bakterien scheint der Wirkung auf Gram-negative Bakterien gleich zu sein.

Die Fusion von Tet009 an H* Protein B scheint ein effizientes System zum Schutz der initialen Anhaftung von Biofilmen zu sein, was durch eine äußerst stabile hydrophobinvermittelte Beschichtung unterstützt wird. Zukünftig können durch das entwickelte System mit der GFP-Schutzgruppe vor dem AMP und H*Protein B dahinter, unterschiedliche AMPs exprimiert werden und auf ihre antimikrobielle Wirkung hin getestet werden.

Kapitel 2

AMP-Stressantwort in *A. nidulans*

Die Wirkung natürlicher antimikrobieller Peptide auf Pilze wurde in diversen Arbeiten untersucht, wobei keine generelle Wirkungsweise auf die pilzliche Zelle festgestellt werden konnte (van der Weerden *et al.*, 2013). Um die fungizide Wirkung des kurzen synthetischen Peptides F1 (die gelöste Form von Tet009) auf filamentöse Pilze zu untersuchen, wurde der Modellorganismus *A. nidulans* eingesetzt. Untersuchungen der Wirkung anderer kurzer synthetischer Peptide auf filamentöse Pilze und Hefen zeigten, dass diese die Zellhülle durchqueren und Ziele innerhalb der Zelle angreifen (Lopez-Garcia *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2012). Dabei handelt es sich beispielsweise um das AMP PAF26 (RKKWFW), welches synthetisch hergestellt wurde und die größte antifungale Aktivität gegen *P. digitatum* zeigte, aber auch wirksam gegen *P. italicum*, *Botrytis cinerea* und *F. oxysporum* war (Lopez-Garcia *et al.*, 2002). In *P. digitatum* wurde erstmals gezeigt, dass PAF26 vor der Permeabilisierung der Zelle die Morphogenese stört (López-García *et al.*, 2007; Munoz *et al.*, 2006). Untersuchungen in *N. crassa* zeigten mikroskopisch den Weg von PAF26 durch die Zellhülle und eine Anhäufung im Cytoplasma direkt vor dem Zelltod (Muñoz *et al.*, 2012). Auch im Humanpathogen *A. fumigatus* wurde eine cytoplasmatische Internalisierung von PAF26 und ein daraus folgender Zelltod festgestellt (Munoz *et al.*, 2013). PAF26 zeigt also eine spezifische Wirkung auf filamentöse Pilze, ist aber kaum aktiv gegenüber *E. coli* und *S. cerevisiae* (Lopez-Garcia *et al.*, 2002). F1 hingegen zeigt sich sowohl gegenüber Bakterien als auch filamentösen Pilzen (*A. nidulans*; *F. oxysporum*) antimikrobiell aktiv (Hilpert *et al.*, 2009; Mania *et al.*, 2010; Zoller, 2013). Mania *et al.*, (2010) haben die minimale Hemmkonzentration (MHK = MIC) des Peptids (hier Sub5 genannt) auf *A. nidulans* untersucht und einen Wert von $2 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ festgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach mehrmaliger Wiederholung lediglich eine MHK von $6,3 \mu\text{g/ml}$ ermittelt werden. In beiden Fällen wurde dabei mit Hilfe des Indikatorfarbstoffes Resazurin, dessen Farbe bei Zellatmung von blau nach pink wechselt, die Zellviabilität

untersucht. Der Unterschied in den MHKs könnte daran liegen, dass ein anderer *A. nidulans* Stamm verwendet wurde. Im Gegensatz zu Mania *et al.* (2010) wurde nicht *A. nidulans* RMS011 sondern der Wildtyp *A. nidulans* SO451 untersucht. Dies geschah aus dem Grund, dass die später untersuchten Deletionsstämme der Histidin-Kinasen, die aus dem *Fungal Genetic Stock Center* (FGSC) stammen, aus dem Stamm SO451 generiert wurden. Auch die in dieser Arbeit erzeugten Deletionen der Response - Regulatoren (Srra und SskA) stammen dem *A. nidulans* SO451 Stamm ab. Zur Untersuchung des Wirkortes des AMPs auf *A. nidulans* wurde F1 mit FITC (Fluorescein Isothiocyanat) N – terminal markiert und mikroskopisch untersucht (Mania *et al.*, 2010). Es wurde keine Einschränkung der antimikrobiellen Aktivität durch die Markierung beobachtet. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass sich F1 in der Zellhülle anlagert. Nach einem enzymatischen Verdau der Zellwand konnte die Lokalisierung in der Cytoplasmamembran präzisiert werden (Mania *et al.*, 2010). Somit scheint der Angriffsort die Cytoplasmamembran zu sein. Die bakterielle Stressantwort auf einen AMP Angriff auf die Zellhülle wird durch Zweikomponentensysteme und *Extracytoplasmic function* (ECF) σ -Faktoren vermittelt (Pietiäinen *et al.*, 2005; Staron *et al.*, 2011). Dies wurde in dem Gram-positiven Bakterium *B. subtilis* unter anderen mit den AMPs Nisin, Plectasin und LL-37 untersucht (Staron *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2010; Pietiäinen *et al.*, 2005). Auch *A. nidulans* besitzt Zweikomponentensysteme bestehend aus einem Sensor der Histidinkinase und einem Response-Regulator. Man findet hier 15 Histidin-Kinasen, vier Response-Regulatoren und ein Phosphotransferprotein.

Ob Zweikomponentensysteme in *A. nidulans* auch auf AMP Stress reagieren sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Es wurden drei Histidin-Kinasen (NikA, TcsA, TcsB) und zwei Response-Regulatoren (SrrA, SskA) ausgewählt, die bereits bei der Regulation von osmotischem und oxidativem Stress eine Rolle spielen. Dabei wurden die bereits vorhandenen Daten zur Stressantwort mit Daten zu homologen und besser untersuchten Genen in den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* verglichen (Miskei *et al.*, 2009). TcsA ist eine Histidin-Kinase, die zur Regulation der Konidienproduktion in *A. nidulans* beiträgt (Virginia *et al.*, 2000). Jedoch ist bei der

TcsA Deletion vom *Fungal Genetics Stock Center* im Vergleich zum Wildtyp kein Phänotyp erkennbar (siehe Abbildung 28, Ergebnisse 2.1.). TcsB hingegen dient der Osmoregulation, ist allerdings nicht essentiell, da durch eine Deletion kein Phänotyp im Normal- und Stresszustand erkennbar ist (Furukawa *et al.*, 2002). Für die Histidin-Kinase NikA und die Response-Regulatoren SrrA und SskA wurde in einer Reihe von Studien Stressantworten auf Fungizide und andere Stresskonditionen entdeckt (Furukawa *et al.*, 2007; Hagiwara *et al.*, 2007a; Hagiwara *et al.*, 2007b; Vargas-Perez *et al.*, 2007). So ist NikA der Sensor, der bei Stress verursacht durch das Pflanzenschutzmittel Fludioxonil die Response-Regulatoren SrrA und SskA über das Phosphotransferprotein phosphoryliert (Vargas-Perez *et al.*, 2007; Hagiwara *et al.*, 2007b). Dabei dient SrrA direkt als Transkriptionsfaktor von Stressgenen und SskA induziert die HogA MAPK - (*mitogen-activated protein kinase*) Kaskade (Hagiwara *et al.*, 2009). In Gegenwart von Fludioxonil zeigt der Δ NikA Deletionsstamm eine höhere Resistenz (Vargas-Perez *et al.*, 2007; Hagiwara *et al.*, 2007b). Dies konnte in Gegenwart von F1 in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Hier zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp die gleiche MHK von 6,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hingegen haben die Δ TcsA und Δ TcsB Deletionsstämme eine MHK von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gegenüber der AMPs F1, was darauf schließen lässt, dass diese Histidin-Kinasen ein potentielles Ziel des AMPs F1 sind. Zur genaueren Untersuchung wurden quantitative *Real-Time* RT Expressionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden Stressgene getestet, die bereits durch unterschiedliche Regulationen in Stresssituationen bekannt sind (Miskei *et al.*, 2009; Ruger-Herreros *et al.*, 2011). In einer ersten Runde wurde die Regulation von sieben Stressgenen vor und nach Induktion des Wildtyps mit F1 untersucht. Dabei fielen die beiden hypothetischen Proteine AN8339 und AN2792 auf, deren Transkriptmenge nach Induktion mit dem AMP F1 drei- bis 6,8-fach verringert ist im Vergleich zum nicht-induziertem Zustand. (siehe Abbildung 33, Ergebnisse 2.3.). AN8339 und AN2792 sind Stressgene, die sowohl nach Fludioxonil Behandlung als auch bei der Lichtantwort eine erhöhte Expression zeigen (Hagiwara *et al.*, 2009; Ruger-Herreros *et al.*, 2011), was im Gegensatz zu den Ergebnissen in dieser Arbeit steht. F1 scheint also die Signaltransduktion zu behindern, was folglich die Transkription der Stressgene

AN8339 und AN2792 inhibiert. In einem weiteren Schritt wurden die Deletionsstämme der drei Histidin-Kinasen und zwei Response-Regulatoren mit F1 induziert und die Expressionen der Stressgene AN8339 und AN2792 mit den Ergebnissen im Wildtyp verglichen. Dabei war sowohl im uninduzierten als auch induzierten Zustand das Expressionslevel beider Gene auf der Höhe des reprimierten induzierten Zustands im Wildtyp (siehe Abbildung 34, Ergebnisse 2.3.).

Aus diesem Ergebnis lassen sich zwei Rückschlüsse ziehen, die in einem an Hagiwara *et al.* (2009) und Miskei *et al.* (2009) angelehnten Modell dargestellt werden (Abbildung 39). Zum einen behindert F1 die Signaltransduktion der Zweikomponentensysteme, was zu einer reprimierten Expression der Stressgene AN8339 und AN2792 führt (Abbildung 39 a). Dabei muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden welcher Schritt der Signalkaskade angegriffen wird. Es wurde bereits festgestellt, dass kurze synthetische AMPs an ATP und ATP-abhängige Enzyme binden und so die Funktion beeinträchtigen (Hilpert *et al.*, 2010). Dies würde dann wiederum auf Ziele innerhalb der Zelle deuten. Zusätzlich ist die Expression der Stressgene reprimiert unabhängig davon welche Komponente des Zweikomponentensystems deletiert wurde (Abbildung 39 b). Dies lässt auf ein genaues Zusammenspiel der einzelnen Komponenten schließen. Demnach sind die Response-Regulatoren SrrA und SskA auch den Histidin-Kinasen TcsA und TcsB nachgeschaltet, was bisher nicht belegt werden konnte. Sowohl jede der drei Histidin-Kinasen als auch beide Response-Regulatoren werden zur vollen Induktion der Expression beider Gene benötigt. Die jeweilige Funktion der beiden Gene in *A. nidulans* ist noch unbekannt und muss genauer untersucht werden.

Abschließend lässt sich eine Reaktion von Zweikomponentensystemen in *A. nidulans* auf Stress verursacht durch kurze synthetische antimikrobielle Peptide beweisen. Weitere Untersuchungen der hier reprimierten Stressgene AN8339 und AN2792 würden bei der weiteren Aufklärung der stressinduzierten Signalkaskade helfen.

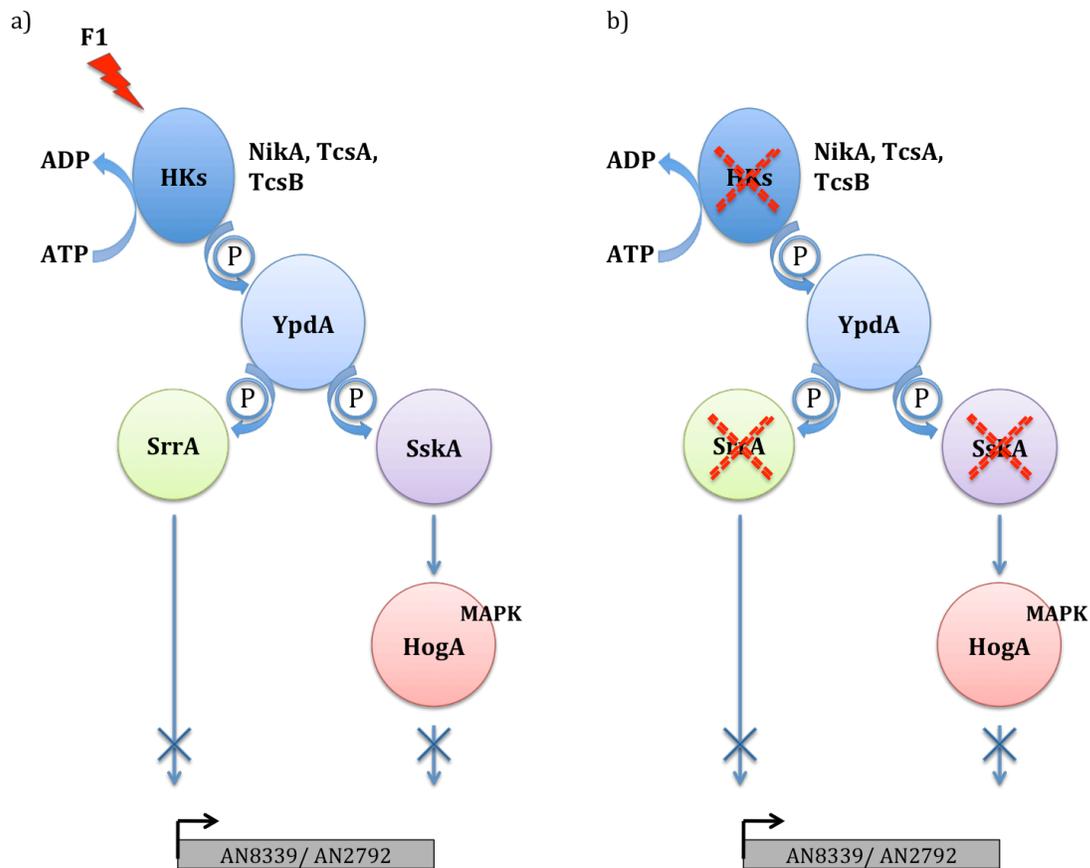


Abbildung 39: Modell zur Wirkung von F1 auf Zweikomponentensysteme. a) Nach einer Induktion des Wildtyps mit dem antimikrobiellen Peptid F1 wurde die Expression der Gene AN8339 und AN2792 reprimiert. An welcher Stelle der Signalkaskade angegriffen wird, ist noch unbekannt. b) Die Deletion jeweils einer Histidin-Kinase (TcsA, TcsB, NikA) oder eines Response-Regulators (SrrA, SskA) führt zur Reprimierung der Expression von AN8339 und AN2792. Dies deutet auf ein Zusammenspiel der Komponenten hin.

Kapitel 3

Funktionalisierung von Sporenoberflächen in *A. nidulans*

Systeme zur Oberflächenfunktionalisierung von Bakterienzellen, Hefen und sogar Viren wurden bereits ab Mitte der 1980er Jahre entwickelt. Dabei wurden unter anderem Enzyme zur Biodegradation von Pestiziden angekoppelt (Richins *et al.*, 1997). Bei Bakterien findet man vor allem eine Exponierung von Enzymen an *B. subtilis* Sporenoberflächen. So wurden zum Beispiel α -Amylasen an Zellwand verankerte Sortasen fusioniert und positiv auf ihre Aktivität getestet (Nguyen *et al.*, 2011). Bei Hefen werden am häufigsten Proteine mit GPI Anker, die zur Befestigung

der Proteine in der Zellmembran dienen, verwendet. Schon 1997 wurden so *S. cerevisiae* Zellen produziert, die Glukoamylasen fusioniert an α -Agglutinin auf der Zelloberfläche tragen und somit in der Lage waren Stärke abzubauen (Murai *et al.*, 1997). Auch filamentöse Pilze wie *A. nidulans* besitzen Proteine mit GPI-Anker unter anderem das Klasse I Hydrophobin RodA (de Groot *et al.*, 2009). RodA ist für die stabile *Rodlet*-Schicht auf Sporenoberflächen verantwortlich. Dies ließ sich aus AFM-Aufnahmen im Vergleich zum $\Delta rodA$ Deletionsstamm schließen (Throm, 2011). Durch eine Fusion von RodA und RFP konnte zusätzlich die Lokalisierung an der Sporenoberfläche nachgewiesen werden (Throm, 2011). In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Enzyme an Sporenoberflächen eines filamentösen Pilzes immobilisiert, indem diese an das Klasse I Hydrophobin RodA fusioniert wurden. Bei den beiden Enzymen handelt es sich um eine Mutanase (MutA) und eine Glukose-6-Phosphat-Isomerase (Swom) aus *A. nidulans*. Zur Expression wurde der starke natürliche Promotor von RodA eingesetzt.

Der Zucker Mutan, der durch eine Mutanase α -1,3-glykosidisch gespalten werden kann, wird unter anderem von *S. mutans* gebildet. Dies ist der erste Schritt zur Biofilmbildung auf dem Zahnschmelz und dient den Bakterien zur initialen Anheftung (Hamada *et al.*, 1996; Kuramitsu, 1993). Es konnte sogar gezeigt werden, dass rekombinant exprimierte Mutanasen dazu in der Lage sind orale Biofilme abzubauen (Wiater *et al.*, 2008). Die Glukose-6-Phosphat-Isomerase ist seit dem Ende der 1950er Jahre ein industriell bedeutendes Enzym, da es in der Lage ist Glukose in die süßer schmeckende Fruktose umzuwandeln und so die damals knappe Saccharose ersetzt werden konnte (Bhosale *et al.*, 1996). Dabei wird dieses Enzym immobilisiert auch auf Zelloberflächen von Hefen und Bakterien eingesetzt um so eine wiederholte Nutzung und kommerzielle Vorteile zu erzielen (Bhosale *et al.*, 1996).

Es konnte in AFM-Aufnahmen gezeigt werden, dass die an der *A. nidulans* Sporenoberfläche immobilisierten Enzyme die *Rodlet* - Schicht nicht beeinträchtigen. Die Strukturen sind noch deutlich erkennbar, auch wenn sich die Länge der einzelnen *Rodlets* und die *Rodlet* - Bündelung selbst verkleinert haben.

Auch eine Enzymaktivität konnte nachgewiesen werden. So ist für die Enzymreaktion beider an die Sporenoberfläche immobilisierten Enzyme ein Temperaturoptimum von 70 °C ermittelt worden. Für freie heterolog exprimierte Mutanasen liegt der Wert allerdings mit 40 °C weit niedriger (Wiater und Szczodrak, 2002). Das Enzym benötigt demnach im an die Sporenoberfläche immobilisierten Zustand weit mehr Energie. Für Glukose-6-Phosphat-Isomerasen gibt es Daten für sowohl lösliche als auch immobilisierte Enzyme. Demnach ist das Temperaturoptimum bei der löslichen Glukose-6-Phosphat-Isomerase bei 75 °C und der immobilisierten Form sogar bei 80 °C (Gaikwad und Deshpande, 1992). Die Tempeaturoptima liegen somit in einem ähnlichen Bereich. Die pH - Optima der an die Sporenoberflächen immobilisierten Enzyme liegen sowohl bei MutA (pH 5,5) als auch bei Swom (pH 7,5) im gleichen Bereich wie in den Literaturangaben (Wiater und Szczodrak, 2002; Gaikwad und Deshpande, 1992).

Diese Arbeit stellt einen ersten Ansatz vor, funktionsfähige Enzyme an Sporenoberflächen filamentöser Pilze zu immobilisieren. Dabei wurde mit RodA ein verankertes zur Fusion geeignetes Protein eingesetzt, das die vier Mindestanforderungen für ein *Carrier* - Protein erfüllt (Lee *et al.*, 2003). Es besitzt demnach ein Signalpeptid, einen starken GPI-Anker, ist kompatibel zur Sequenz der angekoppelten Enzyme und ist äußerst stabil. Somit kann man weitere Enzyme und Proteine ebenfalls an RodA koppeln und auf der Sporenoberfläche darstellen. Der Vorteil von Ganzzell - Biokatalysatoren liegt darin, dass eine teure synthetische Enzymproduktion umgangen wird und das Enzym direkt funktionsfähig exprimiert und auf der Zelloberfläche exponiert wird. Mittlerweile werden sogar schon mehrschrittige Reaktionen mit Enzymen immobilisiert an Hefezellen durchgeführt. So werden entweder mehrere Enzyme an dieselbe Zelle exponiert oder mehrere unterschiedliche Hefen in ein Reaktionsgemisch gegeben. Dies geschieht zum Beispiel um Alkohol aus Zellulose zu gewinnen (Kim *et al.*, 2013). Diese Anwendung ist auch mit Sporen von *A. nidulans* denkbar, da noch weitere Proteine über GPI-Anker verfügen, wie zum Beispiel das Klasse I Hydrophobin DewB (de Groot *et al.*, 2009; Throm, 2011).



V Material und Methoden

1. Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Reagenzien, Kits und Chemikalien stammen, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen *AppliChem* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe), *Sigma-Aldrich* (Hamburg), *Invitrogen* (Karlsruhe) und *Merck* (Darmstadt). Restriktionsenzyme und der DNA-Marker stammen von *New England Biolabs* (Frankfurt), *Fermentas* (St. Leon-Rot) und *Roth* (Karlsruhe). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem *Zeiss AxioImagerZ.1* mit einer *Zeiss AxioCamMR* (Software *AxioVision 4.5*) angefertigt. Des Weiteren wurden die Programme *Serial Cloner 2-1*, *ApE-A plasmid editor v1.13* und *ImageJ* verwendet.

2. Verwendete Organismen

Tabelle 2: Liste der verwendeten Organismen

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
Top 10F	F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) j80lacZDM15DlacX74 nupG recA1 araD139 D(ara-leu)7697galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 c	Invitrogen (Karlsruhe)
M 15 [pREP4]	nalS, strS, rifS, lac-, ara-, gal-, mtl-, F-, recA+, uvr+	Qiagen, Hilden
Rosetta (DE3) pLysS	F- ompT hsdSB(RB -mB -) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (CamR)	Novagen (Merck), Darmstadt
Mach1	ΔrecA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(r _K ⁻ m _K ⁺)	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>P. putida</i>	Wildtyp	DSMZ - Deutsche Sammlung von

DSM 7152		Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
<i>P. aeruginosa</i> PA01	Wildtyp	R. E. W. Hancock Laboratory, Vancouver, Kanada (Stover <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. mutans</i> DSM 20523	Wildtyp	DSMZ
<i>S. aureus</i>	klinisches Isolat 3a, MRSA	IFG, KIT Campus Nord
<i>A. nidulans</i>		
TN02A3	pyrG89; argB2; nkuA::argB; pyr A4	Fungal Genetic Stock Centre (FGSC), Missouri, USA
S0451	pyrG89; wA3; argB2; Δ nkuA _{ku70} ::argB; pyroA4; sE15; nirA14; chaA1; fwA1	(Osmani <i>et al.</i> , 2006)
KID99 (Δ AN2363)	S0451 transformiert mit AN2363::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID100 (Δ AN2581)	S0451 transformiert mit AN2581::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID101 (Δ AN3101)	S0451 transformiert mit AN3101::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID103 (Δ AN3214)	S0451 transformiert mit AN3214::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID105 (Δ AN4113)	S0451 transformiert mit AN4113::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID108 (Δ AN4447)	S0451 transformiert mit AN4447::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA

KID109 (Δ AN4479/ Δ <i>nikA</i>)	S0451 transformiert mit AN4479::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID111 (Δ AN4818)	S0451 transformiert mit AN4818::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID120 (Δ AN1800/ Δ <i>tcsB</i>)	S0451 transformiert mit AN1800::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID121 (Δ AN5296/ Δ <i>tcsA</i>)	S0451 transformiert mit AN5296::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID122 (Δ AN6820)	S0451 transformiert mit AN6820::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID123 (Δ AN7945)	S0451 transformiert mit AN7945::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID126 (Δ AN9008)	S0451 transformiert mit AN9008::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
KID127 (Δ AN9048)	S0451 transformiert mit AN9048::pyrG ^A Deletionskassette	FGSC, Missouri, USA
SBG001 (Δ AN3688/ Δ <i>srrA</i>)	S0451 transformiert mit AN3688::pyrG ^A Deletionskassette	diese Arbeit
SBG002 (Δ AN7697/ Δ <i>sskA</i>)	S0451 transformiert mit AN7697::pyrG ^A Deletionskassette	diese Arbeit
SLW005 (MutA)	TNO2A3 transformiert mit pLW004	(Winandy, 2012)
SBG003 (SwoM)	TNO2A3 transformiert mit pBG0	diese Arbeit

3. Kultivierung der Organismen

3.1. Kultivierung von Bakterien

Tabelle 3: Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

Medium	Zusammensetzung je L Medium
Lysogeny Broth (LB)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7,5
SOC	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 0,19 g KCl; 2 g MgCl ₂ x 7 H ₂ O; 3,6 g Glukose; pH 7,0
EC3	15 g Hefeextrakt, 15 g Trypton, 30 g Glycerin, separat einwiegen und lösen: 2 g KH ₂ PO ₄ , 5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,1 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O, pH 7, 50 ml SL 4 Spurenelemente
SL 4 Spurenelemente	500 mg C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O, 200 mg FeSO ₄ x H ₂ O, ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, MnCl ₂ x 4 H ₂ O, H ₃ BO ₃ , CoCl ₂ x 6 H ₂ O, CuCl ₂ x 2 H ₂ O, NiCl ₂ x 6 H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
Hirn-Herz-Glucose Bouillon Carl Roth (Karlsruhe)	7,5g Kalbshirn-Infusion, 10g Pepton, 5g Natriumchlorid, 10g Rindherz-Infus, 2,5g Dinatriumphosphat, 2g Glucose, pH 7,4 ± 0,2
Müller-Hinton Bouillon	Fertigmedium (Merck, Darmstadt)

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml

3.1.1. Kultivierung von *E. coli*

Der *E. coli* Stamm TOP 10 wurde für Klonierungen und zum Anlegen von Glycerinstocks in der Plasmidsammlung verwendet. Die Standardkultivierung für *E. coli* erfolgte aerob, in/auf LB-Medium (Tabelle 3) bei 37 °C. Das Medium wurde mit

den entsprechenden Selektionsmarkern versehen. Flüssigkulturen wurden dabei bei 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Die Stämme M15 und Rosetta (DE3) pLysS wurden für Proteinexpressionen verwendet und dafür jeweils frisch mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Für Proteinexpressionen wurde in 500 ml bzw 3 L (Laborfermenter) EC3-Medium mit entsprechenden Antibiotika inkubiert.

3.1.2. Herstellung kompetenter *E. coli*

Tabelle 5: Lösungen zur Herstellung kompetenter *E. coli*

Medium	Zusammensetzung je L Medium
SOB	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
TB	55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, 10 mM PIPES/KOH pH 6,7

Es wurde eine 20 ml Übernacht-Kultur des gewünschten *E. coli* Stammes in 500 ml SOB Medium auf eine OD₆₀₀ = 0,2 verdünnt. Diese wurde bei 18 °C und 200 rpm mehrere Stunden geschüttelt. Bei OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Kultur 10 Minuten auf Eis inubiert und dann bei 1.000 g für 10 Minuten sedimentiert. Das Pellet wurde in eiskaltem TB aufgenommen und wieder 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 20 ml TB aufgenommen und 7 % DMSO (Dimethylsulfoxid) (v/v) hinzugegeben. Die Suspension wurde aliquotiert (100 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

3.1.3. Kultivierung von *S. mutans* und Mutanherstellung

Als Vorkultur wurden 50 ml Hirn-Herz-Glucose Bouillon mit *S. mutans* angeimpft und 24 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 0,5 L Medium-Hauptkultur wurde mit der Vorkultur angeimpft und für 24 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 5.000 rpm abzentrifugiert,

um den Überstand, welcher das Enzym Glykosyltransferase (GTF) enthält, von den Zellen zu trennen. Das wasserunlösliche Mutan wird von der GTF aus Saccharose synthetisiert und fällt nach 48 Stunden als weißer Niederschlag aus. Zur Mutanherstellung wurden 0,5 l Überstand mit 0,5 L 6 %iger Saccharose-Lösung und 0,05 % NaN_3 versetzt. Das Natriumazid dient der Abtötung restlicher Bakterienzellen, welche nicht restlos durch das Abzentrifugieren entfernt wurden. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C und 180 rpm wurde das ausgefallene Mutan durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 Minuten pelletiert und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Mutan wurde anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -40 °C und 0,120 mbar für 24 Stunden lyophilisiert.

3.1.4. Kultivierung und Biofilmwachstum von *P. putida*, *P. aeruginosa* und *S. aureus*

P. putida wurde bei 28 °C in LB-Medium schüttelnd inkubiert. Zum Biofilmwachstum in Mikrotiterplatten wurden jeweils 200 µl der Kultur ($\text{OD}_{600} = 0,2$) pro Well pipettiert und über Nacht bei 28 °C stehend inkubiert.

P. aeruginosa und *S. aureus* wurden in Müller-Hinton Bouillon über Nacht bei 37 °C und schüttelnd angezogen. Zum Biofilmwachstum wurden Rührreaktoren mit 2 L Müller-Hinton Bouillon auf eine OD_{600} von 0,02 angeimpft und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Abbildung 40). Die Versuche mit *P. aeruginosa* und *S. aureus* wurden im Labor von Jörg Overhage (IFG, KIT Campus Nord) durchgeführt.



Abbildung 40: Anzucht von *P. aeruginosa* und *S. aureus* in Rührreaktoren. Die Kulturen wurden in 2 L Müller-Hinton Bouillon auf eine $OD_{600} = 0,02$ angeimpft (a) und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (b). Aufgenommen wurde das Wachstum von *S. aureus*.

3.2. Kultivierung von *A. nidulans*

Tabelle 6: Medien zur Kultivierung von *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung je L Medium
YAG	0,5 % Hefeextrakt; 1% Glukose; 1 ml Spurenelementlösung; 2 mM $MgSO_4 \times 7H_2O$ in Flüssigkultur; 10 mM $MgSO_4 \times 7H_2O$ in Festmedium
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung; 1 ml Spurenelementlösung; 2 % Glukose, Threonin oder Glycerin; mit 10 M NaOH auf pH 6,5, zur Regeneration von Protoplasten mit 0,6 KCl supplementiert
Spurenelementlösung (1000x)	22 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O$; 11 g H_3BO_3 ; 5 g $MnCl_2 \times 4 H_2O$; 5 g $FeSO_4 \times 7 H_2O$; 1,6 g $CoCl_2 \times 5 H_2O$; 1,6 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$; 1,1 g $(NH_4)_6Mo_7O_2 \times 4 H_2O$; 50 g Na_4EDTA ; mit KOH-Plätzchen auf pH 6,5
Salz-Stammlösung (20x)	120 g $NaNO_3$; 10,4 g KCl; 10,4 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$; 30,4 g KH_2PO_4

Die *A. nidulans*-Stämme wurden auf oder in YAG- oder Minimalmedium (MM) kultiviert (Tabelle 6). Als Kohlenstoffquelle diente dabei standardgemäß Glukose. Die Medien wurden je nach Bedarf mit den entsprechenden Auxotrophiemarkern supplementiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusätze der Nährmedien für *A. nidulans*

Substanz	Konzentration der Stammlösung	eingesetzte Menge je 1 L
Arginin	500 mM (= 100x) sterilfiltrieren	10 ml
Pyridoxin-HCl	0,10 % (= 1000x) autoklavieren	1 ml
P-Aminobenzoesäure	0,10 % (= 1000x) autoklavieren	1 ml
Uracil	-	1 g
Uridin	-	1 g

Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben im Schüttler bei 180 rpm über Nacht (für Protoplasten) geschüttelt. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro L Medium eingewogen. Die Pilzkulturen wurden, falls nicht anders vermerkt, bei 37 °C inkubiert. Medien und Lösungen wurden 20 Minuten bei 121 °C und mindestens 1 bar Überdruck autoklaviert. Glaswaren wurden im Hitzesterilisator ~ 4 Stunden bei 180° C sterilisiert. Hitze-empfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0.2 bzw. 0.45 µm Porengröße).

3.3. Herstellung einer Sporenlösung von *A. nidulans*

Die Sporen von ein bis drei voll bewachsenen Petrischalen mit Wachstumsmedium wurden abgekratzt, indem 10 ml einer 0,1 %igen Tween 20-Lösung auf die Platte gegeben wurde. Die Sporen-Lösung wurde durch steriles Mira cloth in ein 50 ml Falcon gefiltert und die Sporen wurden abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Sporenpellet mit ddH₂O gewaschen und in 10-20 ml ddH₂O resuspendiert. Die Sporenanzahl wurde mit Hilfe einer Helber Zählkammer bestimmt.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1. Gelelektrophorese, DNA-Restriktion und Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %ige Agarosegele mit 0,5 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA) hergestellt. Als Größenstandard diente der *Gene Ruler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, St. Leon-Rot) oder der *1 kb DNA Ladder* (New England Biolabs, Frankfurt). Die Gele wurden etwa 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml in TAE) geschwenkt, um anschließend die DNA-Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) sichtbar zu machen und zu fotografieren. Falls nötig, wurden DNA-Fragmente mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und mit dem *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (ZymoResearch, Freiburg) aufgereinigt.

Restriktionsverdauungen wurden in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Die Ansätze enthielten etwa 0,3 - 1 µl (5 - 100 U/µl) des jeweiligen Restriktionsenzymes. Die Zusammensetzung der Ansätze und die Reaktionstemperatur entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Die Ansätze wurden je etwa 1-2 Stunden inkubiert. Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt) oder Fermentas (St. Leon-Rot). Für die Durchführung von Klonierungen wurde die DNA wie zuvor beschrieben geschnitten, auf ein Gel aufgetragen und anschließend aus diesem eluiert. Mit der geschnittenen *Insert*- und Vektor-DNA wurden Ligationen über Nacht bei 16 °C oder bei Raumtemperatur für eine Stunde mit Hilfe der T4-Ligase der Firma New England Biolabs (Frankfurt) durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor zu *Insert* lag bei jeder Ligation bei 1:3. Für Zwischenklonierungen wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Leek, NL), mit dem Vektor pCR2.1-TOPO, oder das CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas), mit dem Vektor pJET1.2/blunt Cloning Vector, nach Herstellerangaben verwendet. Wurden für die TOPO-Klonierungen PCR-Produkte verwendet, welche mit der *Pfu*-Polymerase (Fermentas) oder der Phusion-Polymerase (Finnzymes Reagents) hergestellt wurden, dann wurde mit der *Taq*-Polymerase (New England Biolabs)

und einem Überschuss von 100 μM dATP, durch Inkubation für 15 Minuten bei 72 $^{\circ}\text{C}$, A-Überhänge an das Amplifikat gehängt.

4.2. PCR und verwendete Oligonucleotide

PCR-Reaktionen wurden entweder mit der *Pfu*-, *Taq*- oder Phusion-Polymerase durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Die PCR-Standardreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μl mit 200 μM dNTPs und 0,2 μM *Primern* angesetzt. Das PCR Protokoll wurde nach Herstellerangaben für die jeweiligen Polymerasen durchgeführt, wobei das Protokoll entsprechend der Größe des PCR-Produktes und der Schmelztemperatur der *Primer* angepasst wurde.

Für die Herstellung von Sonden für den *Southern-Blot*, wurde dem PCR-Ansatz 1 μl des DIG Probe Synthesis Mix aus dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) zugefügt. PCR-Produkte wurden mit dem DNA *clean & concentrator* Kit (ZymoResearch, Freiburg) aufgereinigt.

Tabelle 8: verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
Tet009 sense	aat tca tta aag agg aga aat taa ccA TGC GCC GCT GGA AAA TTG TGG TGA TTC GCT GGC GCC GCc a
Tet009 antisense	cat gtg GCG GCG CCA GCG AAT CAC CAC AAT TTT CCA GCG GCG CAT ggt taa ttt ctc ctc ttt aat g
Tet026 sense	aat tca tta aag agg aga aat taa ccA TGT GGA TTG TGG TGA TTT GGC GCC GCA AAC GCC GCC GCc a
Tet026 antisense	cat gtg GCG GCG GCG TTT GCG GCG CCA AAT CAC CAC AAT CCA CAT ggt taa ttt ctc ctc ttt aat g
GFP_TEV_EcoRI-fwd	AGC gaa ttc CGA TCA TGA GTA AAG GAG
GFP_TEV-EcoR1-rev	AGC gaa ttc GCC CTG AAA ATA CAG GTT TTC GCC TTT GTA TAG TTC ATC
GFP_QC_fwd	CTA CCT GTT CCT TGG CCA ACA CTT GTC ACT AC
GFP_QC_rev	GTA GTG ACA AGT GTT GGC CAA GGA ACA GGT AG

Eco_GFP_QC fwd	CAC ACA GAG TTC CGA TCA TGA GTA AAG GAG
Eco_GFP_QC rev	CTC CTT TAC TCA TGA TCG GAA CTC TGT GTG
Tet009_MW_fwd	PHO-CGC CGC TGG AAA ATT GTG
GFP_MW_rev	PHO-GCC CTG AAA ATA CAG GTT TTC
Tet026_MW_fwd	PHO-TGG ATT GTG GTG ATT TGG CG
Tet008 sense	aat tca tta aag agg aga aat taa cca TGC GCC GCT GGC GCA TTG TGG TGA TTC GCG TGC GCC GCc a
Tet008 antisense	cat gtg GCG GCG CAC GCG AAT CAC CAC AAT GCG CCA GCG GCG CAT ggt taa ttt ctc ctc ttt aat g
Tet008_MW_fwd	PHO-CGC CGC TGG CGC ATT
Tet125 sense	aat tca tta aag agg aga aat taa cca TGA AAC GCT GGT GGA AAT GGA TTC GCT GGc a
Tet125 antisense	cat gtg CCA GCG AAT CCA TTT CCA CCA GCG TTT CAT ggt taa ttt ctc ctc ttt aat g
Tet125_MW_fwd	PHO-AAA CGC TGG TGG AAA TGG ATT
AN3688_5' fwd	GTA ACG CCA GGG TTT TCC CAG TCA CGA CGC GTG CTA GGA CAA AGT AGA C
AN3688_3' rev	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA GCG TCT GTC TAT CCC AGT GTT G
AN7697 5' fwd	GTA ACG CCA GGG TTT TCC CAG TCA CGA CGG ACT TCA GCC TCT CGT ATG
AN7697_3' rev	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA GCG GCT AAC AAG TCT AAC CGA C
Af_pyrG_end_fwd	GCA TCA GTG CCT CCT CTC AGA C
SrrA_check_rev	GGA TTG AGA TTC CTG GAG CTG G
SskA_check_rev	CAT ACC TCC TAA CAG GAG AC
SrrA_Sonde_fwd	GCG GAG ATA TAC CTA GCA GAG
SrrA_Sonde_rev	CAC TTG TAG AGT TTG CGA ACC
SskA_Sonde_fwd	CAC ATC CTT TAG CAC TCA GTC
SskA_Sonde_rev	GAA TAC CCA TAC AAG GCA AAG G
Histon2B_RT fwd	CTG CCG AGA AGA AGC CTA GCA C
Histon2B_RT rev	GAA GAG TAG GTC TCC TTC CTG GTC
AN2911_RT fwd	GTC GCT TCG ATC ACA TCA CCT GC

AN2911_RT rev	CGC AAG CAT AGC AGG ACT CAG G
AN6792_RT fwd	CCG TGG AGT CAG CTG TAT CAA GG
AN6792_RT rev	GCA ACC TCA GGC GCA ATG TTC G
AN6642_RT fwd	GAG TCG TCA TCG GCA CAG GAA TG
AN6642_RT rev	CCA ACG CTT CTT GGT CTC ACC TC
AN8339_RT fwd	GAG TGG CAA GAC AGA GGA TGT CG
AN8339_RT rev	GAA CCG CCA GGG ATC AGA CTA G
AN2792_RT fwd	CAA AGC TAC ATT CAA GGC CAG CAC C
AN2792_RT rev	GAA CGC TGC ACC AAA TAT AAA CGC C
AN7794_RT fwd	CGA GCC CGA CTA CAA GAA GGA C
AN7794_RT rev	CCT CCA TCT CGT GTG TCT GCT G
AN2312_RT fwd	GAC CCG TCA TAC CAG CCA GTT C
AN2312_RT rev	GCA TGG TCC CGT ATC CTC TTT GG
SwoM_KpnI fwd	TAg gta cCA TGC CTT CCT TCT CTC AAG C
SwoM_AscI rev	TAg gcg cgc cCG CAA GCT TCG CCT TCT TC
RodA_rev	GTT AAT TAA TTA GAG GAT GGA GCC AAG GGC AAC GC

4.3. Insertion von Peptiden via Primerligation

Die antimikrobiellen Peptide (AMPs) wurden an den N-Terminus des *yaaD* fusioniert. Dazu wurden *Primer* synthetisiert, die die Sequenzen der Peptide enthalten, und HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) aufgereinigt. Das *yaaD*-Gen *downstream* des Peptides bleibt im Leseraster. Beide *Primer* eines Peptides wurden in PCR-Puffer bei 95 °C für eine Minute inkubiert und anschließend auf RT herunter gekühlt, um die Doppelstrangbildung zu ermöglichen. Der Vektor pBASF 2 wurden mit *EcoRI* und *NcoI* verdaut. Anschließend wurden die Vektor-Banden aus dem Agarosegel mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch, Freiburg) aufgereinigt und mit den doppelsträngigen Oligonukleotiden ligiert.

4.4. Site-directed Mutagenesis

Für die Herstellung von Konstrukten mit veränderter Sequenz wurde das QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von der Firma Stratagene (Abbildung 41) verwendet. Es wurden *Primer* erstellt, welche die gewünschte Mutation enthielten. Damit wurde eine PCR auf ein bereits vorhandenes Plasmid, welches das zu verändernde Sequenz enthielt, durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit *DpnI* verdaut, um das methylierte Ausgangsplasmid ohne Mutation zu verdauen, so dass nur das Plasmid mit der eingebauten Mutation erhalten bleibt. Der PCR-Ansatz wurde anschließend für eine *E. coli* Transformation verwendet. Die erhaltenen Kolonien wurden auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids getestet. Das Plasmid wurde isoliert und anschließend zum Sequenzieren zur Firma MWG geschickt, wodurch die Integration der Mutation bestätigt wurde.

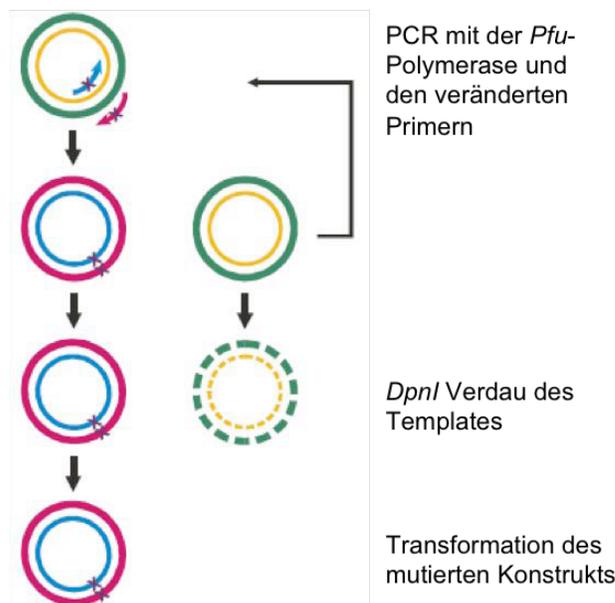


Abbildung 41: Überblick über den Ablauf der Site-directed Mutagenesis (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Instruction Manual). Für die Site-directed Mutagenesis werden Oligonukleotide mit veränderter Sequenz verwendet, um durch eine PCR Veränderungen in ein bereits bestehendes Plasmid einzubauen.

4.5. Insertion und Deletion von Domänen via Mutagenese-PCR

Zur Insertion bzw. Deletion von Domänen wurden *Primer* gewählt, die am 5`Ende ein Phosphatrest besitzen. Diese *Primer* setzten direkt an der zu verändernden

Sequenz an. Das gesamte Plasmid wird mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert und das methylierte Ausgangsplasmid wird mit DpnI verdaut. Durch die Phosphatreste am 5'Ende kann das neu amplifizierte Plasmid ligiert und mit *E. coli* TOP10 transformiert werden.

4.6. *E. coli* Transformation und Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Für die Transformation wurden chemisch-kompetente TOP10 Zellen verwendet. Die bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde für 90 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 Stunde bei 37 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert und im Anschluss auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Tabelle 9: Lösungen zur Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Lösung	Zusammensetzung je L
Puffer 1	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,01 % RNase
Puffer 2	0,2 M NaOH; 1 % SDS
TE	10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 mM EDTA; pH 8,0

Um Transformanten einer Klonierung zu testen, wurde eine Minipräparation durchgeführt. Die zu untersuchenden Kolonien wurden mit einem Zahnstocher in Glasröhrchen mit je 5 ml LB-Medium, mit entsprechenden Antibiotika, überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurde etwa 2 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde zum Abbau von Ribonukleinsäuren zunächst in 200 µl Puffer 1 resuspendiert. Die Alkalische Lyse der Zellen erfolgte mit 200 µl Puffer 2 und die Fällung der Proteine anschließend mit 200 µl 1,5 M Kaliumacetat pH 4,8 für 10 Minuten auf Eis. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 Minuten wurden Zelltrümmer und präzipitierte Proteine abgetrennt. Der Überstand der Zentrifugation wurde sauber

in ein neues Eppendorfggefäß überführt und die DNA mit 600 µl 100 % Isopropanol für 15 Minuten bei 13.000 rpm durch Zentrifugation pelletiert, anschließend einmal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen und bei 68 °C für ca. 10 Minuten im Heizblock gelöst. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend durch einen Restriktionsverdau überprüft. Um Plasmid-DNA im größeren Maßstab zu isolieren wurden Übernachtkulturen mit 50-100 ml Medium hergestellt. Zur Isolierung der DNA wurde ein Kit (Nucleobond AX100; *Macherey-Nagel*, Düren) verwendet. Die Konzentration und die Reinheit der präparierten DNA wurde durch Absorptionsmessungen bei 260/280 nm im Nanodrop- Spectrophotometer (Typ ND-100, Peqlab) bestimmt.

4.7. Hergestellte und verwendete Plasmide

Tabelle 10: Übersicht über hergestellte und verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pQE60	Expressionsvektor zur Aufreinigung via 6x His-Tag	Qiagen, Hilden
pBASF2	pQE60 + <i>yaaD</i> * (auf 40 AS verkürzt) + <i>dewA</i> + 6x His-Tag	(Wohlleben <i>et al.</i> , 2009)
pCMB17apx	Überexpression von Genen in <i>A. nidulans</i> mittels <i>alcA(p)</i> ; Fusion N-terminal mit <i>gfp</i> beim Einklonieren in die MCS, AmpR, <i>pyr4</i> -Marker	(Efimov <i>et al.</i> , 2006)
pDM8	GFP ersetzt durch <i>mRFP1</i> in pCMB17apx	(Veith <i>et al.</i> , 2005)
pTT07	<i>alcA(P)</i> ersetzt durch den natürlichen Promotor mit Signalpeptid von <i>rodA</i> in pDM8, <i>rodA</i> (ohne Signalpeptid) kloniert über <i>AscI</i> + <i>PacI</i>	Throm, 2011
pLW004	<i>mRFP1</i> durch <i>mutA</i> ersetzt in pTT07	Winandy, 2012
pBG01	pBASF2 + Tet009 und pREP4	diese Arbeit
pBG02	pBASF2 mit <i>gfp</i> und TEV kloniert über <i>EcoRI</i> -	diese Arbeit

	Schnittstellen	
pBG03	NcoI-Schnittstelle aus <i>gfp</i> in pBG02 durch <i>site-directed mutagenesis</i> zerstört	diese Arbeit
pBG04	EcoRI-Schnittstelle am N-Terminus von <i>gfp</i> in pBG03 durch <i>site-directed mutagenesis</i> zerstört	diese Arbeit
pBG05	Tet009 in pBG04 durch EcoRI und NcoI kloniert	diese Arbeit
pBG06	Tet026 in pBG04 durch EcoRI und NcoI kloniert	diese Arbeit
pBG07	Deletion von Linker zwischen Tet009 und <i>gfp</i> -TEV über Mutagenese-PCR in pBG05	diese Arbeit
pBG08	Deletion von Linker zwischen Tet026 und <i>gfp</i> -TEV über Mutagenese-PCR in pBG06	diese Arbeit
pBG09	Tet008 in pBG04 durch EcoRI und NcoI kloniert	diese Arbeit
pBG10	Tet125 in pBG04 durch EcoRI und NcoI kloniert	diese Arbeit
pBG11	Deletion von Linker zwischen Tet008 und <i>gfp</i> -TEV über Mutagenese-PCR in pBG09	diese Arbeit
pBG12	Deletion von Linker zwischen Tet125 und <i>gfp</i> -TEV über Mutagenese-PCR in pBG10	diese Arbeit
pBG13	<i>mRFP1</i> durch <i>swoM</i> ersetzt in pTT07	diese Arbeit

4.8. Herstellung von Protoplasten und Transformation von *A. nidulans*

Für die Transformation wurden 500 ml Medium in einem 1 L Kolben mit Sporen eines zu transformierenden *A. nidulans* Stammes beimpft. Der Stamm wurde etwa 12 Stunden bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Das gebildete Myzel wurde über einen Trichter mit sterilem Miracloth abfiltriert und mit 200 ml Myzel-Waschlösung gewaschen. In einen 100 ml Kolben wurde 1 g Myzel gefüllt und mit 5 ml Osmotischem Medium versetzt. Nach Zugabe von 1 ml Glucanexlösung (240 mg/ml) und 500 µl Albuminlösung (10 mg/ml) wurde die Lösung für 90 Minuten bei 30 °C

und 100 rpm inkubiert. Die Protoplasten-Suspension wurde in einen 50 ml Falcon überführt, mit 10 ml *Trapping*-Buffer überschichtet und 18 Minuten bei 5.000 rpm und 4 °C im Ausschwingrotor (Universal 320R von Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Die gebildete Interphase mit den Protoplasten wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen, in ein neues *Falcon* überführt und mit 10 ml STC versetzt. Die Suspension wurde bei 7.000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und das Protoplastenpellet wurde in 200-500 µl STC resuspendiert. Für jede Transformation wurden 100 µl Protoplastensuspension mit 5 – 10 µg DNA (gelöst in 100 µl STC) vermischt und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurden 2 ml PEG dazugegeben und für weitere 25 Minuten inkubiert. Zum Schluß wurden 8 ml STC hinzugegeben und die Suspension auf MM-Platten mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren und 0,6 M KCl, zur Regeneration der Protoplasten, verteilt. Nach drei Tagen Inkubationszeit bei 30 °C wurden die ersten Transformanten sichtbar.

Tabelle 11: Lösungen zur Herstellung von Protoplasten und Transformation von *A. nidulans*

Lösung	Zusammensetzung
Myzel-Waschlösung	0,6 M MgSO ₄
Osmotisches Medium	1,2 M MgSO ₄ ; 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer; pH 5,8
Trapping Buffer	0,6 M Sorbitol; 0,1 M Tris-HCl; pH 7,0
STC	1,2 M Sorbitol; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl; pH 7,5
PEG	60 % PEG 4000; 10 mM CaCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl; pH 7,5

4.9. PCR mit intakten Sporen (Sporen-PCR)

Es wurden frische Sporensuspensionen in 100 µl dH₂O hergestellt, für 15 Minuten bei -80 °C gefroren, im Anschluß 3 Minuten auf 100 °C erhitzt und gevortext, um die Sporen zu zerstören. Für die PCR wurden 4 µl der Sporensuspension und 0,5 µl *Taq*-Polymerase in einem 10 µl Ansatz eingesetzt.

4.10. Präparation von genomischer DNA aus *A. nidulans*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *A. nidulans* wurden Petrischalen mit etwa 20 ml Medium befüllt, mit Sporen beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die über Nacht gebildete Kahmhaut wurde geerntet, zwischen Papierhandtüchern durch pressen getrocknet und unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Das fein gemörserte Myzel wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 1 ml Extraktionspuffer (50 mM EDTA; 0,2 % SDS) versetzt und bei 68 °C für 1-2 Stunden inkubiert. Durch Zugabe von 60 µl einer 8 M Kaliumacetatlösung (pH 4,2) und 5 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proteine gefällt und durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Die isolierte genomische DNA wurde in 30 bis 50 µl TE-Puffer gelöst.

4.11. Southern Blot

Tabelle 11: Lösungen für einen Southern Blot

Lösung	Zusammensetzung
0,25M HCl	72 ml 37 % Salzsäure (HCl) ad 1L ddH ₂ O
DENAT	1,5 M NaCl; 0,4M NaOH
RENAT	1,5 M NaCl; 282 mM Tris-HCl; 218 mM Tris-Base
20x SSC	13 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; pH 7,0
Southern Hybridisierungs Puffer	0,5 M Na-Phosphat Puffer, pH 7,0; 7 % SDS
1M Na-Phosphat Puffer	1 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 1 M NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O; pH 7,0
20x SSPE	3 mM NaCl; 227 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 20 mM Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O; pH 7,4
DIG1 (1x)	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5
DIG Wash (1x)	0,3% (v/v) Tween-20 in DIG1
DIG2 (1x)	5% (w/v) Milchpulver in DIG1

DIG3 (1x)	0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl ₂ x 6H ₂ O; pH 9,5
CDP-Star Lösung	100 µl CDP-Star in 10 ml DIG3 (1:500)

Für die Durchführung eines *Southern Blots* wurden DIG markierte Sonden mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche (Mannheim), nach Angaben des Herstellers, hergestellt. Über Nacht wurde die genomische DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA wurde bei 80 Volt aufgetrennt und der Marker anschließend mit Hilfe einer Pipettenspitze im Gel markiert.

Das Gel wurde mit 0,25 M HCl für 20 Minuten gewaschen und anschließend mit H₂O gespült. Hinterher wurde das Gel für jeweils 20 Minuten in DENAT und in RENAT gewaschen und der Blot wurde aufgebaut (Abbildung 42). Es wurde mindestens 2 Stunden oder auch über Nacht geblottet. Nach dem Abbau des Blots wurde der Marker auf der Nylonmembran gekennzeichnet und die Membran 5-10 Minuten antrocknen gelassen. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (0,120 mJ) auf der Nylonmembran fixiert, woraufhin die Membran für 15-30 Minuten mit dem *Southern* Hybridisierungs Puffer bei 65 °C prähybridisiert wurde. Das PCR-Produkt der DIG- markierten Sonde wurde für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und zu 15 ml vorgewärmtem *Southern* Hybridisierungs Puffer gegeben. Diese Lösung wird auf die Membran gegeben und für mindestens 6 Stunden oder über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungssofen belassen. Die Sonde wurde entfernt, bei -20 °C gelagert und konnte mehrmals wiederverwendet werden. Die Membran wurde jeweils für 15 Minuten bei 65 °C mit 2 x SSPE mit 0,1 % SDS, 1 x SSPE mit 0,1 % SDS und 0,1 x SSPE mit 0,1% SDS und anschließend mit DIG Wash für 5 Minuten bei 25 °C gewaschen. Im weiteren Verlauf wurden alle Schritte bei 25 °C durchgeführt. Es folgte die Inkubation der Membran für 30 Minuten in DIG2 und für eine Stunde mit der Anti-DIG Antikörper Lösung (1:5000 in DIG 2). Die Membran wurde danach zweimal für 15 Minuten mit DIG Wash gewaschen und für 5 Minuten mit DIG 3 inkubiert. Zur Detektion der Sonde wurde die Membran in 10 ml CDP-Star Lösung

inkubiert und in Klarsichtfolie gehüllt. Die Signale auf der Membran wurden mit Hilfe des Chemi-Smart Chemilumineszenzsystem (PeqLab, Erlangen) detektiert.

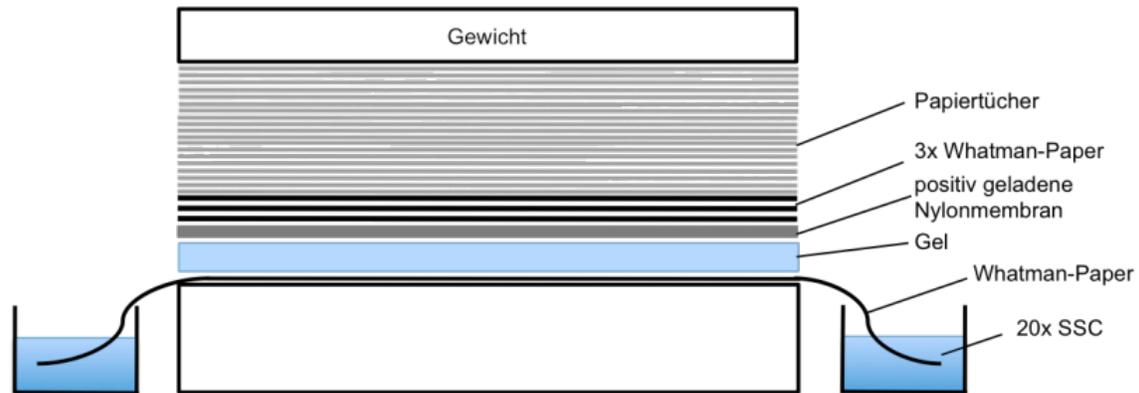


Abbildung 42: Schematische Darstellung des Aufbaus eines *Southern-Blots*.

4.12. RNA Isolation

Das in Erlenmeyerkolben gefüllte Medium wurde mit Sporen beimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zur Isolierung von RNA mit AMPs induziert und unbehandelt wurde ein Teil der Sporen für 20 Minuten mit AMPs behandelt. Direkt nach der AMP-Behandlung wurden die Sporen in flüssigem Stickstoff gemörsert, in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 1 ml TRI Reagent versetzt, gevortext und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Alle anschließenden Schritte erfolgten bei 11.500 rpm und 4 °C. Nach der Inkubation auf Eis wurde 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde 15 Sekunden gevortext und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurde erneut 15 Minuten zentrifugiert, wonach die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben wurde. Zu dieser Suspension wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und gevortext. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten, wonach erneut die obere Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert wurde. Dieser Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, gut gemischt und 10 Minuten zentrifugiert. Wieder wurde die obere Phase in ein neues

Eppendorfggefäß gegeben und die RNA durch Zugabe von 0,25 ml Na-Citrat/NaCl (0,8 M Tri-Natrium-Citrat; 1,2 M NaCl) und 0,25 ml 100 % Isopropanol für 30 Minuten auf Eis gefällt. Nach der Fällung wurde fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren von fünf Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet 10 - 15 Minuten bei RT luftgetrocknet und in 150 µl DEPC-Wasser (1 ml DEPC/L ddH₂O) gelöst. Dazu wurde die RNA mehrmals auf 65 °C erwärmt und gevortext. Die gelöste RNA wurde dann 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführt, die Konzentration mittels Nanodrop-Spektrophotometer gemessen und bei -80 °C eingefroren.

4.13. Quantitative *Real Time* RT-PCR

Für die quantitative Real Time PCR wurde das iScript one Step RT-PCR Kit SYBR Green und der iCycler von Bio-Rad verwendet. Es wurden 20 µl Ansätze mit 5 µM Primern und 100 ng RNA eingesetzt. Als Haushaltsgen wurde HistonB verwendet. Für die Analyse der Ergebnisse wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Es wurden je drei biologische und zwei technische Replikate benutzt.

5. Biochemische Methoden

5.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Alle Komponenten und Puffer für die SDS-PAGE wurden wie in Sambrook & Russel (Appendix 8; Gele auf Seite A8.43; Sambrook & Russell, 2000) beschrieben, hergestellt. Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden SDS-Gele mit unterschiedlichem Anteil an Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1), *Roth*) vorbereitet. Üblicherweise wurde ein 12 %iges Gel verwendet. Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandards wurden Roti-Mark Standard Prestained (*Roth*) und PAGE Ruler Prestained (*Fermentas*) benutzt. Zum Anfertigen der Polyacrylamidgele und zur Gelelektrophorese wurde das „Mini Protean“ System von *Bio-Rad* (München) verwendet. Anschließend wurde das Gel für einen *Western Blot* verwendet oder

mittels Coomassie gefärbt. Bei einer Coomassie-Färbung wurde das SDS-Gel für mindestens 30 Minuten in der Färbelösung inkubiert und im Anschluss für mehrere Stunden entfärbt, wobei der Entfärber ein- bis zweimal erneuert wurde. Bis zur vollständigen Hintergrund-Entfärbung wurde das Gel mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen. Alle Schritte wurden auf einem Schütteltisch durchgeführt.

Tabelle 12: Lösungen zur SDS-Page

Lösung	Zusammensetzung
Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS
4-fach SDS-Ladepuffer	200 mM Tris-HCl (pH 6,8); 400 mM DTT; 8 % SDS; 0,4 % Bromphenolblau; 40 % Glycerol
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Serva Blue R; 45 % Ethanol; 10 % Essigsäure
Entfärber	20 % Ethanol; 10 % Essigsäure

5.2. Western Blot

Western-Blots wurden mit Tank-Blotting-Apparaturen von BioRad durchgeführt. Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine PVDF-Membran (A. Hartenstein) oder Nitrocellulosemembran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman®, Dassel) bei 30 V über Nacht bei 4°C oder bei 100 V für eine Stunde. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen auf der Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocking-Lösung inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit dem Primärantikörper in Blocking-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Ungebundene Antikörper wurden anschließend in drei Waschschritten für je 10 Minuten mit TBS-T abgespült und die Membran mit dem an eine Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten für je 10 Minuten wurde die Immundetektion am Chemi-Smart Chemilumineszenzsystem (PepLab) durchgeführt.

Tabelle 13: Lösungen zum *Western Blot* und Immundetektion

Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	20 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol
PonceauS	3 % Trichloressigsäure; 3 % Sulfanilsalicylsäure; 0,2 % PonceauS
TBS-T(ween-Lösung)	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20
Blocking-Lösung	5 % Magermilchpulver in TBS-T
Luminol	1 ml Lösung A (50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6) 0,1 ml Lösung B (11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO) 0,3 µl 35 % H ₂ O ₂

Tabelle 14: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-GFP, N-terminal; aus Kaninchen	<i>Sigma-Aldrich</i> ; (#G1544)
Anti-His monoclonal antibody (IgG2a); aus Maus	<i>GE Healthcare, Thermo Scientific</i>
Anti-Mouse IgG <i>peroxidase conjugate</i> ; aus Ziege	Sigma (#A-2304)
Anti-Rabbit IgG <i>peroxidase conjugate</i> ; aus Ziege	Sigma (#A-0545)

5.3. *Dot Blot*

Um die Expression der Peptid-Hydrophobin-Fusionsproteine nachzuweisen wurde ein *Dot Blot* durchgeführt. Dafür wurde eine Nitrocellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert, in die *Dot Blot*-Apparatur eingespannt und diese unter Vakuum gesetzt. Es wurden jeweils 30 µl der Probe punktförmig aufgetragen und für einige Minuten einziehen lassen. Die Membran wurde im Anschluss mit Blockingpuffer versetzt. Alle weiteren Schritte wurden wie nach dem *Western Blot* Protokoll durchgeführt.

5.4. Proteinexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

Für Proteinexpressionen wurde der *E. coli*-Stamm M15 oder Rossetta (*DE3*)*pLysS* frisch mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert und die so erzeugten Kolonien bis zu vier Wochen verwendet. Für jede neue Kultivierung wurde mit einer frischen Kolonie beimpft. Für eine Vorkultur wurde LB-Medium (plus Selektionsantibiotikum) mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Hauptkultur (meist 0,5 L in 2 L-Erlenmeyerkolben) wurde dann mit einem zwanzigstel Volumen (25 ml) aus der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde etwa 2 - 3 Stunden bei 37 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ~ 0,8 geschüttelt. Durch Zugabe von 0,5 - 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert und die Expression über Nacht durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 8.000 rpm, 4° C für 30 Minuten (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor) geerntet. Das Pellet wurde, falls nicht gleich verwendet, bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Für den nächsten Schritt wurde das Gewicht des Zellpellets aus Expressionskultur ermittelt und pro Gramm Biofeuchtmasse (BFM) 1 ml 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,5 zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte unter Kühlung an einer *French Pressure Cell Press* (Aminco, USA) mit einer Druckeinstellung von 800 PSI (*Pound-force per square inch* = Pfund pro Quadratzoll), dies entspricht ca. 55 bar. Durch anschließende Zentrifugation für 30 Minuten bei 10.000 rpm, 4 °C (GSA-Rotor) wurde mit dem Überstand der Protein-Gesamtextrakt gewonnen.

5.5. Schnelltest auf Proteinexpression in *E. coli*

Sollte ein neu hergestelltes Expressionskonstrukt in *E. coli* exprimiert werden, wurde zunächst in einem kleineren Maßstab getestet. Für solch einen Schnelltest wurde der Zellaufschluss ausgehend von 50 ml Hauptkultur. Die Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,7 mit 0,5 mM IPTG induziert. Alle Kulturen wurden anschließend für vier bis sechs Stunden bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die OD₆₀₀ (als 1:10-Verdünnung) ermittelt und eine BFM, die einer OD₆₀₀ von 1/ml entspricht, abzentrifugiert. So wurde gewährleistet, dass bei vergleichenden Ansätzen überall von der gleichen BFM ausgegangen werden

konnte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für fünf Minuten, 4°C gewonnen. Die Zellpellets wurden für mindestens 20 Minuten bei -20 °C eingefroren und anschließend mit 50 µl H₂O versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte am Ultraschallgerät (Labsonic M; *B. Braun Biotech International*, Melsungen), wobei pro Ansatz viermal eine Minute (2 Sekunden Pulse/eine Minute Pausen, Amplitude 70%) im Kühlblock gepulst wurde. Für die SDS-PAGE wurden 4x Ladepuffer zugegeben und ~ 5 µl geladen.

5.6. Heterologe Expression und Aufreinigung von H* Protein B - Fusionsproteinen

Die Expression der DewA-Peptid-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* M15 oder Rossetta (*DE3*)*pLysS* in EC3-Medium mit Ampicillin (und Kanamycin bei *E. coli* M15). Die Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 - 0,9 mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG für vier bis sechs Stunden oder über Nacht bei 37 °C induziert. Um die Zellen zu ernten, wurde 30 Minuten bei 8.000 rpm zentrifugiert und die BFM wurde, falls nicht direkt weiterverarbeitet, bei -20 °C gelagert.

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte durch Abtrennung und Reinigung der IBs. Das Zellpellet aus der 0,5 L-Kultur wurde in 10 ml/g BFM 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,5 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter Kühlung an der *French Pressure Cell Press*. Anschließend wurden alle Zentrifugationsschritte in einem 50 ml-Reaktionsgefäß bei 5.000 rpm, 30 Minuten, 4 °C durchgeführt, um die IBs von den Zelltrümmern und den löslichen Proteinen abzutrennen. Zunächst wurde die gleiche Menge an 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,5 zum Pellet zugegeben, resuspendiert und wieder durch Zentrifugation pelletiert. Als nächstes wurde ca. 40 ml ddH₂O zum Pellet zugegeben, dieses gelöst und wieder zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Um die IBs aufzuschließen wurde nun das übrig gebliebene Pellet gewogen und mit ~ 10 % (Pellet-Gewicht) ddH₂O resuspendiert. Dazu wurde 0,1 M NaOH gegeben (111 µl in 10 ml) und 20 Minuten auf dem Magnetrührer gemischt. Dies diente zur Solubilisierung der IBs. Mit 20 % H₃PO₄ wurde dann ein pH von 8,5 -

9 eingestellt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Diesmal befand sich das Protein im Überstand. Dieser wurde nach Abnahme einer Probe gefriergetrocknet.

5.7. Microtiter screening Assay

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der AMPs aber auch anderer Substanzen wurde der Indikatorfarbstoff Resazurin eingesetzt. Resazurin kann pH-Wert Veränderungen und Redoxreaktionen anzeigen. Der ungiftige wasserlösliche blaue Farbstoff wird bei Reduktion irreversibel zu rosafarbenem fluoreszierendem Resorufin umgesetzt. Durch metabolisch aktive Zellen wird Resazurin zu Resorufin reduziert. Die hierbei entstehende Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen.

Es wurde entweder eine Aspergillus-Sporensuspension von 10^4 Sporen pro $10 \mu\text{l}$ oder eine Bakteriensuspension von etwa $\text{OD}_{600} 0,1$ eingesetzt. Das Wachstumsmedium wurde mit Resazurin versetzt, so dass eine $100 \mu\text{M}$ Lösung entsteht. Von diesem Resazurin-Medium wurde pro Mulde einer Mikrotiterplatte $200 \mu\text{l}$ eingesetzt. Von den zu untersuchenden Substanzen wurde eine Stocklösung hergestellt, die 2,05-fach höher sein sollte als die erwünschte Höchstkonzentration in der Mikrotiterplatte. $200 \mu\text{l}$ der Peptid-Stocklösung wurde in die erste Mulde einer Reihe geben und gründlich gemischt. Aus der ersten Mulde wurden $200 \mu\text{l}$ in die zweite pipettiert und wiederum gut durchgemischt. Die Verdünnung wurde bis zur letzten Mulde der Reihe durchgeführt und die letzten $200 \mu\text{l}$ verworfen. Im Anschluss wurden $10 \mu\text{l}$ der Sporenlösung pro Mulde zugegeben und die Platte über Nacht inkubiert.

5.8. Oberflächenbeschichtung mit rekombinanten Fusions-Hydrophobinen

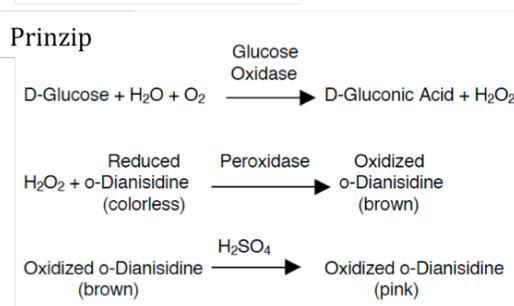
Die Beschichtung wurde in Anlehnung an Rieder *et al.* (2010) durchgeführt. Es wurden Mikrotiterplatten oder Glasoberflächen (Kalk-Natron-Silikat Glas, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Diese wurden mit 70 % Ethanol gereinigt und für 1, 2 oder 16 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ oder $80 \text{ }^\circ\text{C}$ in der Hydrophobin-

lösung inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen dreimal für 10 Minuten mit ddH₂O gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die beschichteten Oberflächen wurden zur Untersuchung der Biofilmbildung auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen eingesetzt.

5.9. Test auf enzymatische Aktivität immobilisierter Enzyme

Zum Test der enzymatischen Aktivität der an die Sporenoberflächen immobilisierten Enzyme MutA und SwoM wurden zunächst Sporensuspensionen der Transformanten hergestellt (siehe Material und Methoden 3.3.). Um Mutan und Fruktose im Test einsetzen zu können, wurden diese zuerst vorbereitet. 10 mg Mutan und 80 mg Fruktose wurden in 1 ml 50 mM Natriumacetatpuffer (pH= 5,5) gelöst und für 2 Stunden bei 37 °C quellen gelassen. Abschließend wurden die Lösungen für 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und 100 µl vom Überstand zusammen mit 300 µl Sporensuspension inkubiert. Die Glukosefreisetzung wurde mittels Glukose-Messstreifen (Diabur-Test® 5000, Roche) oder des *Glucose (GO) Assay Kit* (Sigma-Aldrich, Seelze) gemessen. Dabei wird die Glukose zunächst mit Hilfe der Glukoseoxidase (GOD) zu Glukonolacton oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid (H₂O₂) entsteht. Das H₂O₂ wird durch eine Peroxidase zu zwei Wassermolekülen reduziert und ein Farbstoff oxidiert. Die Umsetzung des Farbstoffes wird entweder auf den Teststreifen direkt oder durch Messung der Extinktion bei OD₅₄₀ gemessen (Abbildung 43). Die Durchführung der Messung und der Eichgeraden erfolgte nach Herstellerangaben.

a) **Glucose (GO) Assay Kit**



b)

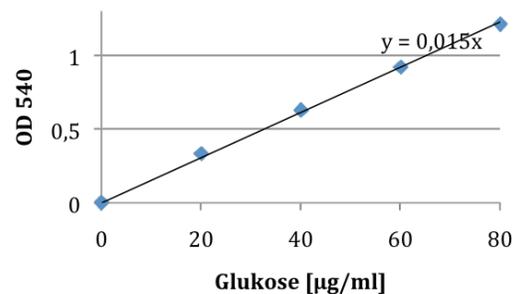


Abbildung 43: Glukosenachweis durch das *Glucose (GO) Assay Kit* (Sigma-Aldrich). a) Prinzip der Reaktion nach Herstellerangaben. b) Durchführung einer Eichgeraden nach Herstellerangaben.

Mit Hilfe der Steigung ließ sich die Glukose-Konzentration in der Testlösung ermitteln.

Die Aktivitäten wurden für unterschiedliche Temperaturen (30 °C bis 80 °C), unterschiedliche Sporenkonzentrationen (10^7 bis 10^8) und unterschiedliche pH - Werte (pH 4,5 bis pH 8,5) ermittelt. Zur Ermittlung des optimalen pH - Wertes wurden sowohl die Sporen- als auch die Zuckerlösungen in Puffern mit den zu testenden pH - Werten hergestellt. Für die pH - Werte von pH 4,5 bis pH 7,5 wurden Zitronensäure-Phosphat Puffer nach McIlvaine und für pH 8,5 wurde ein 20 mM Glycin-NaOH Puffer eingesetzt (Pleszczyńska *et al.*, 2012).

Tabelle 15: Puffer zur Bestimmung des optimalen pH - Wertes von Enzymen

Puffer	Zusammensetzung je L Puffer
Zitronensäure-Phosphat Puffer	Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure x H ₂ O; Stammlösung B: 28,39 g Na ₂ HPO ₄
20 mM Glycin Puffer	1,5 g Glycin; pH mit 10 M NaOH eingestellt

6. Mikroskopie

Licht-mikroskopische und Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Mikroskop AxioImager Z.1 (Software: AxioVision V4.5) durchgeführt. Auswertungen wurden mit dem Programm ImageJ *Cell Counter* gemacht.

6.1. Live/Dead Färbung von Biofilmen

Tabelle 16: Lösung zur Live/Dead Färbung

Lösungen	Zusammensetzung
Zellwaschpuffer	5 mM Mg-Acetat; 10 mM Tris; pH 8.0

Zur Färbung von Bakterien und Biofilmen direkt auf Oberflächen wurden der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Syto9 und Propidiumiodid verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Zellwaschpuffer gewaschen um lose adhärierte Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die Arbeitslösung direkt auf die Oberflächen gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde vorsichtig mit Zellwaschpuffer abgespült und die

Oberflächen im Dunkeln trocknen gelassen. Die Proben konnten nun entweder trocken mit einer 10- bis 20-fachen Vergrößerung mikroskopiert werden oder es wurde das Anti-Fading Reagenz Citifluor aufgetropft und ein Deckglas aufgelegt und mit einer 63er Vergrößerung mikroskopiert.

VI Literatur

- ADAMS, T. H., WIESER, J. K. AND YU, J-H (1998). Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *MMBR* 62, 35-54.
- AIMANIANDA, V., BAYRY, J., BOZZA, S., KNIEMEYER, O., PERRUCCIO, K., ELLURU, S. R., CLAVAUD, C., PARIS, S., BRAKHAGE, A. A., KAVERI, S. V., *et al.* (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460, 1117-1121.
- ANDERL, J. N., ZAHLLER, J., ROE, F., und STEWART, P. S. (2003). Role of Nutrient Limitation and Stationary-Phase Existence in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 1251-1256.
- ANDREU, D., und RIVAS, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415-433.
- AOKI, T., TAHARA, T., FUJINO, H., und WATABE, H. (2002). "GFP-Display," an Easy Detection Method for Single Amino Acid Changes in a Target Polypeptide: Application to Random Mutagenesis. *Analytical Biochemistry* 300, 103-106.
- BAE, W., CHEN, W., MULCHANDANI, A., und MEHRA, R. K. (2000). Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatins. *Biotechnol Bioeng* 70, 518-524.
- BAE, W., MULCHANDANI, A., und CHEN, W. (2002). Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 88, 223-227.
- BAGHERI, M., KELLER, S., und DATHE, M. (2010). Interaction of W-Substituted Analogs of Cyclo-RRRWWF with Bacterial Lipopolysaccharides: the Role of the Aromatic Cluster in Antimicrobial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 788-797.
- BASHEVA, E. S., KRALCHEVSKY, P. A., CHRISTOV, N. C., DANOV, K. D., STOYANOV, S. D., BLIJDENSTEIN, T. B. J., KIM, H.-J., PELAN, E. G., und LIPS, A. (2011). Unique Properties of Bubbles and Foam Films Stabilized by HFBII Hydrophobin. *Langmuir* 27, 2382-2392.
- BAYRY, J., AIMANIANDA, V., GUIJARRO, J. I., SUNDE, M., und LATGE, J. P. (2012). Hydrophobins--unique fungal proteins. *PLoS Pathog* 8, e1002700.
- BEEVER, R. E., REDGWELL, R. J., und DEMPSEY, G. P. (1979). Purification and Chemical Characterization of the Rodlet Layer of *Neurospora crassa* Conidia. *Journal of Bacteriology* 140, 1063-1070.
- BHOSALE, S. H., RAO, M. B., und DESHPANDE, V. V. (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* 60, 280-300.
- BHUSHAN, B. (2012). Bioinspired Structured Surfaces. *Langmuir* 28, 1698-1714.
- BINNING, G., QUATE, C. F., und GERBER, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56, 930-933.

- BIXLER, G. D., und BHUSHAN, B. (2012). Biofouling: lessons from nature. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 370, 2381-2417.
- BLOCH, K. E. (1983). Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* 14, 47-92.
- BODER, E. T., und WITTRUP, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 15, 553-557.
- BOEUF, S., THROM, T., GUTT, B., STRUNK, T., HOFFMANN, M., SEEBACH, E., MÜHLBERG, L., BROCHER, J., GOTTERBARM, T., WENZEL, W., *et al.* (2012). Engineering hydrophobin DewA to generate surfaces that enhance adhesion of human but not bacterial cells. *Acta Biomaterialia* 8, 1037-1047.
- BOMAN, H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 254, 197-215.
- BOMMARIUS, B., JENSSEN, H., ELLIOTT, M., KINDRACHUK, J., PASUPULETI, M., GIEREN, H., JAEGER, K. E., HANCOCK, R. E. W., und KALMAN, D. (2010). Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides* 31, 1957-1965.
- BOYLAN, M. T., MIRABITO, P. M., WILLETT, C. E., ZIMMERMAN, C. R., und TIMBERLAKE, W. E. (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 7, 3113-3118.
- BRAJTBURG, J., POWDERLY, W. G., KOBAYASHI, G. S., und MEDOFF, G. (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 34, 183-188.
- BROGDEN, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3, 238-250.
- BUTT, T. R., EDAVETAL, S. C., HALL, J. P., und MATTERN, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expression and Purification* 43, 1-9.
- CARPENTER, C. E., MUELLER, R. J., KAZMIERCZAK, P., ZHANG, L., VILLALON, D. K., und VAN ALFEN, N. K. (1992). Effect of virus on accumulation of a tissue-specific cell surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* 4, 55-61.
- CEVHER, E., ORHAN, Z., MULAZIMOGLU, L., SENSOY, D., ALPER, M., YILDIZ, A., und OZSOY, Y. (2006). Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 317, 127-135.
- CHAN, J., und WONG, S. (2010). *Biofouling types, impact and anti-fouling* (New York, Nova Science Publisher).
- CHARACKLIS, W., und MARSHALL, K. (1990). *Biofilms* (New York, John Wiley).

CLAESSEN, D. (2003). A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & Development* 17, 1714-1726.

COHEN, Y., und ROSENBERG, E., eds. (1989). *Microbial Mats. Physiological ecology of benthic microbial communities* (Washington).

CORVIS, Y., WALCARIUS, A., RINK, R., MRABET, N. T., und ROGALSKA, E. (2005). Preparing catalytic surfaces for sensing applications by immobilizing enzymes via hydrophobin layers. *Anal Chem* 77, 1622-1630.

COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G., und CHENG, K. J. (1978). How Bacteria Stick. *Scientific American* 238, 86-95.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., und LAPPIN-SCOTT, H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Reviews Microbiology* 49, 711-745.

DE BEER, D., STOODLEY, P., ROE, F., und LEWANDOWSKI, Z. (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 43, 1131-1138.

DE GROOT, P. W. J., BRANDT, B. W., HORIUCHI, H., RAM, A. F. J., DE KOSTER, C. G., und KLIS, F. M. (2009). Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 46, S72-S81.

DHILLON, J. K., DREW, P. D., und PORTER, A. J. R. (1999). Bacterial surface display of an anti-pollutant antibody fragment. *Letters in Applied Microbiology*, 350-354.

DONLAN, R. M. (2000). Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 46, S47-52.

DONLAN, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8, 881-890.

DONLAN, R. M., MURGA, R., BELL, M., TOSCANO, C. M., CARR, J. H., NOVICKI, T. J., ZUCKERMAN, C., COREY, L. C., und MILLER, J. M. (2001). Protocol for Detection of Biofilms on Needleless Connectors Attached to Central Venous Catheters. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 750-753.

DUBENDORFF, J. W., und STUDIER, F. W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219, 45-59.

EFIMOV, V. P., ZHANG, J., und XIANG, X. (2006). CLIP-170 Homologue and NUDE Play Overlapping Roles in NUDF Localization in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* 17, 2021-2034.

ESPELAND, E. M., und WETZEL, R. G. (2001). Complexation, Stabilization, and UV Photolysis of Extracellular and Surface-Bound Glucosidase and Alkaline Phosphatase: Implications for Biofilm Microbiota. *Microbial Ecology* 42, 572-585.

FINKELSTEIN, A., und HOLZ, R. (1973). Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *Membranes* 2, 377-408.

- FLEMMING, H.-C., und WINGENDER, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*.
- FLEMMING, H. C., WINGENDER, J., GRIEGBE, und MAYER, C. (2000). Physico-chemical properties of biofilms. In *Biofilms: recent advances in their study and control*, L. V. Evans, ed. (Amsterdam, Harwood Academic Publishers), pp. 19-34.
- FRANK, R. (1992). Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48, 9217.
- FURUKAWA, K., HOSHI, Y., MAEDA, T., NAKAJIMA, T., und ABE, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Molecular Microbiology* 56, 1246-1261.
- FURUKAWA, K., KATSUNO, Y., URAO, T., YABE, T., YAMADA-OKABE, T., YAMADA-OKABE, H., YAMAGATA, Y., ABE, K., und NAKAJIMA, T. (2002). Isolation and Functional Analysis of a Gene, *tcsB*, Encoding a Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase from *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5304-5310.
- FURUKAWA, K., YOSHIMI, A., FURUKAWA, T., HOSHI, Y., HAGIWARA, D., SATO, N., FUJIOKA, T., MIZUTANI, O., MIZUNO, T., KOBAYASHI, T., und ABE, K. (2007). Novel Reporter Gene Expression Systems for Monitoring Activation of the *Aspergillus nidulans* HOG Pathway. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 1724-1730.
- GAIKWAD, S. M., und DESHPANDE, V. V. (1992). Immobilization of Glucose isomerase on Indion 48-R. *Enzyme Microbial Technology* 14, 855-858.
- GARRIDO, J. M., VAN BENTHUM, W. A., VAN LOOSDRECHT, M. C., und HEIJNEN, J. J. (1997). Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol Bioeng* 53, 168-178.
- GENNARO, R., ZANETTI, M., BENINCASA, M., PODDA, E., und MIANI, M. (2002). Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr Pharm Des* 8, 763-778.
- GHIGO, J.-M. (2003). Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Research in Microbiology* 154, 1-8.
- GIACOMETTI, A., CIRIONI, O., BARCHIESI, F., PRETE, M. S. D., und SCALISE, G. (1999). Antimicrobial activity of polycationic peptides. *Peptides* 20, 1265-1273.
- GILBERT, P., ALLISON, D. G., und MCBAIN, A. J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, 98S-110S.
- GLINEL, K., JONAS, A. M., JOUENNE, T., LEPRINCE, J., GALAS, L., und HUCK, W. T. (2009). Antibacterial and antifouling polymer brushes incorporating antimicrobial peptide. *Bioconjug Chem* 20, 71-77.
- GLINEL, K., THEBAULT, P., HUMBLLOT, V., PRADIER, C. M., und JOUENNE, T. (2012). Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomaterialia* 8, 1670-1684.

GRÜNBACHER, A. (2011) Vergleichende Untersuchung von sechs Hydrophobinen in *Aspergillus nidulans*, Diploma, KIT Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe.

HAAS JIMOH AKANBI, M., POST, E., METER-ARKEMA, A., RINK, R., ROBILLARD, G. T., WANG, X., WÖSTEN, H. A. B., und SCHOLTMEIJER, K. (2010). Use of hydrophobins in formulation of water insoluble drugs for oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75, 526-531.

HAGIWARA, D., ASANO, Y., MARUI, J., FURUKAWA, K., KANAMARU, K., KATO, M., ABE, K., KOBAYASHI, T., YAMASHINO, T., und MIZUNO, T. (2007a). The SskA and SrrA Response Regulators Are Implicated in Oxidative Stress Responses of Hyphae and Asexual Spores in the Phosphorelay Signaling Network of *Aspergillus nidulans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 1003-1014.

HAGIWARA, D., ASANO, Y., MARUI, J., YOSHIMI, A., MIZUNO, T., und ABE, K. (2009). Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genetics and Biology* 46, 868-878.

HAGIWARA, D., MATSUBAYASHI, Y., MARUI, J., FURUKAWA, K., YAMASHINO, T., KANAMARU, K., KATO, M., ABE, K., KOBAYASHI, T., und MIZUNO, T. (2007b). Characterization of the Nika Histidine Kinase Implicated in the Phosphorelay Signal Transduction of *Aspergillus nidulans*, with Special Reference to Fungicide Responses. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 844-847.

HAHN, J., und HAUG, P. (1986). Traces of Archebacteria in ancient sediments. *Systematic and Applied Microbiology* 7, 178-183.

HAKANPÄÄ, J., PAANANEN, A., ASKOLIN, S., NAKARI-SETÄLÄ, T., PARKKINEN, T., PENTTILÄ, M., LINDER, M. B., und ROUVINEN, J. (2004a). Atomic Resolution Structure of the HFBII Hydrophobin, a Self-assembling Amphiphile. *Journal of Biological Chemistry* 279, 534-539.

HAKANPÄÄ, J., PARKKINEN, T., HAKULINEN, N., LINDER, M., und ROUVINEN, J. (2004b). Crystallization and preliminary X-ray characterization of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBII. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 163-165.

HAKANPÄÄ, J., SZILVAY, G., KALJUNEN, H., MAKSIMAINEN, M., LINDER, M., und ROUVINEN, J. (2006). Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBII--The structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Science* 15, 2129-2140.

HALE, J. D. F., und HANCOCK, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Reviews* 5, 951-959.

HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W., und STOODLEY, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2, 95-108.

HAMADA, S., OOSHIMA, T., FIJIWARA, T., MINAMI, T., und KIMURA, S. (1996). Development of Preventive Measures Based on the Aetiology of Dental Caries: A Review. *Microbial Ecology in Health and Disease* 9, 349-357.

- HANCOCK, R. E., und CHAPPLE, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1317-1323.
- HANCOCK, R. E., und LEHRER, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 16, 82-88.
- HANCOCK, R. E. W. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* 1, 156-164.
- HANCOCK, R. E. W. (2006). The end of an era? *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 28-28.
- HANCOCK, R. E. W., BROWN, K. L., und MOOKHERJEE, N. (2006). Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 211, 315-322.
- HANCOCK, R. E. W., und SAHL, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* 24, 1551-1557.
- HARDER, J. (2000). Isolation and Characterization of Human beta -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 276, 5707-5713.
- HAYNIE, S. L., CRUM, G. A., und DOELE, B. A. (1995). Antimicrobial Activities of Amphiphilic Peptides Covalently Bonded to a Water-Insoluble Resin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 301-307.
- HEKTOR, H. J., und SCHOLTMEIJER, K. (2005). Hydrophobins: proteins with potential. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 434-439.
- HELLIO, C., und YEBRA, D. M. (2009). *Advances in marine antifouling coatings and technologies* (Boca Raton, Florida, CRC Press).
- HELMANN, J. D., und MORAN, C. P. (2002). RNA Polymerase and sigma factors. In *Bacillus subtilis and its closest Relatives*, A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, und R. Losick, eds. (Washington D.C., ASM Press), pp. 289-312.
- HILPERT, K., ELLIOTT, M., JENSSEN, H., KINDRACHUK, J., FJELL, C. D., KÖRNER, J., WINKLER, D. F. H., WEAVER, L. L., HENKLEIN, P., und ULRICH, A. S. (2009). Screening and Characterization of Surface-Tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity. *Chemistry & Biology* 16, 58-69.
- HILPERT, K., HANSEN, G., WESSNER, H., SCHNEIDER-MERGENER, J., und HOHNE, W. (2000). Characterizing and optimizing protease/peptide inhibitor interactions, a new application for spot synthesis. *J Biochem* 128, 1051-1057.
- HILPERT, K., MCLEOD, B., YU, J., ELLIOTT, M. R., RAUTENBACH, M., RUDEN, S., BURCK, J., MUHLE-GOLL, C., ULRICH, A. S., KELLER, S., und HANCOCK, R. E. W. (2010). Short Cationic Antimicrobial Peptides Interact with ATP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 4480-4483.
- HILPERT, K., VOLKMER-ENGERT, R., WALTER, T., und HANCOCK, R. E. W. (2005). High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nature Biotechnology* 23, 1008-1012.

- HILPERT, K., WINKLER, D. F. H., und HANCOCK, R. E. W. (2007). Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols* 2, 1333-1349.
- HUMBLLOT, V., YALA, J.-F., THEBAULT, P., BOUKERMA, K., HÉQUET, A., BERJEAUD, J.-M., und PRADIER, C.-M. (2009). The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* 30, 3503-3512.
- JELINEK, R., und KOLUSHEVA, S. (2005). Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems. *Curr Protein Pept Sci* 6, 103-114.
- JENSEN, B. G., ANDERSEN, M. R., PEDERSEN, M. H., FRISVAD, J. C., und SØNDERGAARD, I. (2010). Hydrophobins from *Aspergillus* species cannot be clearly divided into two classes. *BMC Research Notes* 3, 344.
- JENSSEN, H., HAMILL, P., und HANCOCK, R. E. W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 491-511.
- JOENSUU, J. J., CONLEY, A. J., LIENEMANN, M., BRANDLE, J. E., LINDER, M. B., und MENASSA, R. (2009). Hydrophobin Fusions for High-Level Transient Protein Expression and Purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* 152, 622-633.
- JOSE, J., und MEYER, T. F. (2007). The Autodisplay Story, from Discovery to Biotechnical and Biomedical Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 600-619.
- KAPUST, R. B., TOZSER, J., COPELAND, T. D., und WAUGH, D. S. (2002). The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 949-955.
- KERSHAW, M. J., und TALBOT, N. J. (1998). Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet Biol* 23, 18-33.
- KIM, S., BAEK, S.-H., LEE, K., und HAHN, J.-S. (2013). Cellulosic ethanol production using a yeast consortium displaying a minicellulosome and beta-glucosidase. *Microbial Cell Factories* 12, 14.
- KIRKLAND, B. H., und KEYHANI, N. O. (2010). Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E. coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38, 327-335.
- KLAUSEN, M., HEYDORN, A., RAGAS, P., LAMBERTSEN, L., AAES-JØRGENSEN, A., MOLIN, S., und TOLKER-NIELSEN, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* 48, 1511-1524.
- KODANI, S., LODATO, M. A., DURRANT, M. C., PICART, F., und WILLEY, J. M. (2005). SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes. *Molecular Microbiology* 58, 1368-1380.
- KOGA, T., ASAKAWA, H., OKAHASHI, N., und HAMADA, S. (1983). Sucrose-dependent Cell Adherence and Cariogenicity of Serotype c *Streptococcus mutans*. *Journal of General Microbiology* 132, 2873-2883.

- KRAMER, A., KEITEL, T., WINKLER, K., STOCKLEIN, W., HOHNE, W., und SCHNEIDER-MERGENER, J. (1997). Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell* 91, 799-809.
- KURAMITSU, H. K. (1993). Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit Rev Oral Biol Med* 4, 159-176.
- KURODA, K., und UEDA, M. (2010). Cell surface engineering of yeast for applications in white biotechnology. *Biotechnology Letters* 33, 1-9.
- KWAN, A. H., MACINDOE, I., VUKAŠIN, P. V., MORRIS, V. K., KASS, I., GUPTA, R., MARK, A. E., TEMPLETON, M. D., MACKAY, J. P., und SUNDE, M. (2008). The Cys3–Cys4 Loop of the Hydrophobin EAS Is Not Required for Rodlet Formation and Surface Activity. *Journal of Molecular Biology* 382, 708-720.
- KWAN, A. H. Y., WINEFIELD, R. D., SUNDE, M., MATTHEWS, J. M., HAVERKAMP, R. G., TEMPLETON, M. D., und MACKAY, J. P. (2006). Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 3621-3626.
- LAHTINEN, T., LINDER, M. B., NAKARI-SETÄLÄ, T., und OKER-BLOM, C. (2008). Hydrophobin (HFBI): A potential fusion partner for one-step purification of recombinant proteins from insect cells. *Protein Expression and Purification* 59, 18-24.
- LAVALLIE, E. R., DIBLASIO, E. A., KOVACIC, S., GRANT, K. L., SCHENDEL, P. F., und MCCOY, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (NY)* 11, 187-193.
- LAWRENCE, J. R., KORBER, D. R., HOYLE, B. D., COSTERTON, J. W., und CALDWELL, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 173, 6558-6567.
- LEBRET, K., THABARD, M., und HELLIO, C. (2009). Algae as marine fouling organisms: adhesion damage and prevention. In *Advances in marine antifouling coatings and technologies*, C. Hellio, und D. Yebra, eds. (Boca Raton, CRC Press), pp. 80-112.
- LEE, J.-S., SHIN, K.-S., PAN, J.-G., und KIM, C.-J. (2000). Surface-displayed viral antigens on salmonella carrier vaccine. *Nature Biotechnology* 18, 645-648.
- LEE, S. Y., CHOI, J. H., und XU, Z. (2003). Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* 21, 45-52.
- LI, J. F., ZHANG, J., ZHANG, Z., KANG, C. T., und ZHANG, S. Q. (2010). SUMO Mediating Fusion Expression of Antimicrobial Peptide CM4 from two Joined Genes in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 62, 296-300.
- LI, X., und KRUMHOLZ, L. R. (2009). Thioredoxin Is Involved in U(VI) and Cr(VI) Reduction in *Desulfovibrio desulfuricans* G20. *Journal of Bacteriology* 191, 4924-4933.
- LI, Y. (2013). Production of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* using a thioredoxin–SUMO dual fusion system. *Protein Expression and Purification* 87, 72-78.

- LILJEQVIST, S., SAMUELSON, P., HANSSON, M., NGUYEN, T. N., BINZ, H., und STAHL, S. (1997). Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Appl Environ Microbiol* 63, 2481-2488.
- LINDER, M. B., SZILVAY, G. Z. R., NAKARI-SETÄLÄ, T., und PENTTILÄ, M. E. (2005). Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 877-896.
- LITTLEJOHN, K. A., HOOLEY, P., und COX, P. W. (2012). Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloids* 27, 503-516.
- LIU, M., WANG, S., WEI, Z., SONG, Y., und JIANG, L. (2009). Bioinspired Design of a Superoleophobic and Low Adhesive Water/Solid Interface. *Advanced Materials* 21, 665-669.
- LOPEZ-GARCIA, B., PEREZ-PAYA, E., und MARCOS, J. F. (2002). Identification of Novel Hexapeptides Bioactive against Phytopathogenic Fungi through Screening of a Synthetic Peptide Combinatorial Library. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2453-2460.
- LÓPEZ-GARCÍA, B., UBHAYASEKERA, W., GALLO, R. L., und MARCOS, J. F. (2007). Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356, 107-113.
- LOVETRI, K., GAWANDE, P. V., YKANDAWALA, N., und MADHYASTA, S. (2010). Biofouling and anti-fouling of medical devices. In *Biofouling types, impact and anti-fouling*, J. Cahn, und W. Wong, eds. (New York, Nova Science Publishers), pp. 105-128.
- MAH, T. F., und O'TOOLE, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9, 34-39.
- MALAKHOV, M. P., MATTERN, M. R., MALAKHOVA, O. A., DRINKER, M., WEEKS, S. D., und BUTT, T. R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics* 5, 75-86.
- MANIA, D., HILPERT, K., RUDEN, S., FISCHER, R., und TAKESHITA, N. (2010). Screening for Antifungal Peptides and Their Modes of Action in *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7102-7108.
- MARTIN, E., GANZ, T., und LEHRER, R. I. (1995a). Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol* 58, 128-136.
- MARTIN, F., LAURENT, P., DE CARVALHO, D., VOIBLET, C., BALESTRINI, R., BONFANTE, P., und TAGU, D. (1999). Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genetics and Biology* 27, 161-174.
- MARTIN, F., LAURENT, P., DECARVALHO, D., BURGESS, T., MURPHY, P., NEHLS, U., und TAGU, D. (1995b). Fungal gene-expression during ectomycorrhiza formation. *Can J Bot (Revue Canadienne De Botanique)* 73, 541-547.

- MARTINEAU, P., CHARBIT, A., LECLERC, C., WERTS, C., O'CALLAGHAN, D., und HOFNUNG, M. (1991). A genetic system to elicit and monitor antipeptide antibodies without peptide synthesis. *Bio/Technology* 9, 170-172.
- MCNEILL, K., und HAMILTON, I. R. (2003). Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters* 221, 25-30.
- MELO, L. F., BOTT, T. R., und BERNARDO, C. A. (1988). *Fouling science and technology* (Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publisher).
- MISKEI, M., KARÁNYI, Z., und PÓCSI, I. (2009). Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genetics and Biology* 46, S105-S120.
- MIZUNO, T. (1997). Compilation of All Genes Encoding Two-component Phosphotransfer Signal Transducers in the Genome of *Escherichia coli*. *DNA Research* 4, 161-168.
- MONTEIRO, D. R., GORUP, L. F., TAKAMIYA, A. S., RUVOLLO-FILHO, A. C., CAMARGO, E. R. D., und BARBOSA, D. B. (2009). The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34, 103-110.
- MOORE, ROBERT J., und INGHAM, AARON B. (2007). Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 47, 1.
- MUNOZ, A., HARRIES, E., CONTRERAS-VALENZUELA, A., CARMONA, L., READ, N. D., und MARCOS, J. F. (2013). Two Functional Motifs Define the Interaction, Internalization and Toxicity of the Cell-Penetrating Antifungal Peptide PAF26 on Fungal Cells. *PLoS One* 8, e54813.
- MUNOZ, A., LOPEZ-GARCIA, B., und MARCOS, J. F. (2006). Studies on the Mode of Action of the Antifungal Hexapeptide PAF26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 3847-3855.
- MUÑOZ, A., MARCOS, J. F., und READ, N. D. (2012). Concentration-dependent mechanisms of cell penetration and killing by the de novo designed antifungal hexapeptide PAF26. *Molecular Microbiology* 85, 89-106.
- MURAI, T., UEDA, M., YAMAMURA, M., ATOMI, H., SHIBASAKI, Y., KAMASAWA, N., OSUMI, M., AMACHI, T., und TANAKA, A. (1997). Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering. *Appl Environ Microbiol* 63, 1362-1366.
- NEBOT, E., CASANUEVA, J. F., SOLERA, R., PENDON, C., TARACIDO, L. J., CASANUEVA-ROBLES, T., und LOPEZ-GALINDO, C. (2010). Marine Biofouling in heat exchangers. In *Biofouling types, impact and anti-fouling*, J. Chan, und S. Wong, eds. (New York, Vova Science Publishers), pp. 79-102.
- NG, W.-L., und BASSLER, B. L. (2009). Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics* 43, 197-222.
- NGUYEN, H., PHAN, T., und SCHUMANN, W. (2011). Analysis and application of *Bacillus subtilis* sortases to anchor recombinant proteins on the cell wall. *AMB Express* 1, 22.

OAKLEY, B. R., RINEHART, J. E., MITCHELL, B. L., OAKLEY, C. E., CARMONA, C., GRAY, G. L., and MAY, G. S. (1987). Cloning, mapping and molecular analysis of the pyrG (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 61, 385-399.

OPPENHEIM, J. J., BIRAGYN, A., KWAK, L. W., and YANG, D. (2003). Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis*.

OSMANI, A. H., OAKLEY, B. R., and OSMANI, S. A. (2006). Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nature Protocols* 1, 2517-2526.

PAANANEN, A., VUORIMAA, E., TORKKELI, M., PENTTILA, M., KAURANEN, M., IKKALA, O., LEMMETYINEN, H., SERIMAA, R., and LINDER, M. B. (2003). Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry* 42, 5253-5258.

PARK, C. B., YI, K. S., MATSUZAKI, K., KIM, M. S., and KIM, S. C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8245-8250.

PEREGO, M. (2001). A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 42, 133-143.

PIETIÄINEN, M., GARDEMEISTER, M., MECKLIN, M., LESKELÄ, S., SARVAS, M., and KONTINEN, V. P. (2005). Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* 151, 1577-1592.

PLESZCZYŃSKA, M., BOGUSZEWSKA, A., TCHÓRZEWSKI, M., WIATER, A., and SZCZODRAK, J. (2012). Gene cloning, expression, and characterization of mutanase from *Paenibacillus curdolanolyticus* MP-1. *Protein Expression and Purification* 86, 68-74.

QIN, M., WANG, L.-K., and FENG, X.-Z. (2007). Bioactive Surface Modification of Mica and Poly(dimethylsiloxane) with Hydrophobins for Protein Immobilization. *Langmuir, American Chemical Society* 23, 4465-4471.

RAILKIN, A. I. (2004). Book Reviews - Marine Biofouling: Colonization Processes and Defenses. *Biofouling* 20, 129-131.

RICHINS, R. D., KANEVA, I., MULCHANDANI, A., and CHEN, W. (1997). Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nat Biotechnol* 15, 984-987.

RIEDER, A. (2012) Biomimetische Oberflächenmodifikation mit rekombinanten pilzlichen Hydrophobinen und ihr Einfluss auf die bakterielle Biofilmbildung, PhD, KIT Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe.

RIEDER, A., LADNORG, T., WÖLL, C., OBST, U., FISCHER, R., and SCHWARTZ, T. (2011). The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on *E. coli* and natural mixed culture biofilm formation. *Biofouling* 27, 1073-1085.

- RODRIGUEZ-ROMERO, J., HEDTKE, M., KASTNER, C., MÜLLER, S., und FISCHER, R. (2010). Fungi, Hidden in Soil or Up in the Air: Light Makes a Difference. *Annual Review of Microbiology* 64, 585-610.
- ROMEO, D., SKERLAVAJ, B., BOLOGNESI, M., und GENNARO, R. (1988). Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* 263, 9573-9575.
- RUGER-HERREROS, C., RODRIGUEZ-ROMERO, J., FERNANDEZ-BARRANCO, R., OLMEDO, M., FISCHER, R., CORROCHANO, L. M., und CANOVAS, D. (2011). Regulation of Conidiation by Light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188, 809-822.
- RUSSO, P. S., BLUM, F. D., IPSEN, J. D., MILLER, W. G., und ABUL-HAJJ, Y. J. (1982). The surface activity of the phytotoxin cerato-ulmin. *Can J Bot* 60, 1414-1422.
- RUSTEN, B., HEM, L. J., und ODEGAARD, H. (1995). Nitrification of municipal wastewater in moving-bed biofilm reactors. *Water Environment Research* 67, 75-86.
- SAIDA, F., UZAN, M., ODAERT, B., und BONTEMS, F. (2006). Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Curr Protein Pept Sci* 7, 47-56.
- SAKAI, A., KITA, M., KATSURAGI, T., OGASAWARA, N., und TANI, Y. (2002). yaaD and yaaE are involved in vitamin B6 biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Biosci Bioeng* 93, 309-312.
- SAUER, K., CAMPER, A. K., EHRLICH, G. D., COSTERTON, J. W., und DAVIES, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* 184, 1140-1154.
- SCHMOLL, M., SEIBEL, C., KOTLOWSKI, C., WÖLLERT GENANNT VENDT, F., LIEBMANN, B., und KUBICEK, C. P. (2010). Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (DewA) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88, 95-103.
- SCHNEIDER, T., KRUSE, T., WIMMER, R., WIEDEMANN, I., SASS, V., PAG, U., JANSEN, A., NIELSEN, A. K., MYGIND, P. H., RAVENTOS, D. S., *et al.* (2010). Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. *Science* 328, 1168-1172.
- SCHOLTMEIJER, K., WESSELS, J. G. H., x000F, und STEN, H. A. B. (2001). Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 1-8.
- SCHREUDER, M. P., DEEN, C., BOERSMA, W. J., POWWELS, P. H., und KLIS, F. M. (1996). Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine* 14, 383-388.
- SCHULZ, M. J., SHANOV, V. N., und YUN, Y. (2009). *Nanomedicine design of particles, sensors, motors, implants, robots, and devices* (Boston, Artech House).
- SCHUMACHER, S. D., und JOSE, J. (2012). Expression of active human P450 3A4 on the cell surface of *Escherichia coli* by Autodisplay. *Journal of Biotechnology* 161, 113-120.

- SCHUREN, F. H., und WESSELS, J. G. (1990). Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene* 90, 199-205.
- SEWALL, T. C., MIMS, C. W., und TIMBERLAKE, W. E. (1990). *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* 2, 731-739.
- SHIBASAKI, S., UEDA, M., YE, K., SHIMIZU, K., KAMASAWA, N., OSUMI, M., und TANAKA, A. (2001). Creation of cell surface-engineered yeast that display different fluorescent proteins in response to the glucose concentration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 528-533.
- SHOKRIBOUSJEIN, Z., DECKERS, S. M., GEBRUERS, K., LORGUILLOUX, Y., BAGGERMAN, G., VERACHTERT, H., DELCOUR, J. A., ETIENNE, P., ROCK, J.-M., MICHIELS, C., und DERDELINCKX, G. (2011). Review hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia* 35, 85-101.
- SMITH, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- SOMERSCALES, E. F. C., und KNUDSEN, J. G. (1981). *Fouling of heat transfer equipment* (Washington D. C., Hemisphere Publishing Corporation).
- SOUSA, C., KOTRBA, P., RUML, T., CEBOLLA, A., und DE LORENZO, V. (1998). Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J Bacteriol* 180, 2280-2284.
- SPANU, P. (1998). Deletion of Hcf-1, a hydrophobin gene of *Cladosporium fulvum*, does not affect pathogenicity in tomato. *Physiol Mol Plant Pathol* 52, 323-334.
- STAHL, S., ROBERT, A., GUNNERIUSSON, E., WERNÉRUS, H., CANO, F., LILJEQVIST, S., HANSSON, M., NGUYEN, T. N., und SAMUELSON, P. (2000). Staphylococcal surface display and its applications. *Int J Med Microbiol* 290, 571-577.
- STAJICH, J. E., WILKE, S. K., AHREN, D., AU, C. H., BIRREN, B. W., BORODOVSKY, M., BURNS, C., CANBACK, B., CASSELTON, L. A., CHENG, C. K., *et al.* (2010). From the Cover: Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 11889-11894.
- STARON, A., FINKEISEN, D. E., und MASCHER, T. (2010). Peptide Antibiotic Sensing and Detoxification Modules of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 515-525.
- STEWART, P. S., und COSTERTON, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358, 135-138.
- STOCK, A. M., ROBINSON, V. L., und GOUDREAU, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183-215.
- STOODLEY, P., JORGENSEN, F., und LAPPIN-SCOTT, H. M. (1999). *Biofilms: The Good, the Bad and the Ugly* (Cardiff, BioLine).

- STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D. G., und COSTERTON, J. W. (2002). Biofilms Ascomplexdifferentiatedcommunities. *Annual Review of Microbiology* 56, 187-209.
- STOVER, C. K., PHAM, X. Q., ERWIN, A. L., MIZOGUCHI, S. D., WARRENER, P., HICKEY, M. J., BRINKMAN, F. S., HUFNAGLE, W. O., KOWALIK, D. J., LAGROU, M., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.
- STRINGER, M. A., DEAN, R. A., SEWALL, T. C., und TIMBERLAKE, W. E. (1991). Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes & Development* 5, 1161-1171.
- STRINGER, M. A., und TIMBERLAKE, W. E. (1995). *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol Microbiol* 16, 33-44.
- STUDIER, W. (1991). Use of Bacteriophage T7 Lysozyme to Improve an Inducible T7 Expression System. *Journal of Molecular Biology* 219, 37-44.
- STUDIER, W., und MOFFATT, B. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology* 189, 113-130.
- SUNDE, M., KWAN, A. H. Y., TEMPLETON, M. D., BEEVER, R. E., und MACKAY, J. P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron* 39, 773-784.
- SUTHERLAND, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3-9.
- SZEWZYK, U., und SZEWZYK, R. (2003). Biofilme – die etwas andere Lebensweise. *BIOspektrum* 3, 253-255.
- TAGU, D., KOTTKE, I., und MARTIN, F. (1998). Hydrophobins in ectomycorrhizal symbiosis: hypothesis. *Symbiosis* 25, 5-18.
- TAGU, D., MARMEISSE, R., BAILLET, Y., RIVIERE, S., PALIN, B., BERNARDINI, F., MEREAU, A., GAY, G., BALESTRINI, R., BONFANTE, P., und MARTIN, F. (2002). Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus* HydPt-1 gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporum*. *European Journal of Histochem* 46, 23-29.
- TALBOT, N. J., KERSHAW, M. J., WAKLEY, G. E., VRIES, O. M. H. D., WESSELS, J. G. H., und HAMER, J. E. (1996). MPG1 Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 8, 985-999.
- TEERTSTRA, W. R., DEELSTRA, H. J., VRANES, M., BOHLMANN, R., KAHMANN, R., KAMPER, J., und WOSTEN, H. A. B. (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology* 152, 3607-3612.
- TEITZEL, G. M., und PARSEK, M. R. (2003). Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2313-2320.

THEIS, T., und STAHL, U. (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61, 437-455.

THROM, T. (2011) Charakterisierung der Hydrophobine in *Aspergillus nidulans* und deren Anwendung zur Oberflächenbeschichtung und -funktionalisierung, PhD, KIT Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe.

VALO, H. K., LAAKSONEN, P. H., PELTONEN, L. J., LINDER, M. B., HIRVONEN, J. T., und LAAKSONEN, T. J. (2010). Multifunctional hydrophobin: toward functional coatings for drug nanoparticles. *ACS Nano* 4, 1750-1758.

VAN DER WEERDEN, N. L., BLEACKLEY, M. R., und ANDERSON, M. A. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*.

VAN WETTER, M.-A., WÖSTEN, H. A. B., SIETSMA, J. H., und WESSELS, J. G. H. (2000). Hydrophobin Gene Expression Affects Hyphal Wall Composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and Biology* 31, 99-104.

VARGAS-PEREZ, I., SANCHEZ, O., KAWASAKI, L., GEORGELLIS, D., und AGUIRRE, J. (2007). Response Regulators SrrA and SskA Are Central Components of a Phosphorelay System Involved in Stress Signal Transduction and Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 6, 1570-1583.

VEITH, D., SCHERR, N., EFIMOV, V. P., und FISCHER, R. (2005). Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science* 118, 3705-3716.

VIRGINIA, M., APPELYARD, C. L., MCPHEAT, W. L., und STARK, M. J. (2000). A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 37, 364-372.

VO-DINH, T. (2007). *Nanotechnology in biology and medicine* (Boca Raton, CRC Press).

VRIES, O. M. H. D., FEKKES, M. P., WÖSTEN, H. A. B., und WESSELS, J. G. H. (1993). Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Archives of Microbiology* 159, 330-335.

WALKER, J., SURMAN, S., und JASS, J. (2000). *Industrial Biofouling: Detection, Prevention and Control* (New York, John Wiley & Sons).

WANG, G., LI, X., und WANG, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research* 37, D933-D937.

WANG, X., SHI, F., WÖSTEN, H. A. B., HEKTOR, H., POOLMAN, B., und ROBILLARD, G. T. (2005). The SC3 Hydrophobin Self-Assembles into a Membrane with Distinct Mass Transfer Properties. *Biophysical Journal* 88, 3434-3443.

WANG, Z., und WANG, G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research* 32, 590-592.

WATERS, C. M., und BASSLER, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319-346.

- WERNERUS, H., und STAHL, S. (2004). Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* 40, 209-228.
- WESSELS, J., DE VRIES, O., ASGEIRSDOTTIR, S. A., und SCHUREN, F. (1991). Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* 3, 793-799.
- WESSELS, J. G. H. (1994). Developmental Regulation of Fungal Cell Wall Formation. *Annual Review of Phytopathology* 32, 413-437.
- WESSELS, J. G. H. (1997). Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Advances in microbial physiology* 38, 1-45.
- WEST, A. H., und STOCK, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26, 369-376.
- WHITEFORD, J. R., LACROIX, H., TALBOT, N. J., und SPANU, P. D. (2004). Stage-specific cellular localisation of two hydrophobins during plant infection by the pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genetics and Biology* 41, 624-634.
- WHITEFORD, J. R., und SPANU, P. D. (2001). The Hydrophobin Hcf-1 of *Cladosporium fulvum* Is Required for Efficient Water-Mediated Dispersal of Conidia. *Fungal Genetics and Biology* 32, 159-168.
- WHITEFORD, J. R., und SPANU, P. D. (2002). Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Mol Plant Pathol* 3, 391-400.
- WIATER, A., CHOMA, A., und SZCZODRAK, J. (1999). Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study. *J Basic Microbiol* 39, 265-273.
- WIATER, A., und SZCZODRAK, J. (2002). Selection of Strain and Optimization of Mutanase Production in submerged Cultures of *Trichoderma harzianum*. *Acta Biologica Hungarica* 53, 389-401.
- WIATER, A., SZCZODRAK, J., und PLESZCZYNSKA, M. (2008). Mutanase induction in *Trichoderma harzianum* by cell wall of *Laetiporus sulphureus* and its application for mutan removal from oral biofilms. *J Microbiol Biotechnol* 18, 1335-1341.
- WINANDY, L. (2012) Exponierung von α -1,3-Glucanasen auf Oberflächen mittels modifizierten Fusionshydrophobinen, Bachelor, KIT Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe.
- WINTTERLIN, J., WIECHERS, J., BRUNE, H., GRITSCH, T., HOFER, H., und BEHM, R. J. (1989). Atomic-resolution imaging of close-packed metal surfaces by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett* 62, 59-62.
- WOHLLEBEN, W., SUBKOWSKI, T., BOLLSCHWEILER, C., VACANO, B., LIU, Y., SCHREPP, W., und BAUS, U. (2009). Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *European Biophysics Journal* 39, 457-468.
- WÖSTEN, H. A., und DE VOCHT, M. L. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta* 1469, 79-86.

WÖSTEN, H. A., RICHTER, M., und WILLEY, J. M. (1999). Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. *Fungal Genet Biol* 27, 153-160.

WÖSTEN, H. A. B., und WESSELS, J. G. H. (1997). Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience* 38, 363-374.

WU, M., und HANCOCK, R. E. (1999). Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1274-1276.

XU, Z., und LEE, S. Y. (1999). Display of polyhistidine peptides on the Escherichia coli cell surface by using outer membrane protein C as an anchoring motif. *Appl Environ Microbiol* 65, 5142-5147.

YAGUCHI, M., PUSZTAI-CAREY, M., ROY, C., SUREWICZ, W. K., CAREY, P. R., STEVENSON, K. J., RICHARDS, W. C., und TAKAI, S. (1993). Amino Acid Sequence and Spectroscopic Studies of Dutch Elm Disease Toxin, Cerato-ulmin. *Dutch Elm Disease Research*, 152-170.

ZASLOFF, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

ZHAO, Z.-X., WANG, H.-C., QIN, X., WANG, X.-S., QIAO, M.-Q., ANZAI, J.-I., und CHEN, Q. (2009). Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71, 102-106.

ZHONG, Q., INNLSS, D., KJOLLER, K., und ELINGS, V. B. (1993). Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science Letters* 290, L688-L692.

ZOBELL, C. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon bacterial Activity. *Journal of Bacteriology* 46, 39-56.

ZOLLER, J. (2013) Charakterisierung von Biofilmen und Untersuchung des pilzlichen Biofilmwachstums am Beispiel von *Fusarium oxysporum*, PhD, KIT Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe.

Abkürzungsverzeichnis

AFM Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscopy*)

AMP antimikrobielles Peptid

BFM Biofeuchtmasse

DIG Digoxygenin

EPS extrazelluläre polymere Substanzen

GFP grünfluoreszierendes Protein

GPI-Anker Glykosylphosphatidylinositol-Anker

IPTG Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid

IB Einschlusskörperchen (engl. *inclusion bodies*)

LG3 globuläre Domäne 3 aus der α 3 Seitenkette des humanen Laminin-5

MHK Minimale Hemm Konzentration

MSC mesenchymale Stammzellen, (engl. *mesenchymal stem cells*)

RFP rotfluoreszierendes Protein

nP natürlicher Promotor

PSI Pfund pro Quadratzoll (engl. *pound-force per square inch*)

RGD Bindungsmotiv von Fibronectin, abgekürzt für den 3 As-Code Arg-Gly-Asp

rpm Umdrehungen pro Minute (engl. *rounds per minute*)

SDS-PAGE Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
(engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Lebenslauf

Beatrice Gutt

*31. Juli 1983 in Mediasch
Staatsangehörigkeit: deutsch
Morgenstraße 676137 Karlsruhe
Tel.: 0163/6455677
Email: beagutt@gmx.net

Familienstand: ledig, keine Kinder

Bildungsgang

10/2009 - 04/2013

Promotion

Institut für angewandte Biowissenschaften (IAB), KIT
(Karlsruher Institut für Technologie)
Titel: Anwendung von *Aspergillus nidulans* Hydrophobinen
zur Funktionalisierung von Oberflächen mit antimikrobiellen
Peptiden und Enzymen

05/2008 - 03/2009

Diplomarbeit, KIT und RWTH Aachen

Titel: Zellhüllstressantwort in *Streptococcus pneumoniae* –
Analyse des Zweikomponentensystems HK/RR03

10/2003 - 03/2009

Studium, RWTH Aachen

Diplomstudiengang Biologie
Abschluss: Diplom (Ø 1,5)
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Biotechnologie,
Bioverfahrenstechnik

08/1994 - 06/2003

allgemeine Hochschulreife (Ø 2,5)

Bischöfliches Gymnasium St. Ursula, 52511 Geilenkirchen

Berufserfahrung

10/2009 - 09/2012

wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin)

Aufgaben: Betreuung von Praktika, Bachelor-, Diplom- und
Masterarbeiten

Präsentation von Forschungsergebnissen

Eigenständige Planung und Durchführung von

Forschungsarbeiten

05/2009 - 09/2009

wissenschaftliche Mitarbeiterin, KIT-Research Group 11-1, mikrobielle Stressantworten

Aufgaben: Eigenständige Planung und Durchführung von
Forschungsarbeiten

04/2007 - 12/2007

Hilfswissenschaftlerin der Abteilungen Biotechnologie und molekulare Biologie, RWTH Aachen

Aufgaben: Betreuung von Praktika in Genetik und
Biotechnologie; Betreuung des Tutoriums Biotechnologie II
(Stoffproduktionen in der klassischen und modernen
Biotechnologie)

Veröffentlichungen

Eldholm V[#], Gutt B[#], Johnsborg O, Brückner R, Maurer P, Hakenbeck R, Mascher T, Håvarstein LS (2010), The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *J. Bacteriol* 192: 1761-1773

Rieder A, Schwartz T, Obst U, Bollschweiler C, Gutt B, Zoller J, Fischer R. (2010). Hydrophobins - using hydrophobins to prevent microbial biofilm growth on mineral surfaces. *Geotechnologien Science Report*. 16:3-18

Boeuf S, Throm T, Gutt B, Strunk T, Hoffmann M, Seebach E, Mühlberg L, Brocher J, Gotterbarm T, Wenzel W, Fischer R, Richter W (2012), Engineering hydrophobin DewA to generate surfaces that enhance adhesion of human but not bacterial cells. *Acta Biomater* 8: 1037-1047

Danke...

..... zuerst einmal an dich Reinhard für dieses interessante Thema, deinen Optimismus, die Ratschläge und Hilfestellungen!

Auch möchte ich mich herzlich bei Prof. Rolf Geisen bedanken, der sich dazu bereit erklärt hat das Korreferat zu übernehmen!

Im Laufe meiner Dr-Arbeit begegnete ich vielen Menschen, die mich auf diesem Weg wissenschaftlich und freundschaftlich begleiteten. So möchte ich mich bei Annika Rieder, Thomas Schwarz, Jörg Overhage und besonders Nikola Stempel vom IFG (Campus Nord) für die Gespräche und Zusammenarbeit bedanken. Einen großen Dank auch an Paul Vincze (INT, Campus Nord), der mir mit seinem physikalischen Fachwissen und den AFM-Aufnahmen eine große Hilfe war.

Frisch aus dem verregneten Aachen kam ich vor fast fünf Jahren in die „Außenstelle“ und lernte Tobi, Jan und Tanja kennen, die mir gute und liebe Freunde geworden sind. Eli, die gute Seele des Labors, hatte immer ein offenes Ohr und ich durfte das ein oder andere Mal ihre rechte Hand in der Betreuung von Praktika sein. Auch die gesamte ehemalige und aktuelle Besatzung des „Kompetenzlabors“ ist mir ans Herz gewachsen und konnte mir mit Rat und Tat beiseite stehen! Hannah, Silke, Norio, Christian, Debi, Chris, Mike, Nicole, Anna, Jenny, Lex, Caro und Ruben DANKE: für gute Laune, Musik, Käsetage, Blödeleien, Rocky Laboar und wissenschaftlichen Beistand. Julia, dir einen besonderen Dank, da wir die gesamte Zeit zusammen erlebt und miteinander gelitten haben. Natürlich möchte ich mich bei der gesamten Fischergruppe für Hilfe bei Aspergillus-, Proteinfragen, Real Time und vielem mehr bedanken. Danke Conni, Satur, Elke, Fabienne, Tamara, Nadine, Raphael, Andi, Kristin, Stefan und Julian für eure Hilfe, Heiterkeit (ja, ich hab eben nur ein Synonym für gute Laune gesucht) und freundschaftliche Atmosphäre. Ich war sehr gern ein Teil eurer Arbeitsgruppe und Gemeinschaft! Danke an Nathalie und besonders Tanja, die mir fleißig Literatur frei Haus lieferte, für lustige und aufmunternde Gespräche, schöne Tannenbäume und Zumba. Danke auch an die Kämpers, die Mycs

und die Nadicom dafür, dass immer einer von euch eine Lösung wusste und es mit euch nie langweilig wurde.

Danke an alle meine Freunde, die mich unterstützt, aufgemuntert und zum Lachen gebracht haben! Ich meine euch alle und mache keine Aufzählung, damit ich ja niemanden vergesse!

Oma, Mama, Tata, Andrea, Marina, Ruthi, Liese, Lottitante, Renate.... ach eigentlich die ganze Familie: Danke dass ihr immer für mich da wart, eure Unterstützung und euren Glauben an mich!

Zum Schluss möchte ich mich bei dem wichtigsten Menschen im meinem Leben bedanken, dem besten Kaichen der Welt! Danke für deine Unterstützung, Liebe, die schönen Urlaube und Ausflüge, Konzerte und Festivals und dass du es die letzten drei Wochen ertragen hast mich immer nur im Schlafanzug zu sehen! Eres la razón por la cual me levanto sonriendo cada mañana.

P.S.: Beinahe hätte ich es vergessen: Danke an meinen kleinen, weißen, etwas in die Jahre gekommenen Laptop! Du hast mich zwar manchmal hängen, aber nie im Stich gelassen!



Anhang





Engineering hydrophobin DewA to generate surfaces that enhance adhesion of human but not bacterial cells

Stephane Boeuf^a, Tanja Throm^b, Beatrice Gutt^b, Timo Strunk^c, Marc Hoffmann^a, Elisabeth Seebach^a, Leonie Mühlberg^a, Jan Brocher^a, Tobias Gotterbarm^a, Wolfgang Wenzel^c, Reinhard Fischer^b, Wiltrud Richter^{a,*}

^a Research Centre for Experimental Orthopaedics, Orthopaedic University Hospital Heidelberg, Schlierbacher Landstrasse 200a, 69118 Heidelberg, Germany

^b Department of Microbiology, Institute for Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology, Hertzstraße 16, 76187 Karlsruhe, Germany

^c Institute of Nanotechnology, Karlsruhe Institute of Technology, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 June 2011

Received in revised form 15 November 2011

Accepted 21 November 2011

Available online 2 December 2011

Keywords:

Hydrophobin
Mesenchymal stem cell
Bacterial infection
Implant coating
Orthopaedic implants

ABSTRACT

Hydrophobins are fungal proteins with the ability to form immunologically inert membranes of high stability, properties that makes them attractive candidates for orthopaedic implant coatings. Cell adhesion on the surface of such implants is necessary for better integration with the neighbouring tissue; however, hydrophobin surfaces do not mediate cell adhesion. The aim of this project was therefore to investigate whether the class I hydrophobin DewA from *Aspergillus nidulans* can be functionalized for use on orthopaedic implant surfaces. DewA variants bearing either one RGD sequence or the laminin globular domain LG3 binding motif were engineered. The surfaces of both variants showed significantly increased adhesion of mesenchymal stem cells (MSCs), osteoblasts, fibroblasts and chondrocytes; in contrast, the insertion of binding motifs RGD and LG3 in DewA did not increase *Staphylococcus aureus* adhesion to the hydrophobin surfaces. Proliferation of MSCs and their osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation potential were not affected on these surfaces. The engineered surfaces therefore enhanced MSC adhesion without interfering with their functionality or leading to increased risk of bacterial infection.

© 2011 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hydrophobins are fungal proteins with the ability to form amphipathic membranes by self-assembling at hydrophilic–hydrophobic interfaces. If these membranes are formed on a solid surface, they can convert the hydrophobicity of this surface. A Teflon surface, for example, can be made hydrophilic by the addition of a hydrophobin layer [1]. The assembly of class I hydrophobins is associated with the formation of amyloid fibrils [2], and assembled class I hydrophobins bind strongly to their supports, resisting harsh treatments such as boiling using water or detergents [3].

Hydrophobins are found on fungal spores and the tissues of fruiting bodies that have been exposed to air [4,5]. The hydrophobin coating on spores creates an affinity with hydrophobic surfaces, which facilitates their dispersal in the air. In addition to these biophysical properties, hydrophobins have also been shown to be important in the interaction between spores and their host post-inhalation. The hydrophobin RodA, from *Aspergillus fumigatus*, is immunologically inert. It does not induce maturation of dendritic cells and alveolar macrophages or activate helper T-cells,

and it is proposed to function as a shield, preventing immune response to spores [6]. Hydrophobins therefore represent non-immunogenic proteins with the capacity to change the property of surfaces via a stable coating of thin layers. These various properties suggest that hydrophobins may be interesting compounds for use in medical applications [3].

Materials with surfaces that permit good integration with human tissue are in high demand for tissue engineering and medical implants. For prosthetic implants in particular, osseointegration that guarantees stability and prevents subsequent loosening from bone is highly desirable. One means of promoting this integration is to use implants with surfaces on which progenitor cells can attach and differentiate to form new bone [7]. Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in the bone marrow and represent the most important cell population, with the ability to regenerate mesenchymal tissues [8]. The adhesion of MSCs to implant surfaces under conditions that maintain their osteogenic differentiation potential could therefore promote the integration of an implant. On the other hand, adhesion of bacterial cells is undesirable on implant surfaces. The infection of prosthetic joints with virulent microorganisms such as *Staphylococcus aureus* is a devastating complication with high morbidity [9]. Bacterial adhesion is a first step leading to biofilm formation and inflammation, which may

* Corresponding author. Tel.: +49 6221 96 92 53; fax: +49 6221 96 92 88.

E-mail address: wiltrud.richter@med.uni-heidelberg.de (W. Richter).

eventually necessitate implant removal; therefore, a functionalized coating for implant surfaces promoting the adhesion of human cells should not concurrently facilitate bacterial adhesion [7].

Hydrophobin DewA from *Aspergillus nidulans* is a class I hydrophobin for which large-scale production has been achieved [10]. A pilot study showed that DewA-coated surfaces provide low adhesion of human cells. The aim of this project was to investigate whether DewA could be functionalized for use on implant surfaces to prevent infection and improve tissue integration. Binding sites for integrin receptors such as the Arg–Gly–Asp (RGD) sequence of fibronectin [11,12] and the laminin globular domain LG3 [13] represent attractive cell adhesion-mediating motifs for such a functionalization. A similar approach was followed in earlier work with *Schizophyllum commune* SC3 hydrophobin, which was fused to an RGD peptide [1]. Coating with genetically engineered hydrophobin promoted growth of fibroblasts on a hydrophobic solid. In contrast to *A. nidulans* DewA, SC3 cannot be produced in *Escherichia coli* but needs to be isolated from the mushroom, a tedious and inefficient process. Application of this particular protein is consequently limited. In this project we used molecular modelling to predict suitable insertion sites for RGD or LG3 motifs at surface-accessible sites in the engineered *A. nidulans* DewA molecule, and used these purified proteins to produce hydrophobin surfaces that enhance adhesion of human cells. The adhesive properties of these engineered hydrophobins were investigated for MSCs, osteoblasts, fibroblasts, chondrocytes and *S. aureus*. The effects of hydrophobins on proliferation and differentiation of MSCs were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Modelling of genetically modified DewA variants

In order to model the DewA domain, a motif-conserving alignment between the sequence of DewA and the class I hydrophobin EAS [14] was carried out using the Needleman–Wunsch algorithm [15]. Homology models were created using the Modeller package [16] and further relaxed in the all atom-free energy forcefield PFF02 [17] using POEM@HOME. POEM (protein optimization using energy methods) is an all atom-free energy Monte Carlo framework shown to stabilize a multitude of different protein folds; POEM@HOME is the distributed volunteer computing implementation of the POEM framework. Single simulations consist of a fixed number of Monte Carlo steps changing either single dihedral angles by a random value, or by copying favourable angles from a database of angles specific to the occurrence of two adjacent amino acids. Bond lengths are maintained during the simulation.

We modelled the *yaaD*-binding peptide domain using fragment-based modelling of the truncated *yaaD* protein fused with either one of the binding peptides (Fig. 1A). Fragments were generated using the Rosetta server [18] and assembled in the Rosetta 3.1 suite. The resulting models were then relaxed on POEM@HOME applying a protocol similar to that used in modelling of DewA.

We generated 40,000 structures each, using the standard Rosetta modelling protocol for the fusion construct of both LG3 and RGD. Each of these models was then relaxed twice independently using 500,000-step geometrical annealing Monte Carlo simulations. For 2 h run time each, these simulations consumed about 36 CPU years of simulation time. The population of structures was analysed for the accessible surface of the LG3 or RGD motifs respectively in the energy-minimized ensemble.

2.2. Insertion of peptides RGD and LG3 via primer ligation

The peptides were fused to the N-terminus of the *yaaD* via primer ligation using the RGD ligation sense AATTCATTAAGAGGA-

GAAATTAACCATGCGGGGCGACCA and RGD ligation antisense CATGTGGTCGCCCCGCATGGTTAATTTCTCTCTTTAATG, or LG3 ligation sense AATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGCCGCCGTTCTGATGCTGCTGAAAGGTTCTACCCGTC and LG3 ligation antisense CATGTGACGGGTAGAACCTTCAGCAGCATCAGGAACGGCGGCATGGTTAATTTCTCTCTTTAATG primer sets that include the sequences of the promoter region between the restriction sites *EcoRI* and *NcoI* of the vector pQE60(truncated)YaaD–DewA–His₆ [10]. The synthesized primers from MWG (Ebersberg) were purified by high-performance liquid chromatography. The primer sets were incubated in PCR-buffer at 95 °C for 1 min and then cooled down to room temperature to allow duplex formation. The vector pQE60(truncated)YaaD–DewA–His₆ [10] was digested with *EcoRI* and *NcoI*, purified from 1% agarose gels via a Zymo Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch, Freiburg) and ligated with the double-stranded primers overnight. The ligation mixtures were transformed into *E. coli* XL-1 Blue Cells and the correct integration was confirmed by sequencing (MWG). The vector pTT15 contains the pQE60_RGD_(truncated)YaaD–DewA–His₆ and the vector pTT18 contains the pQE60_LG3_(truncated)YaaD–DewA–His₆.

2.3. Heterologous expression and purification of peptide DewA fusion proteins by separation of the inclusion bodies (IBs)

The vectors pTT15 and pTT18 were transformed in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS cells. Bacterial cultures were grown overnight in EC3 medium + ampicillin. The protein expression was induced at an optical density (OD) at 600 nm of between 0.7 and 0.9, with a final concentration of 0.5 mM IPTG; cells were grown for 4–6 h at 37 °C and 225 rpm. Cells were harvested by centrifugation for 30 min at 10,000 rpm (GSA rotor).

Protein purification was performed by separation and purification of inclusion bodies (IBs). The pellet from the production culture was resuspended in 20 mM NaH₂PO₄, pH 7.5 (10 ml g⁻¹ biomass). The cells were disrupted under cooling via Pressure Cell Press (American Instrument Company, 800 PSI). Subsequently, in order to separate the IBs from the cell debris and soluble proteins, cells were centrifuged 30 min in a 50 ml reaction tube at 5000 rpm, 4 °C. Cell pellets were resuspended in 20 mM NaH₂PO₄, pH 7.5 and pelleted again by centrifugation under identical conditions. Washing in 40 ml ultrapure water followed by centrifugation was repeated three times. To solubilize the IBs, the remaining pellet was resuspended in ultrapure water and mixed on a magnetic stirrer for 20 min after addition of 0.1 M NaOH. The solution was neutralized to pH 8.5–9 with 20% H₃PO₄ and centrifuged a second time. The protein found in the supernatant was then freeze-dried.

2.4. Isolation and culture of primary human cells

The studies were approved by the local ethics committee and informed consent was obtained from all individuals included in the study. Bone marrow samples were obtained from patients undergoing total hip replacement or iliac bone graft harvest. MSCs were isolated from fresh bone marrow samples as described previously [19]. Briefly, cells were fractionated on a Ficoll-Paque Plus density gradient (GE Healthcare, Freiburg, Germany), and the low-density MSC-enriched fraction was washed and seeded at a density of 1.25×10^5 cells cm⁻² into 0.1% gelatine-coated flasks in an expansion medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 mg l⁻¹ glucose (DMEM-HG) (Invitrogen, Germany) with 12.5% FCS, 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 0.1% 2-mercaptoethanol (Invitrogen), 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 4 ng ml⁻¹ human fibroblast growth factor-2 (Active Bioscience, Germany). Standard culturing conditions were used (37 °C, 6% CO₂). After 24–48 h, cultures were washed with phosphate-buffered saline (PBS) to remove non-

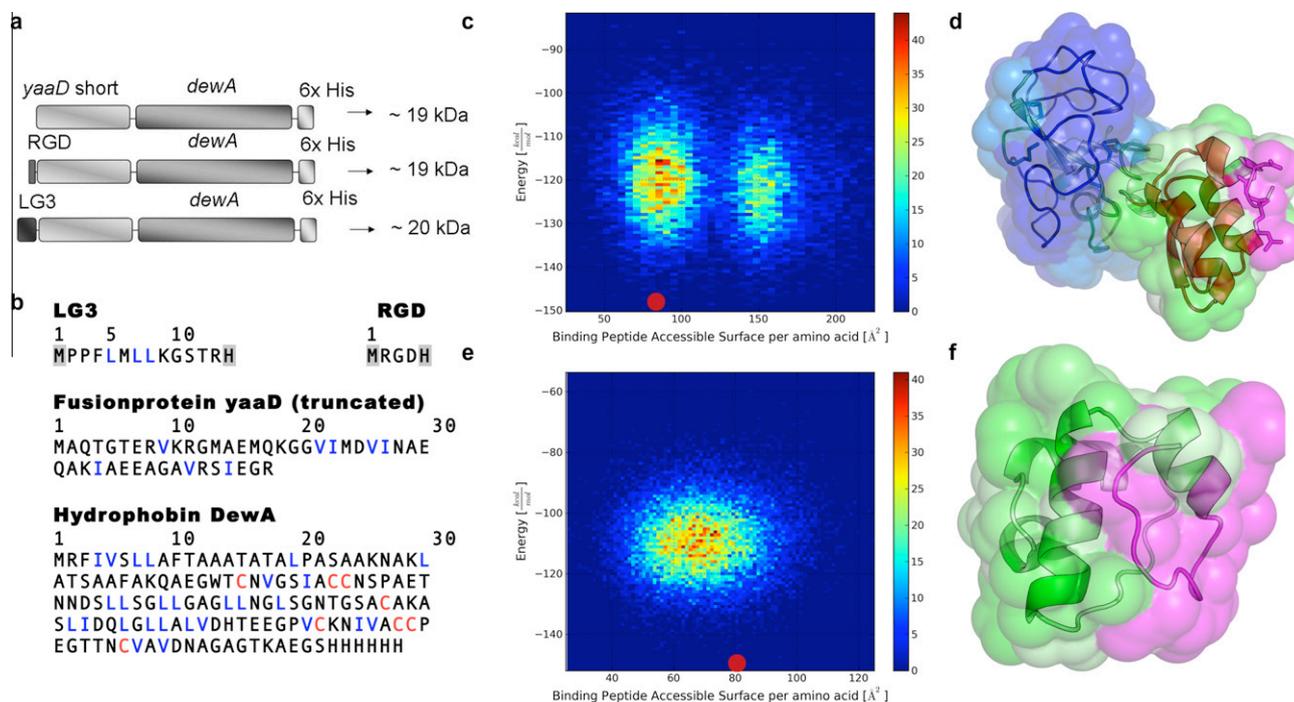


Fig. 1. Schematic representation and modelling of the DewA fusion proteins. (A) Schematic representation of the sequence of the expression constructs and masses of hydrophobin DewA with the truncated fusion protein *yaaD*, the binding motifs RGD or LG3 and a $6 \times$ His tag. (B) Sequences of the expressed constructs. Strongly hydrophobic amino acids are highlighted in blue; the characteristic hydrophobin cysteine motif is highlighted in red. Amino acids of the fusion construct linking to the RGD or LG3 motif are printed with a grey background. (C, E) Free-energy and exposed surface area per amino acids of all generated models for RGD fused with *yaaD* (MET1–ARG51) and DewA (MET52–VAL176) (C), and for LG3 fused with *yaaD* (MET1–ARG60) and DewA (MET61–VAL185) (E). The lowest energy conformations are marked with a red dot. (D) Cartoon and surface visualization of the best energy model of the full engineered protein variant fused with RGD. The model features two distinct domains: the hydrophobin domain MET52–VAL176 (light blue) and the hydrophobic loops (dark blue); and the fusion-interaction domain MET1–ARG51 (green) with the RGD (magenta). (F) Cartoon and surface visualization of the best energy model of construct LG3 (magenta) fused with *yaaD* (MET1 – ARG60, green). The DewA domain (MET61–VAL185) is not shown.

adherent material. Osteoblasts were grown from trabecular bone chips in culture medium composed of DMEM-HG containing 10% foetal calf serum (FCS; Biochrom, Berlin, Germany), 50 U ml⁻¹ penicillin, 50 U l⁻¹ streptomycin, 12.5 mM HEPES, 0.4 mM L-proline, 50 mg l⁻¹ ascorbic acid and 0.1 μM dexamethasone under standard conditions at 37 °C with 5% CO₂. After one passage, the medium was switched to an expansion medium consisting of DMEM-HG containing 2% FCS, with 10 ng ml⁻¹ recombinant human epidermal growth factor (Strathmann Biotech, Hamburg, Germany) and 10 ng ml⁻¹ recombinant human platelet-derived growth factor BB (Sigma–Aldrich, Deisenhofen, Germany) [20]. Human articular cartilage samples were obtained from patients diagnosed with osteoarthritis and undergoing total knee replacement surgery. Cartilage chips were carefully removed from the tibial plateau and condyles, and washed with PBS to avoid contamination by other cells. Human chondrocytes were isolated from cartilage by digestion with collagenase B (1.5 mg ml⁻¹) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and hyaluronidase (0.1 mg ml⁻¹) (Serva, Heidelberg, Germany), as described previously [21]. Human dermal fibroblasts were acquired from Promocell (Heidelberg, Germany). Chondrocytes and fibroblasts were expanded in the same medium as described above for osteoblasts. During expansion of all cell types, the medium was replaced two to three times each week.

2.5. Coating with hydrophobins and characterization of the surfaces by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and fluorescence microscopy

Coating of cell culture wells (96-well, Greiner, Frickenhausen, Germany) was performed with DewA, DewA–RGD or DewA–LG3 (each 200 μg ml⁻¹ in water) at 4 °C. All proteins contain a 6-His tag for purification, which can also be used for immunodetection.

After incubation overnight, the protein solution was removed and the surfaces blocked for 30 min (phosphate buffer solution (PBS) containing 0.1% Tween 20 and 5% milk powder). Blocking and all subsequent steps were done at room temperature. The primary antibody (anti-His antibody, GE Healthcare; diluted 1:3000 in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% milk powder) was applied for 1 h. After washing the wells thoroughly in PBS containing 0.1% Tween 20 four times for 5 min, the Cy3-conjugated secondary antibody (diluted 1:5000 in PBS containing 0.1% Tween 20; goat polyclonal secondary antibody to mouse IgG (Cy3), Dianova GmbH, Hamburg) was added. The wells were incubated for 1 h in the dark, washed as described above and air-dried. Next, 50 μl of PBS containing 0.1% Tween 20 was added to the wells and the samples analysed in a plate reader (Infinite® 200 PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland). The plate reader was adjusted with the excitation wavelength of 550 nm, an emission wavelength of 570 nm and 10 flashes per well. The same wells were characterized in a fluorescent microscope at 5× magnification (AxioImagerZ.1, Software: AxioVision V4.5; Camera: AxioCam MR; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.6. Adhesion of human cells

For the adhesion assay, culture wells (96-well plates, Greiner, Frickenhausen, Germany) were either left empty or exposed to solutions of 10 μg ml⁻¹ fibronectin (Calbiochem, Darmstadt, Germany) or DewA variants (2–200 μg ml⁻¹ in water) overnight at 4 °C. Wells were then washed twice with PBS. In order to block cell adhesion on possible uncoated areas, subsequent incubation with 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma) was performed for 2 h at room temperature, followed by a washing step with PBS. This

blocking step was also performed on the uncoated wells used as negative controls.

In order to exclude variations due to cell-specific expansion, the media, MSCs, chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts applied in adhesion assays were all expanded in the same low (2%) serum-containing medium as described above for osteoblasts. Cells expanded for three passages in this medium were trypsinized and resuspended in DMEM-HG without additives. Then 100 μl of DMEM-HG containing 10^4 cells was transferred to each well of 96-well plates in duplicate and incubated at 37 °C. After 1 h, the plates were washed with PBS using an ELISA washer (Anthos, Krefeld, Germany) to remove non-adhered cells. The remaining cells were fixed in 70% ethanol, washed and their nuclei stained with 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Hoechst dye (Sigma) at 37 °C. Three microscopic fields were photographed in each well (10 \times magnification) and the number of cells in each field was determined using the AxioVision software (Zeiss, Jena, Germany).

2.7. Proliferation assay

Ninety-six-well plates were coated as in detailed in Section 2.6. To analyse the proliferation rates on the coated surfaces, 4×10^3 MSCs per well was seeded in coated 96-well plates in triplicate. After 24 h, medium was replaced with fresh medium containing 0.25 μCi of [methyl- ^3H]thymidine (GE Healthcare, Germany) per well. Cells were incubated for 18 h, washed and lysed in 1% Triton X-100. Half the cell lysates were transferred into tubes containing 2 ml of scintillation cocktail (Perkin Elmer, Waltham, USA). Radioactivity was measured with a WinSpectral 1414 liquid scintillation counter (Perkin Elmer, USA). The remaining cell lysates were digested overnight at 60 °C with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ proteinase K (Roche, Germany) in Tris-HCl, pH 8. DNA concentrations were measured with a Quant iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Germany) according to the manufacturer's instructions.

2.8. Osteogenic differentiation and alkaline phosphatase activity assay

Twenty-four-well plates were coated as in Section 2.6: 3.5×10^4 MSCs were seeded on coated wells of 24-well plates and incubated at 37 °C. After 1 h, the plates were washed with PBS and osteogenic medium composed of DMEM-HG containing 10% FCS, 0.1 μM dexamethasone, 0.17 mM ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, Germany) and 1% penicillin/streptomycin was added. After 14 days, two wells each were used for assessment of alkaline phosphatase (ALP) enzyme activity. Cells were lysed with 1% Triton X-100 detergent in PBS, scraped off the plate and stored at -80 °C. ALP activity was assessed by diluting 50 μl of sample extract with 50 μl of ALP buffer (0.1 M glycine, 1 mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 , pH 10.4) and incubating with 100 μl of ALP buffer plus 1 mg ml^{-1} *p*-nitrophenylphosphate. The conversion to *p*-nitrophenol (*p*-NP) was measured spectrophotometrically at 405/490 nm after 1 h of incubation. The total protein concentration was determined with a Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, IL) according to manufacturer's instructions. The specific amount of ALP was evaluated as the amount of *p*-NP normalized with the amount of total protein.

2.9. Adipogenic differentiation

Twenty-four-well plates were coated as in Section 2.6: 3.5×10^4 MSCs in 400 μl of expansion medium were transferred on coated wells of 24-well plates and incubated at 37 °C. After 1 h, the plates were washed with PBS and adipogenic medium composed of DMEM-HG, containing 10% FCS, 0.01 mg ml^{-1} insulin, 1 μM dexamethasone, 0.2 mM indomethacin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl xanthine, 100 U ml^{-1} penicillin, and 100 mg ml^{-1} strep-

tomycin was applied for 3 weeks. After fixation of washed cells in 4% paraformaldehyde, they were stained with 0.5% Oil Red O to visualize intracellular triglycerides (Chroma, Germany) [19]. In order to quantify lipid accumulation, Oil Red O was extracted from the cells by incubation with 60% isopropanol for 2 h at 37 °C and the OD at 490 nm was subsequently measured. Total protein concentrations, determined with the Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit from parallel wells, were used for normalization.

2.10. Chondrogenic differentiation and quantification of proteoglycan content

For induction of chondrogenesis at high cell density in three-dimensional culture, spheroids were formed by inclusion of a cell suspension into fibrin (Tissucol Duo STM, Baxter, Unterschleissheim, Germany) as described previously [22]. A solution containing 70–110 mg ml^{-1} fibrinogen was diluted 1:15 in PBS containing 0 or 4 μg of DewA, and a solution containing 500 IU ml^{-1} of thrombin was diluted 1:50 in PBS. Some $4\text{--}5 \times 10^5$ MSCs were suspended in 25 μl of the diluted fibrinogen solution and mixed with 25 μl of diluted thrombin solution. Medium was changed three times within the next 30 min to adjust the pH. The materials were allowed to gel at 37 °C before chondrogenic medium, consisting of DMEM-HG supplemented with 5 mg ml^{-1} insulin, 5 mg ml^{-1} transferrin, 5 mg ml^{-1} selenous acid, 0.1 mM dexamethasone, 0.17 mM ascorbic acid-2-phosphate, 1 mM sodium pyruvate, 0.35 mM proline, 1.25 mg ml^{-1} BSA and 10 ng ml^{-1} transforming growth factor $\beta 3$ (TGF $\beta 3$; Sigma Aldrich), was added. Cells were kept in induction medium at 37 °C under 6% CO_2 for 42 days. After this period, spheroids were fixed and stained as described previously [23] according to standard procedures using Alcian blue (1%; Chroma, Köngen, Germany) or a monoclonal mouse anti-human collagen Type II antibody (clones I-8H5 and II-4C11, ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA). For quantification of proteoglycan content, differentiated spheroids (2 per donor) were washed with PBS and mechanically crushed in 0.5 ml of guanidine hydrochloride (GuHCl) extraction buffer (4 M GuHCl/100 mM Tris, pH 8.5). After incubation (30 min, 4 °C) and centrifugation (13,000 rpm, 15 min, 4 °C), extracted proteoglycan in the supernatant was quantified with Alcian blue following Björnsson [24]. In brief, chondroitin sulfate (3.125–200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was used as a standard. A 50 μl volume of SAT buffer (0.3% H_2SO_4 ; 0.75% Triton X-100 in aqua dist.) was added to 100 μl of supernatant before shaking for 15 min. One volume of Alcian blue stock solution (3% (w/v) Alcian blue (Roth) in 0.1% H_2SO_4 , 0.4 M GuHCl) was mixed with 5 volumes of SAT buffer and 9 volumes of H_2O ; 750 μl of this Alcian working solution was added. After 30 min at room temperature and shaking, the precipitate was harvested by centrifugation (15 min, 13,000 rpm, room temperature) and the supernatant rejected. The pellet was washed in 500 μl of dimethylsulphoxide buffer (40% DMSO; 0.05 M MgCl_2 in aqua dist.), kept at room temperature for 15 min, centrifuged (15 min, 20,000g) and the supernatant again rejected. In the following step, the pellet was dissolved in 500 μl of guanidine/propanol buffer (4 M GuHCl, 33% *n*-propanol; 0.25% Triton X-100). Two aliquots (200 μl) were transferred to 96-well flat-bottom plates and the absorbance was measured at 650 nm.

2.11. Adhesion of MSCs to titanium surfaces

Ti90/Al6/V4 (Goodfellow, London, UK) foil was cut into discs 13 mm in diameter using a water jet cutting system, and the discs were processed as described previously [25]. Briefly, the discs were sanded with 800, 1200 and 2500 grit silicon carbide paper, polished with colloidal silica on a ChemoMet Polishing Cloth, rinsed, sonicated twice in dichloromethane, acetone, methanol and Millipore water for 10 min each, dried in a stream of nitrogen and

stored under vacuum at 120 °C. Before use they were sonicated twice in dichloromethane, acetone, methanol and finally Millipore water for 10 min and dried in a stream of nitrogen.

Titanium discs were either left uncoated or were coated in 24-well plates under 700 μl of a solution of fibronectin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) or of the DewA variants (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) overnight at 4 °C and washed with PBS. Discs were blocked with 2% BSA for 2 h at room temperature and washed once with 1 \times PBS. MSCs from four donors were expanded in Verfaillie medium until passage 3. Prior to adhesion, MSCs were labelled with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; 10 mg ml^{-1} in DMSO; Invitrogen, Molecular Probes) for 30 min, agitating at 37 °C. Cells were washed twice and resuspended in DMEM at 10⁶ cells per ml. A 0.1 ml aliquot of the cell suspension was incubated on pretreated titanium discs for 1 h at 37 °C, washed using an ELISA washer (Fluido2, anthos), fixed in 70% ethanol for 20 min at 4 °C and embedded in Aquatex (Merck).

The discs were mounted on coverslips and imaged on a Zeiss Axioplan 2 microscope using the stitching function with 0% overlap and focus correction to produce a composed image of the complete titanium disc. Image analysis was performed with ImageJ version 1.43t, converting composed mosaics into 8-bit images. All images were processed equally before analysing the area fractions covered by cells. Briefly, the ImageJ “brightness and contrast” function was set to a minimum of 10 and a maximum of 50. This setting was tested in advance to subtract background signal, while permitting the detection of small single cell spots without increasing light scattering of brighter colonies. The “threshold” function was set to default algorithm in black and white mode. The settings for a lower and an upper limit were 0 and 100, respectively. The region of interest was defined as a circle with 8900 \times 8900 pixels framing the chip borders. Area fractions were retrieved applying the “measure” function.

2.12. Bacterial adhesion assay

The *S. aureus* strain ATCC 49230 (American Type Culture Collection) was grown overnight on Columbia blood agar plates and subsequently inoculated into trypticase soy broth (TSB; Becton Dickinson, Cockeysville, USA). The concentration of bacteria was determined using a McFarland standard (Densimat, bioMérieux). In order to stain bacteria, 10⁸ colony-forming units (CFU) in 1 ml of TSB was incubated with 10 μl of CFSE for 30 min at 31 °C. The bacteria were then washed twice by centrifugation and finally resuspended in TSB at 10⁸ CFU per ml.

Titanium discs were coated as described in Section 2.11. For bacterial adhesion on one disc in one well, 1 ml of bacterial solution with 10⁷ CFU of *S. aureus* in TSB was added and incubated for 1 h at 37 °C. Thereafter, the discs were washed thoroughly by dipping in PBS and fixed with 70% ethanol for 20 min. The discs were mounted on coverslips and imaged as described in Section 2.11, with settings for lower and upper cut-offs set at 0 and 40, respectively.

2.13. Statistics

Mean values and standard deviations were calculated for all variables. The non-parametric Wilcoxon test was applied for the analysis of differences in cell behaviour on different coatings. A two-tailed significance value of $p < 0.05$ was considered significant. Data analysis was performed with SPSS for Windows 16.0 (SPSS Inc., USA).

3. Results

3.1. Molecular modelling of genetically engineered DewA

In order to engineer cell-adhesive DewA surfaces, it was necessary to design genetically modified DewA variants. Among

peptide sequences promoting cell adhesion, the RGD sequence (DewA–RGD) and a 12 amino acid long LG3 sequence (DewA–LG3) were selected (Fig. 1A). Structure-prediction methods were used to generate a model of proteins comprising hydrophobin, fusion construct and binding domain (Fig. 1A, D and F) to elucidate where these DewA-binding adhesion motives would be accessible on the protein surface, as potential binding partners. Analysis of the models demonstrated that the protein comprises two distinct domains (DewA–RGD: hydrophobin domain MET52–VAL176, fusion-interaction domain MET1–ARG51). The hydrophobin domain exhibited a characteristic beta-barrel structure stabilized by cysteine-bridges (CYS99–CYS165, CYS102–CYS159, CYS103–CYS135, CYS166–CYS173 for DewA–RGD) and four beta-sheets (ILE100–CYS103, CYS135–LYS137, ILE162–CYS165, CYS173–VAL176 for DewA–RGD), while the binding domains formed an unstructured conformational ensemble at the N-terminus of the fusion-protein domain. Additionally, two large unstructured hydrophobic loops were identified which give the hydrophobin its characteristic amphipathicity (SER105–SER133 and LYS137–PRO157 for DewA–RGD). Two populations of different solvent exposure of the RGD motif were identified among simulated ensembles seen in Fig. 1C. Most structures in the ensemble exhibited tightly packed helical folds for the truncated fusion protein domain and no apparent secondary structure for the RGD motif. While the lowest energy structure of the complex featured a solvent exposure of 80 Å^2 per amino acid of the motif, the second cluster, with a mean solvent exposure of 150 Å^2 per amino acid, was separated by less than 1 kcal mol^{-1} . Models from both clusters showed the RGD motif to be exposed to the solvent. Fig. 1D illustrates that the best energy model for the RGD motif lies in plane with the hydrophobic amino acids of the hydrophobin. When estimating the partition between the two populations at 120 Å^2 surface area per amino acid, the population of structures with a mean accessible surface of about 80 Å^2 comprised 9100 members, while the population with a mean accessible surface area of about 150 Å^2 comprised 6000 members. The overall ratio was therefore roughly 2:3. The best energy structure was found in the 80 Å^2 population.

A mean solvent exposure of the LG3 motif of 80 Å^2 per amino acid was found inside the single cluster of simulated models (Fig. 1E). Compared to the RGD structure, the LG3 motif may tend to be less exposed to the solvent in the tertiary fold. Observed tight packing of the binding peptide to the fusion domain can be explained by the large number of hydrophobic amino acids in the LG3 sequence (Fig. 1A); however, the low-energy ensemble contained many models in which a large fraction of LG3 is exposed to the solvent. Modelling showed that both DewA fusion proteins may be able to enhance cell adhesion; therefore, these proteins were synthesized and purified for subsequent testing.

3.2. Coating surfaces with DewA fusion proteins

Hydrophobin and modified hydrophobins were expressed in *E. coli* and purified as described in Materials and methods. Cell culture wells were coated with the hydrophobin-containing fraction at a concentration of 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and incubated overnight at 4 °C. To ensure that comparable coatings were obtained, surfaces were characterized for the amount of bound hydrophobin using antibodies derived against the His tag of the proteins. Primary antibody detection was achieved with a Cy3-labelled secondary antibody. Fluorescence levels were quantified in a plate reader (ELISA) and suggested comparable amounts of bound protein (Fig. 2A). In addition, wells were analysed by immunofluorescence microscopy to assess spatial distribution of the proteins (Fig. 2B). Fluorescent images confirmed the ELISA data of comparable protein amounts, and also revealed that hydrophobins were

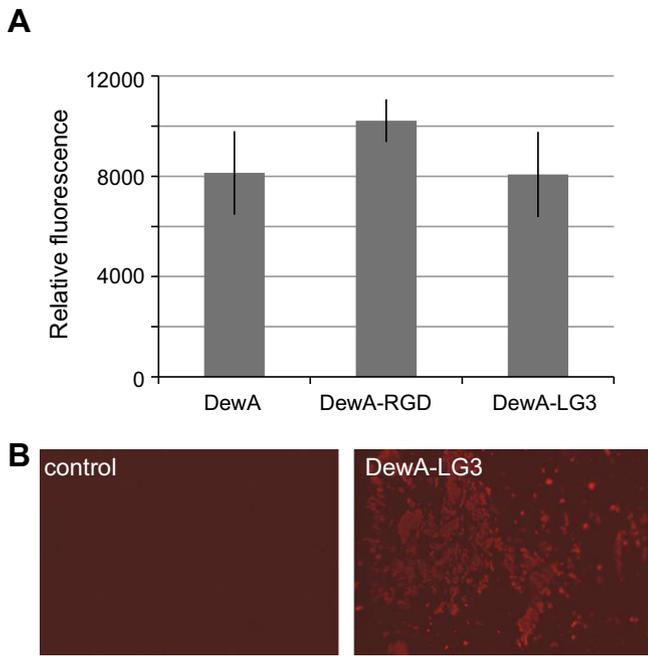


Fig. 2. Characterization of hydrophobin-coated culture wells. (A) Quantification of the relative fluorescence. For each sample the bottoms of five wells were analysed for fluorescence at five spots each in a plate reader. Excitation of Cy3 was achieved with 10 flashes. The mean value of all measurements was corrected for the value obtained in the control (PBS with Tween). (B) Immunofluorescence of the wells. Pictures of the control and the DewA-LG3 coated well were corrected for contrast and brightness using identical parameters. Pictures for DewA-RGD and DewA are not shown. Scale bar = 200 μm .

heterogeneously distributed, resulting in an unevenly coated surface.

3.3. Cell adhesion on surfaces coated with DewA fusion proteins

Adhesion of MSCs was tested on surfaces coated with DewA, DewA-RGD, DewA-LG3 and fibronectin, a common component of wound fluid which is expected to coat implants *in vivo* and was used as a positive control. Adhesion on laminin was analysed in preliminary experiments and showed similar levels as fibronectin for all cell types (data not shown). Both modified DewA proteins showed significantly elevated levels of MSC adhesion compared to wild-type DewA (Fig. 3A). Adhesion to DewA-RGD and DewA-LG3 remained significantly lower than with fibronectin ($p < 0.05$). At a concentration of 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, adhesion to DewA-RGD was significantly higher than with DewA-LG3 ($p = 0.031$).

In order to test other cell types relevant to the context of bone, adhesion of osteoblasts, chondrocytes and fibroblasts (four donors each) were quantified on surfaces coated with 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DewA variants. More cells from each cell type tended to adhere to DewA-RGD and DewA-LG3 than DewA, which suggests a similar pattern as with MSCs (Fig. 3B); however, the differences were not significant, possibly owing to the low number of donors (i.e. low sample size).

3.4. Proliferation of MSCs on DewA surfaces

In order to assess whether DewA-coated surfaces have cytotoxic effects, proliferation of MSCs on surfaces coated with DewA, DewA-RGD and DewA-LG3 was monitored as [^3H] thymidine uptake over 18 h incubation (Fig. 3C). DNA concentrations

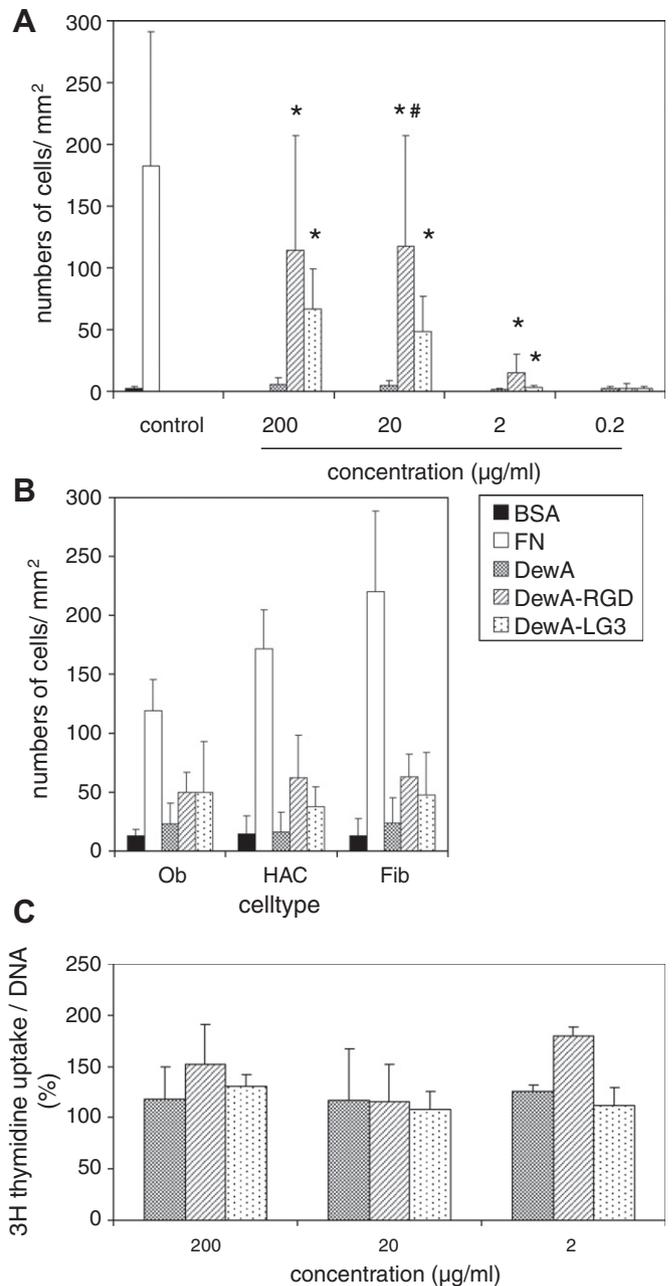


Fig. 3. Cell adhesion and proliferation on surfaces coated with DewA variants. For the quantification of cell adhesion, cells were allowed to adhere for 1 h. After fixation, the number of adherent cells per mm^2 was counted in three randomly selected photographic fields. (A) MSCs ($n = 7$ donors) were allowed to adhere to surfaces coated with BSA (2%), fibronectin (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and various concentrations of the hydrophobins DewA, DewA-RGD and DewA-LG3. *Significant difference in comparison to DewA at the same concentration and to fibronectin; #significant difference in comparison to DewA-LG3 at the same concentration ($p < 0.05$). (B) Osteoblasts (Ob), chondrocytes (HAC) and fibroblasts (Fib) were allowed to adhere to surfaces coated with BSA, fibronectin and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of DewA, DewA-RGD and DewA-LG3 ($n = 4$ donors, for each cell type). (C) The [^3H] thymidine uptake of MSCs ($n = 3$) with uncoated surfaces and on surfaces coated with DewA, DewA-RGD and DewA-LG3 were quantified and normalized with DNA content. Thymidine uptake is shown as uptake measured in MSCs on uncoated wells (%).

of cell lysates after incubation with [^3H] thymidine were used to normalize [^3H] thymidine uptake for cell numbers on the different coated surfaces. Coating with different concentrations of the DewA variants did not significantly affect proliferation of MSCs.

3.5. Differentiation of MSCs in the presence of DewA

MSCs were seeded in coated and uncoated cell culture wells, and osteogenic and adipogenic differentiation were induced. The ALP activity in MSCs after 3 weeks of *in vitro* osteogenesis did not differ between the uncoated surface and the surfaces coated with fibronectin or DewA variants (Fig. 4A). The adipogenic differentiation potential of MSCs was also not affected by the different coatings, which is indicated by equal levels of Oil Red O-stained intracellular triglyceride accumulation (Fig. 4B–D).

In order to evaluate a possible effect of DewA on chondrogenesis, MSCs were embedded into a fibrin gel in the presence or absence of DewA. Chondrogenic differentiation was induced by a chondrogenic medium containing 10 ng ml^{-1} TGF β 3. The immunohistochemical analysis of MSC pellets after 42 days' induction revealed similar chondrogenic differentiation with or without DewA (Fig. 4E–H). There was a trend for lower proteoglycan deposition in the presence of DewA (77% of control), but this was not significant; therefore, DewA and the variants DewA–RGD and DewA–LG3 showed no evidence of interference with the differentiation potential of MSCs.

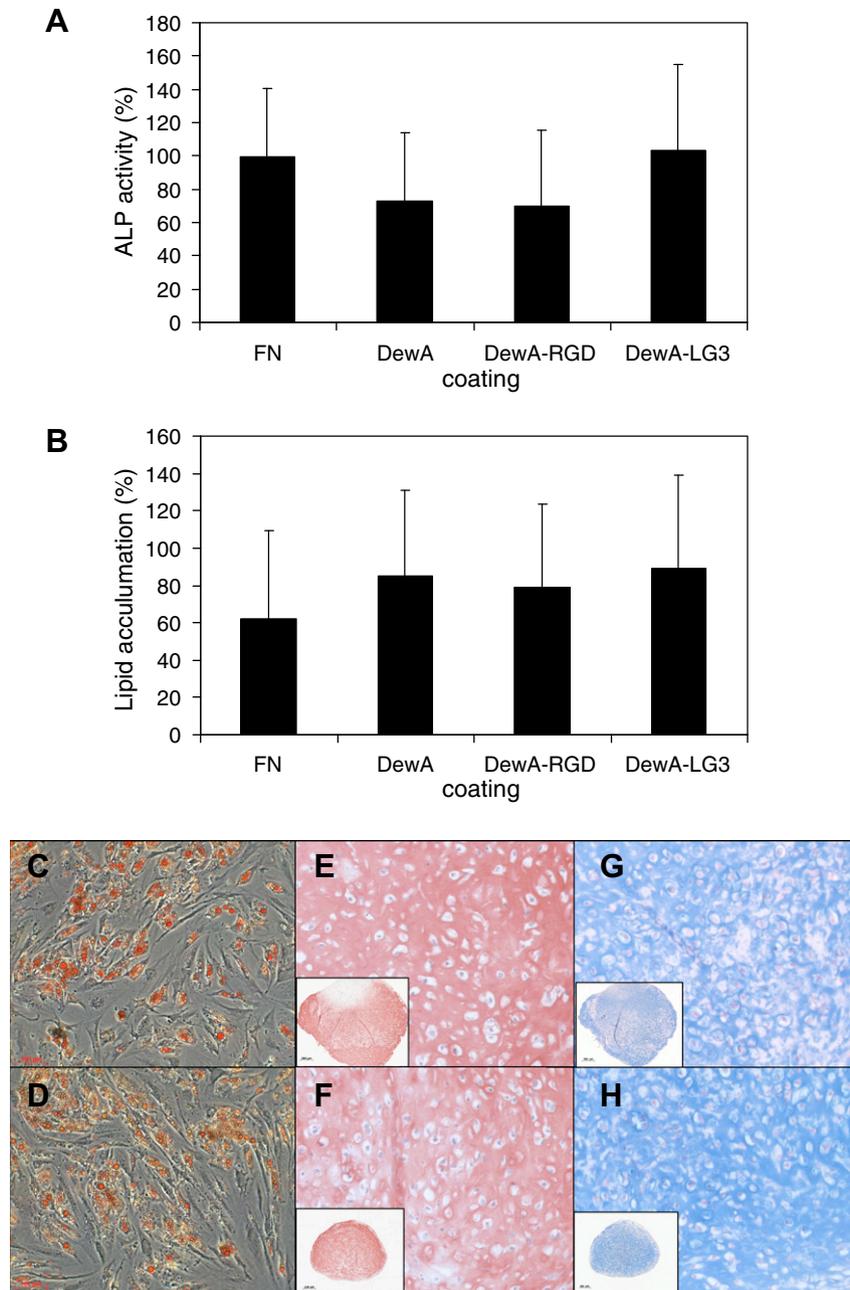


Fig. 4. Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of MSCs in the presence of DewA. Osteogenic and adipogenic differentiation was induced in MSCs ($n = 3$) seeded on cell culture wells coated with fibronectin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), DewA, DewA–RGD and DewA–LG3 ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) or left uncoated. All wells were blocked with BSA to cover uncoated areas. Osteogenic differentiation was quantified after 14 days by assessing alkaline phosphatase enzyme activity in cell lysates and normalized with protein concentrations. Enzyme activity is shown as a percentage of the activity of MSCs in uncoated wells (A). After 21 days of adipogenic differentiation, the Oil Red O incorporation in MSCs was quantified and expressed in relation to levels in MSCs differentiated on uncoated wells (B). A representative example of MSCs after adipogenesis on an uncoated well (C) and on a well coated with DewA ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) (D). Chondrogenic differentiation of MSCs ($n = 5$) was induced in pellets formed with fibrin glue only (E, G), and with fibrin glue supplemented with DewA (F, H). After 42 days, collagen Type II accumulation was evaluated by immunohistochemistry (E, F) and the accumulation of proteoglycans by Alcian blue staining (G, H). Representative pellets from one donor are shown.

3.6. Adhesion of MSCs and *S. aureus* to titanium surfaces

In order to test the functionality of modified DewA variants in a setting similar to the *in vivo* conditions in patients, titanium was used as a coating substrate. Coating was performed as previously and a similar level of adsorption as observed on the plastic wells was assumed. This hypothesis could be further analysed in future work. MSCs stained with CFSE were exposed for 1 h to coated and uncoated titanium discs. After washing, the entire surface of the titanium discs was photographed (Fig. 5A) and the percentage of the disc covered with MSCs was quantified (Fig. 5F). MSC adhesion with DewA–RGD was significantly higher compared to MSC adhesion with DewA and the negative control ($p = 0.014$ for both). For DewA–LG3, a minor but non-significant trend was observed.

Subsequently, we tested whether insertion of sequences promoting cell adhesion in DewA would modify interactions with bacteria, potentially affecting the risk of implant infection. This was achieved by quantifying the adhesion of *S. aureus* on DewA-coated titanium surfaces. Mimicking *in vivo* conditions in patients, an *S. aureus* strain primarily isolated from a patient with chronic osteomyelitis was used. Some 10^7 CFU of *S. aureus* stained with CFSE was exposed to titanium discs for 1 h. After washing, the entire surface of the titanium discs was photographed (Fig. 6A) and the percentage of the disc covered with bacteria was estimated (Fig. 6F). Bacterial adhesion was highest on titanium coated with fibronectin. Surfaces coated with DewA, DewA–RGD and DewA–LG3 showed similar levels of adhesion, which was significantly higher than for uncoated surfaces and significantly lower than surfaces pre-exposed to fibronectin ($p < 0.05$). DewA on titanium resulted in less bacterial adhesion than fibronectin, while the insertion of cell adhesion motifs in DewA did not increase the adhesion potential of *S. aureus* further, indicating that the bacteria, unlike other cells, did not use the RGD motif for attachment.

4. Discussion

Hydrophobins are interesting candidates for use in medical applications based on their ability to self-assemble and form thin, stable layers, as well as their apparent absence of immunogenicity and toxicity [3]; however, hydrophobins appear to be incapable of mediating mammalian cell adhesion. We have shown that adhesion of various human cell types to hydrophobin DewA is low after 1 h, and not significantly higher relative to uncoated tissue culture or titanium surfaces. Similar behaviour has been observed with the class I hydrophobin SC3, where only low numbers of fibroblasts were found after 3 days of incubation, and there was no measurable effect on proliferation [1]. Another example of this was the low numbers of rat neuronal stem cells found on surfaces coated with the hydrophobin HFBI after 24 h incubation [26]. Our data support these previous findings, showing that human cell adhesion is indeed low on surfaces coated with a class I hydrophobin.

In order to benefit from the biophysical properties of hydrophobins in applications where cell adhesion is requested, the engineering of genetically modified hydrophobins by insertion of motifs allowing cell anchoring appears to be an attractive strategy. Consequently, our construction of the two modified variants of DewA, in which the RGD [11] and the laminin globular domain LG3 [13] binding sites for integrin receptors were inserted, improved adhesion. Coatings with DewA molecules bearing one RGD or one LG3 motif allowed significantly greater adhesion compared to DewA in tissue culture wells; therefore, creating cell adhesive surfaces can be achieved with these fusion proteins.

Models of these fusion proteins exhibited a two-domain structure. Hydrophobins can be identified by a distinct sequence motif of eight cysteine amino acids, which form a very stable beta-barrel-fold structure due to four intramolecular disulphide bonds [14]. One of the domains of the fusion proteins corresponded predictably to an intact amphipathic DewA domain with a large hydrophobic patch, which may be involved in impairing cell adhe-

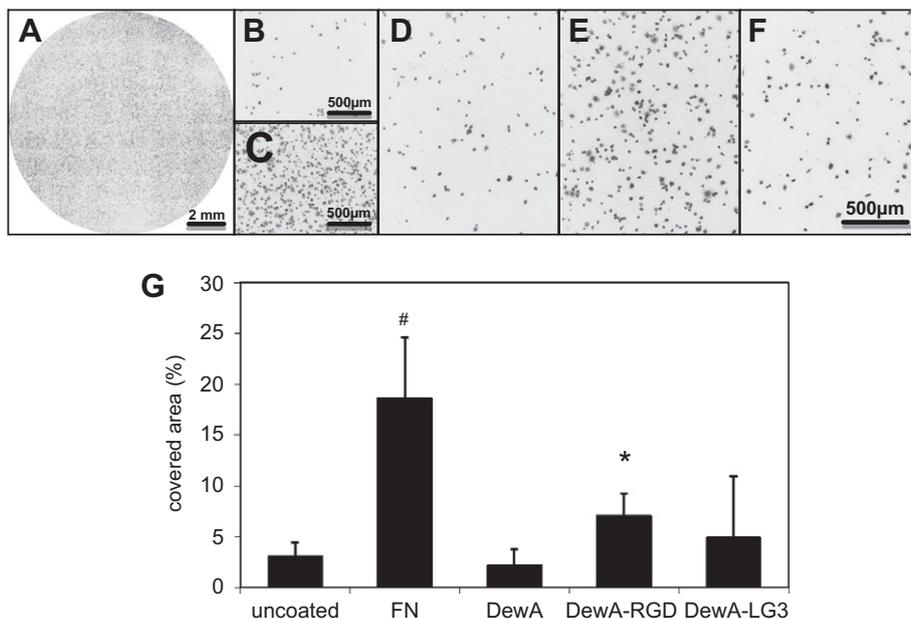


Fig. 5. Adhesion of MSCs on titanium discs coated with fibronectin and DewA variants. Fluorescent images of MSCs stained with CFSE on the coated surface of titanium discs were converted to black and white 8-bit images. An overview on a representative titanium disc coated with fibronectin (A) and detailed views on an uncoated disc (B) and discs coated with fibronectin (C), DewA (D), DewA–RGD (E) and DewA–LG3 (F). The fraction of the surface of the disc covered with MSCs was quantified using the “measure” function of ImageJ and is shown as a percentage (G). *Significantly higher than DewA and uncoated; #significantly higher than all other surfaces ($p < 0.05$).

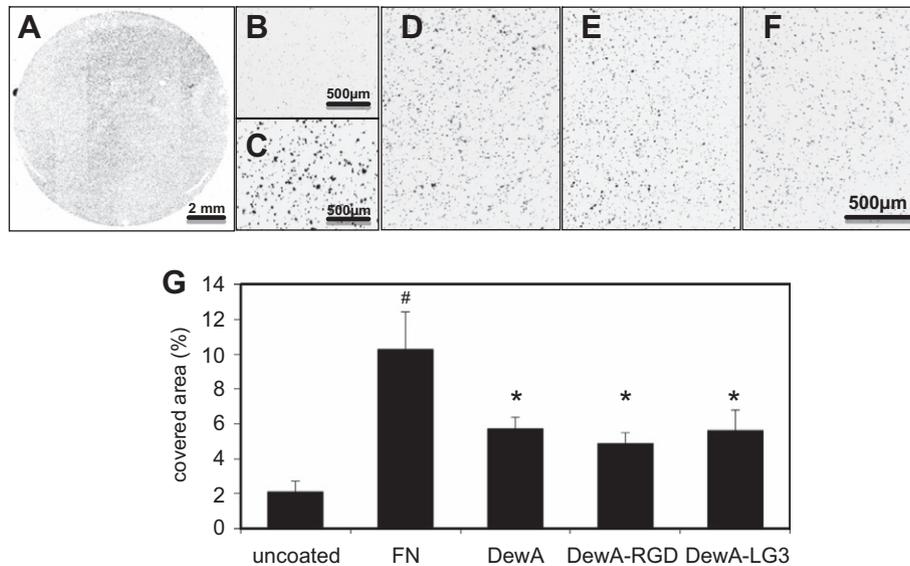


Fig. 6. Adhesion of *S. aureus* to titanium discs coated with fibronectin and DewA variants. Fluorescent images of *S. aureus* stained with CFSE on the coated surface of titanium discs were converted to black and white 8-bit images. An overview of a representative titanium disc coated with fibronectin (A) and detailed views on an uncoated disc (B) and discs coated with fibronectin (C), DewA (D), DewA-RGD (E) and DewA-LG3 (F). The fraction of the surface of the disc covered with *S. aureus* was quantified using the "measure" function of ImageJ and is shown as a percentage (G). *Significantly lower than fibronectin, significantly higher than uncoated; #significantly higher than uncoated ($p < 0.05$).

sion as seen in the experiments. Both RGD and LG3 motifs are part of the second domain, including the fusion peptide, and are found to be exposed at least partially in many of the low-energy models. The RGD motif was identified as facing the same side as the hydrophobic loops, indicating that it is exposed to area accessible by cells, which is supported by the experimentally observed increased adhesion of cells to the engineered binding-peptide mutants.

On the basis of the proposed orientation (hydrophobic loop up) of the DewA-RGD variant, we estimate an area of 13 nm^2 per protein/RGD motif or 8×10^{10} ligands per mm^2 for perfect packing, but the apparent surface density is lower. We can estimate the covered surface for a DewA-RGD covering used in the cell adhesion studies as about 20% of the total surface. This was estimated by counting the fluorescent pixels on a sample of about 1 mm^2 . A similar surface density of RGD was reported by Le Saux et al. [27]. Using a variety of mirror-polished and etched silicone materials, they investigated the influence of RGD ligand density and surface roughness for endothelial cell adhesion. For an observed RGD density of 6×10^{11} ligands per mm^2 , they report 700 endothelial cells mm^{-2} for a mirror-polished surface, which fell to 300 cells mm^{-2} for a silicone surface etched for 10 min. Adherent endothelial cells featured a mean cell surface of $400 \mu\text{m}^2$. The cells used in this investigation featured a surface area of roughly $700\text{--}1000 \mu\text{m}^2$. Our investigations were done in cell culture wells of unknown roughness; however, the number of cells for the fibronectin positive control is comparable to the etched silicone (300 vs. 180 cells mm^{-2}), considering the increased surface area of the stem cells. The efficiency of 60% of the RGD-modified hydrophobin construct in comparison to the fibronectin-positive control can be explained by the unordered surface coverage of 20%. An expected efficiency of 20% is incorrect, as shown by Le Saux et al. [27]. They showed that a decreased RGD ligand density can actually lead to increased endothelial cell binding. Our sample showed unordered ligand densities; therefore a lower efficiency is to be expected.

Furthermore, it should be noted that surface coating with DewA was heterogeneous in this study. Whereas the *A. nidulans* hydrophobin RodA is able to form rodlets on the spore surface, DewA does not have this ability [28,29]. Rodlet formation on arti-

ficial surfaces has not yet been observed for either DewA (Fig. 2B) or RodA (unpublished data). More homogeneous surfaces can be obtained at higher temperatures, as was discovered in an independent project [30]; however, as the amount of each DewA variant on the cell culture wells was the same, this heterogeneity did not interfere with the differences observed between them.

The RGD cell attachment site has been described well, and it allows cell adhesion that can be mediated through about half of the existing integrin receptors [12]. Adhesion to the globular domain of laminin has been shown to be mediated by the 12 amino acid motif PPFLLMLLKSTR [13]. Adhesion to this domain is mediated by the integrin $\alpha 3\beta 1$, as has been shown for human keratinocytes [13] and MSCs [31]. As integrin $\alpha 3\beta 1$ does not play an important role in adhesion to RGD motifs [32,33], adhesion to the modified DewA variants bearing the RGD and LG3 motif is likely mediated by different integrins. Relatively low adhesion on DewA-LG3 could be attributable either to a less exposed conformation of the fusion protein or to differential adhesion potentials of cells to RGD and LG3. However, as a further development, our results raise the possibility of creating DewA surfaces that target different cell adhesion receptors, which could allow selective adhesion of specific cell types.

Proliferation of MSCs on DewA surfaces was not altered in comparison to fibronectin or uncoated cell culture wells. This is in line with studies of other hydrophobins showing the absence of cytotoxicity [1,26]. Nonetheless, the differentiation potential of MSCs in contact with hydrophobins has not previously been analysed. Our study demonstrated that DewA does not affect the differentiation potential of MSCs towards the osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineage. Moreover, DewA fusion proteins including RGD and LG3 did not modify the potential of MSCs for osteogenic and adipogenic differentiation. The differences in cell adhesion of these molecules, in comparison to fibronectin, did not appear to be relevant to the differentiation of MSCs over several weeks. Studies have reported a stimulatory effect of RGD and a larger sequence from the LG3 domain on osteogenic differentiation in experimental settings that differed substantially from ours [31,34]. Under the conditions used in our study, such an effect was not observed;

however, hydrophobins could permit the design of surfaces with osteoinductive properties, for example by combining DewA–RGD or DewA–LG3 coatings with DewA proteins fused to modular peptides that promote osteogenic differentiation [35].

Infections of prosthetic implants represent a serious complication with potentially devastating consequences [9]. Bacterial adhesion represents the first step leading to the formation of biofilms, which are crucial for the virulence of the infection. Adhesion of *S. epidermidis* on fibronectin has been extensively analysed and has been shown to correlate to the potential for biofilm formation on fibronectin [36]. Until now, the interaction of hydrophobins with bacteria typically implicated in nosocomial infections has not been investigated. Although we found a higher adhesion of *S. aureus* to titanium coated with DewA than on uncoated titanium, bacterial adhesion to DewA was significantly lower than with fibronectin, a common component of wound fluid. This finding suggests that our adhesion assay of surfaces coated with DewA, DewA–RGD or DewA–LG3 equally induce lower bacterial adhesion than fibronectin, which may form a coating on the titanium immediately post-implantation. Even more importantly, bacterial adhesion was not enhanced by the insertion of motifs that allow anchoring of human cells, which agrees with the hypothesis that, relative to other cells, bacteria uses an alternative form of attachment. This indicates that our insertion of the RGD motif to encourage adhesion to human cells would not increase the risk of infectious bacteria attaching to these surfaces. Overall, DewA–RGD thus appears to be an attractive coating to produce surfaces with enhanced human cell adhesion, but which do not support bacterial biofilm formation.

5. Conclusions

We have shown that a scalable synthesis of hydrophobins bearing motifs encouraging anchoring of human cells is possible, and these hydrophobins can be used to produce surfaces enhancing the adhesion of human cells such as MSCs, osteoblasts, fibroblasts and chondrocytes. Furthermore, these modified hydrophobins did not interfere with the functionality of MSCs. The enhanced cell adhesion on surfaces coated with the modified hydrophobins DewA–RGD and DewA–LG3 could therefore be coupled to proliferation and differentiation of MSCs on these surfaces, allowing good integration of the coated surface with the neighbouring tissue. Improved cell adhesion potential of human cells on these surfaces was not coupled with enhanced bacterial adhesion and therefore does not introduce increased risk of bacterial infection.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Landesstiftung Baden-Württemberg (P-LS-Biomat/31). The authors would like to thank Dr. C. Bollschweiler, BASF SE, for support and advice for production of the hydrophobins, Prof. Maike Stiesch for providing titanium discs and Simone Gantz for statistical support.

Appendix A. Figures with essential colour discrimination

Certain figures in this article, particularly Figs. 1, 2 and 4, are difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the on-line version, at [doi:10.1016/j.actbio.2011.11.022](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.022).

References

- Janssen MI, van Leeuwen MB, Scholtmeijer K, van Kooten TG, Dijkhuizen L, Wosten HA. Coating with genetic engineered hydrophobin promotes growth of fibroblasts on a hydrophobic solid. *Biomaterials* 2002;23:4847–54.
- Gebbink MF, Claessen D, Bouma B, Dijkhuizen L, Wosten HA. Amyloids – a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:333–41.
- Scholtmeijer K, Wessels JG, Wosten HA. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:1–8.
- Wösten HA. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:625–46.
- van Wetter MA, Wösten HA, Wessels JG. SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Mol Microbiol* 2000;36:201–10.
- Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 2009;460:1117–21.
- Groll J, Fiedler J, Bruellhoff K, Moeller M, Brenner RE. Novel surface coatings modulating eukaryotic cell adhesion and preventing implant infection. *Int J Artif Organs* 2009;32:655–62.
- Boeuf S, Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem Cell Res Ther* 2010;1:31.
- Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:349–56.
- Wohlleben W, Subkowski T, Bollschweiler C, von Vacano B, Liu Y, Schrepp W, et al. Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *Eur Biophys J* 2010;39:457–68.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987;238:491–7.
- Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003;24:4385–415.
- Kim JM, Park WH, Min BM. The PPFLLMLLKGSTR motif in globular domain 3 of the human laminin-5 alpha3 chain is crucial for integrin alpha3beta1 binding and cell adhesion. *Exp Cell Res* 2005;304:317–27.
- Kwan AH, Winefield RD, Sunde M, Matthews JM, Haverkamp RG, Templeton MD, et al. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3621–6.
- Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* 1970;48:443–53.
- Eswar N. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. New York: John Wiley & Sons; 2001.
- Verma A, Wenzel W. A free-energy approach for all-atom protein simulation. *Biophys J* 2009;96:3483–94.
- Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, Pei J, et al. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins* 2009;77(Suppl 9):89–99.
- Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 2003;48:418–29.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615–25.
- Benz K, Breit S, Lukoschek M, Mau H, Richter W. Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:284–92.
- Dickhut A, Gottwald E, Steck E, Heisel C, Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo. *Front Biosci* 2008;13:4517–28.
- Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum* 2006;54:3254–66.
- Bjornsson S. Simultaneous preparation and quantitation of proteoglycans by precipitation with alcian blue. *Anal Biochem* 1993;210:282–91.
- Heuer W, Winkel A, Kohorst P, Lutzke A, Pfaffenroth C, Menzel H, et al. Assessment of the cytocompatibility of poly-(N-hexylvinylpyridinium) used as an antibacterial implant coating. *Adv Eng Mater* 2011;12:B609–17.
- Li X, Hou S, Feng X, Yu Y, Ma J, Li L. Patterning of neural stem cells on poly(lactic-co-glycolic acid) film modified by hydrophobin. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;74:370–4.
- Le Saux G, Magenau A, Böcking T, Gaus K, Gooding JJ. The relative importance of topography and RGD ligand density for endothelial cell adhesion. *PLoS ONE* 2011;6:e21869.
- Stringer MA, Dean RA, Sewall TC, Timberlake WE. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev* 1991;5:1161–71.
- Stringer MA, Timberlake WE. DewA encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol Microbiol* 1995;16:33–44.
- Rieder A, Ladnorg T, Wöll C, Obst U, Fischer R, Schwartz T. The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on *E. coli* and natural mixed culture biofilm formation. *Biofouling* 2011;27:1073–85.
- Klees RF, Salaszyk RM, Ward DF, Crone DE, Williams WA, Harris MP, et al. Dissection of the osteogenic effects of laminin-332 utilizing specific LG domains: LG3 induces osteogenic differentiation, but not mineralization. *Exp Cell Res* 2008;314:763–73.

- [32] Wu C, Chung AE, McDonald JA. A novel role for alpha 3 beta 1 integrins in extracellular matrix assembly. *J Cell Sci* 1995;108:2511–23.
- [33] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:697–715.
- [34] Taubenberger AV, Woodruff MA, Bai H, Muller DJ, Hutmacher DW. The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation. *Biomaterials* 2010;31:2827–35.
- [35] Lee JS, Lee JS, Murphy WL. Modular peptides promote human mesenchymal stem cell differentiation on biomaterial surfaces. *Acta Biomater* 2010;6:21–8.
- [36] Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol* 2010;75:187–207.

HYDROPHOBINS – Using hydrophobins to prevent microbial biofilm growth on mineral surfaces

Rieder A. (1), Schwartz T. (1), Obst U. (1), Bollschweiler C. (2), Gutt B. (3), Zoller J. (3), Fischer R. (3)*

(1) Department of Microbiology of Natural and Technical Surfaces, Institute of Functional Interfaces (IFG), Karlsruhe Institute of Technology (KIT), e-mail: thomas.schwartz@kit.edu

(2) BASF SE, e-mail: claus.bollschweiler@basf.com

(3) Department of Microbiology, Institute for Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology (KIT)
e-mail: reinhard.fischer@kit.edu

*Coordinator of the project

Introduction

Microbial biofilms are an extremely successful way of life. Bacteria and fungi benefit in this symbiotic life form of metabolic exchange, protection and genetic flexibility. They produce a matrix of organic molecules in which they are embedded and which offers new habitats to other organisms, such as other bacteria or fungi. Biofilms cannot be avoided to colonize surfaces in unsterile habitats. So, they can be found everywhere in nature and in technical systems, but they play an ambivalent role. On the one hand biofilms are essential to degrade and transform water contaminations, but on the other hand they can diminish product qualities and damage capital equipment. Biofilms can cover medical equipment such as catheters and pathogenic bacteria, which may be living in the biofilms, are a continuous source of infection of the patients. In addition, the metabolism of the biofilm microorganisms may change the composition of the fluids or contaminate them with their products. As biofilms are all-round, the understanding of the biofilm formation and its manipulation are of prime importance in microbiology and material sciences.

The choice of a material and the corresponding surface properties like mechanical properties, structure, polarity, and chemistry influence the binding of various molecules and cells. The surface properties affect the biocompatibility of

a material and consequently also bacterial adhesion, and biofilm growth. In this project hydrophobins are used as a novel modification of surfaces to change surface properties like hydrophobicity and thus might have an effect on biofilm formation.

Hydrophobins are fungal proteins, which self-assemble on hydrophobic as well as hydrophilic surfaces into extremely stable monolayers. Recombinant hydrophobins provide the opportunity to use these highly surface-active proteins for large-scale surface coatings. Hydrophobins are non-toxic and can be used for surface modification and functionalization (with e.g. enzymes) of industrial relevant materials like steel, plastics, and ceramics.

In this project hydrophobin coated surfaces and their properties are studied with respect to bacterial cell adhesion, cell differentiation, and cellular growth with the aim to influence biofilm formation.

In the first part of the project recombinant hydrophobins were produced and purified. Different surfaces were coated with hydrophobins and characterized, since the coating efficiency is the basis for subsequent biofilm formation studies. Biofilms were grown on natural as well as hydrophobin coated surfaces and different methods were established to analyse biofilm formation.

Since the hydrophobin coated surfaces did not reduce microbial growth, we designed modified fusion hydrophobins and attached cationic antimicrobial peptides (AMPs) to the hydrophobins.

1. Hydrophobins

Hydrophobins are small proteins with about 100 amino acids, which are produced by filamentous fungi. In nature they coat the surface of fungal spores to ease the growth out of the ground and to protect the spore itself. It is recently known that hydrophobins also prevent the human immune recognition of airborne fungal spores.

There are two classes of hydrophobins, which only differ in the arrangement of eight highly conserved cysteine residues. Self-assembled monolayers formed by class I hydrophobins are more stable than those formed by class II hydrophobins. For our research we are using DewA, which is produced by *Aspergillus nidulans* and belongs to the class I hydrophobins. Since hydrophobins are highly surface-active they can easily be used for surface modification and functionalization. Until recently, the use of hydrophobins for large-scale surface coatings has been prevented by the fact that they had to be isolated from fungal cultures in a lengthy process. Recently the BASF SE achieved a breakthrough and established an expression system for the large-scale production of hydrophobins.

1.1 Fusion hydrophobins

Based on the large-scale industrial production, it is now possible to obtain large amounts of hydrophobins in a comparatively short time, but due to their characteristics, the hydrophobins

had to be produced as so called fusion hydrophobins. The BASF SE provides two fusion hydrophobins for surface coating. The available fusion hydrophobins are composed of the class I hydrophobin DewA of *Aspergillus nidulans* and a fusion partner. The fusion partner is the synthase yaaD of *Bacillus subtilis* in complete respectively shortened form (Figure 1). The synthase is used to lead the hydrophobin into the inclusion bodies in *Escherichia coli* for the purification. H*Protein B has the shortest version of yaaD which still works as a leader. The fusion hydrophobins have a mass of 47 kDa respectively 19 kDa, whereas the hydrophobin part itself has a mass of only 10 kDa. In fusion hydrophobin H*Protein A the hydrophobin part forms 20%, in H*Protein B 50% of the total protein mass.

1.2 Modification of the fusion hydrophobins

Because of the lack of being antimicrobial by itself, we modified the fusion hydrophobins. We used cationic antimicrobial peptides (AMPs), which are only 9 to 50 amino acids in size and are proven to be active against bacteria and even against yeasts and filamentous fungi. They are an alternative to antibiotics and do not affect human cells. Until now there is no resistance known. The AMPs were fused to the N-terminus of the long and short version of the yaaD in the expression vector or pQE60 (Figure 2). The modified plasmids (pHHC-011, pHHC-012, pF1-011 and pF1-012) were transformed into *E. coli* BL21. The induction of the expression was performed with 0.5mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) at OD₆₀₀ 0.6 to 1.0; we let the culture grow over night. The purification of the modified fusion hydrophobins

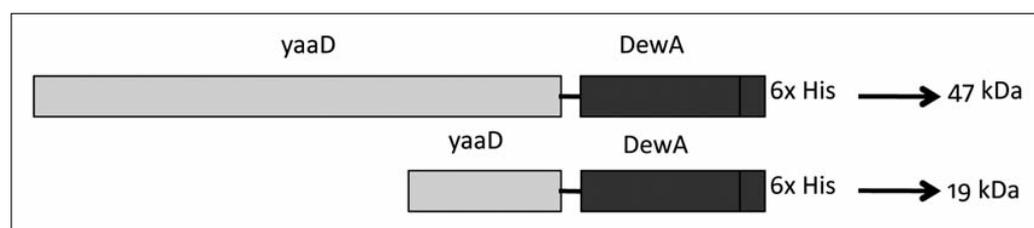


Figure 1: The fusion hydrophobins consist of the synthase yaaD in complete (H*Protein A) respectively shortened (H*Protein B) form, the class I hydrophobin DewA and a C-terminal His-tag.

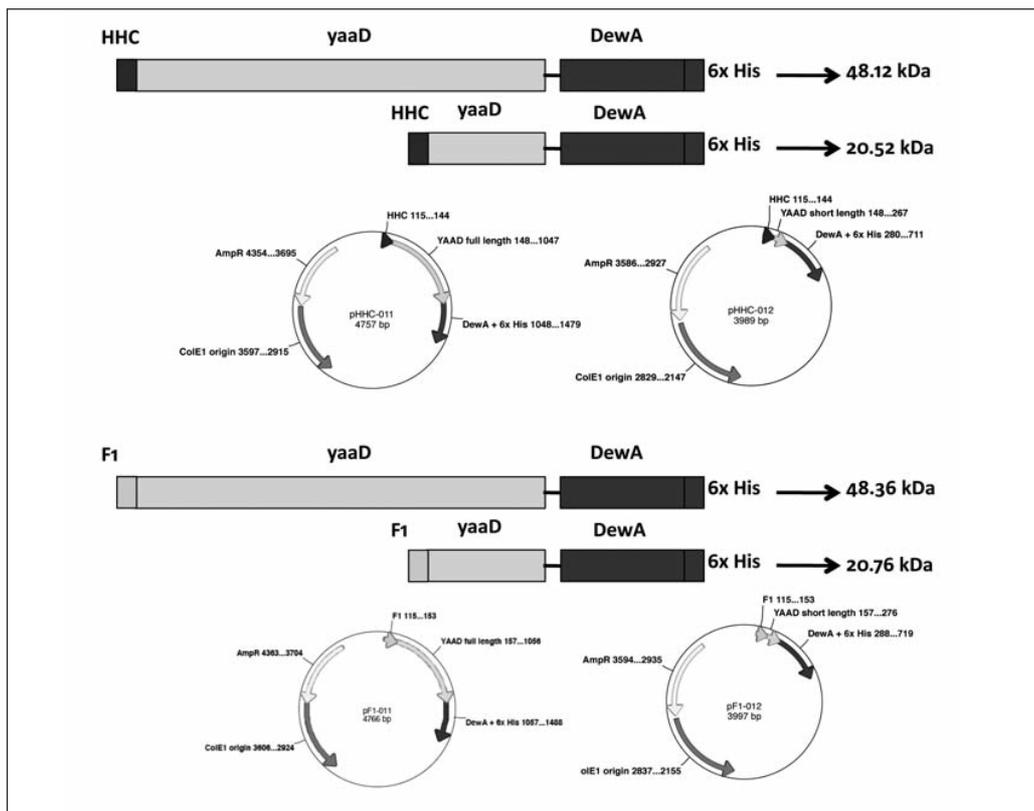


Figure 2: Fusion hydrophobins with cationic antimicrobial peptides. We fused the AMP to the N-terminal site of the yaaD. After biochemical calculations the AMPs are on the top of the coated surfaces and the contact point for biofilms.

was done by an approved protocol of the BASF SE, where a pH-shift from 12 to 9 dissolves the modified fusion hydrophobins out of the IBs. After centrifugation the dissolved proteins remain in the supernatant, which was lyophilized afterwards. The molecular masses of the modified fusion proteins are only a little larger, because of the small size of the AMPs. The modified fusion hydrophobins have a mass of about 48 kDa and 20 kDa, respectively (Figure 3).

1.2.1. Testing the functionality of the modified fusion hydrophobins

We used different organisms, gram-positive and gram-negative bacteria and eukaryotes (*S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. putida* and *A. nidulans*) to show the functionality of the modified fusion hydrophobins. We performed killing curves (*A. nidulans*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae*) and peptide activity tests (*A. nidulans*, *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *P. putida*) to show this. First we tested if only the fusion hydrophobins

have an effect on the growth of microorganisms. We used the strain *B. subtilis* TMB488, which is a reporter strain for the two-component system LiaFSR and is inducible by cell envelope stress by antibiotics, which have an effect on the lipid II cycle (Jordan et al., 2007). Using different concentrations of the fusion hydrophobin we could not detect a growth inhibition (Figure 4). We found the same results with the other organisms. Killing curves were performed using the modified fusion hydrophobins, but there was no difference in the growth recognizable.

Because of these results we decided to perform peptide activity assays in microtiter plates. Peptide activity assays were performed earlier to check the antimicrobial activity of the AMPs F1 and HHC in *A. nidulans* (Mania et al., 2010). We found MICs (Minimal Inhibitory Concentrations) of about 1 µg/ml respectively about 5 µg/ml, so we decided to use these AMPs for modification.

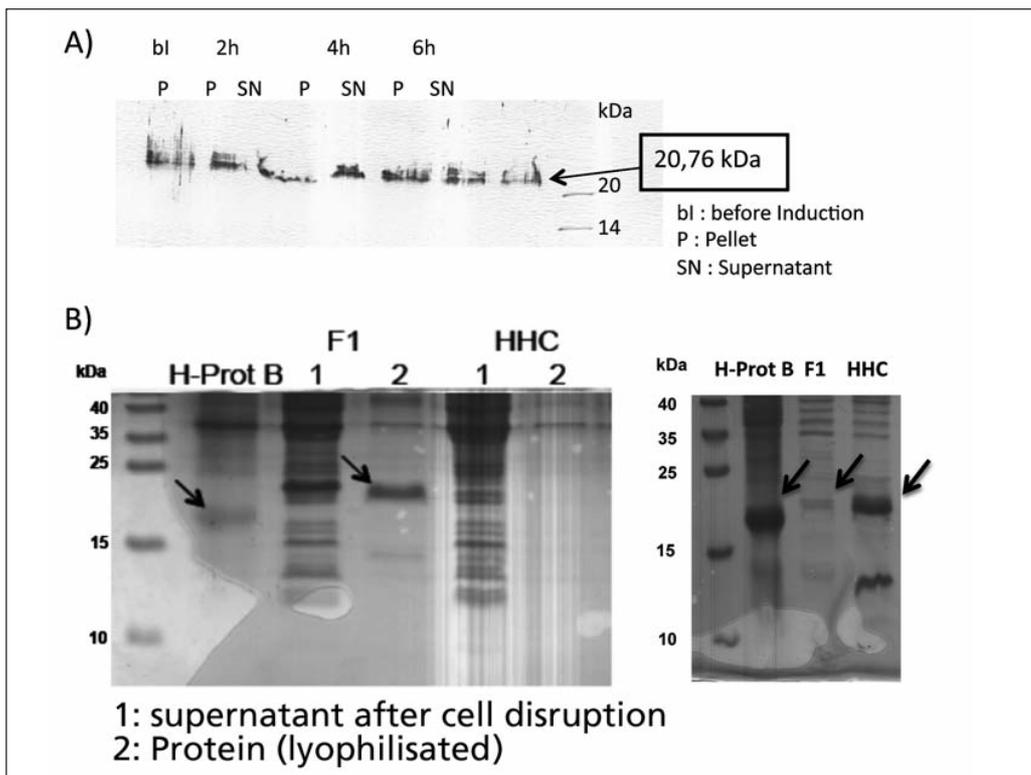


Figure 3: Over expression analysis. A) Western blot: The modified fusion hydrophobin F1-012 serves as an example for a western blot. The modified fusion hydrophobins were transformed with *E. coli* BL21 an expression strain. With induction by 0.5mM IPTG the modified fusion proteins were expressed and could be detected by the 6x-His tag. There is a clear band at about 20kDa, which corresponds to the mass of the modified fusion hydrophobin. B) SDS-Gels: By over expression the modified fusion proteins were enriched and applied on 15-15% SDS Gels. Of the lyophilized protein powder we applied 10µg/ml in each column. As comparison serve the fusion hydrophobins we got from the BASF SE.

In each column of the plate, one peptide is diluted from top to bottom to roughly identify the MIC. This is done in Minimal Medium (MM) with glucose as sole carbon source and resazurin as indicator of viability. Resazurin is a blue dye that turns pink when it is reduced, for example by respiration of living microorganisms in the medium. Each well is inoculated with a defined amount of spores (105 spores) of an *A. nidulans* wild type strain (RMS011). First we tested all the AMPs we have in our stock (F1, HHC, #15, #29, Bac2a, C6, D5, E6, Indolicidin and Kai13) and then we tested the modified fusion hydrophobins. There was no growth inhibition of the F1 and HHC fusion hydrophobin in any tested organism (Figure 5, and data not shown), although the peptides alone were highly active. This suggested an inhibitory effect of the fused hydrophobin.

1.2.2. Modification of fusion hydrophobins with a surface-tethered peptide

Meanwhile Hilpert et al. (2009) found some AMPs, which work better while they are tethered to surfaces. One of these peptides, KaiH, consists of 12 amino acids (WIVVIWRRKRRR) and has a mass of 1.7 kDa. We attached this peptide to the N-terminus of the shortened and full-length version of the yaaD and cloned it also in the pQE60 vector (Figure 6). As a negative control we chose a peptide slightly changed peptide, hW (WIVVIWRKRRR), and attached it also to the shortened and full-length versions of the yaaD. The over expression and purification will be done according to the same protocol as before.

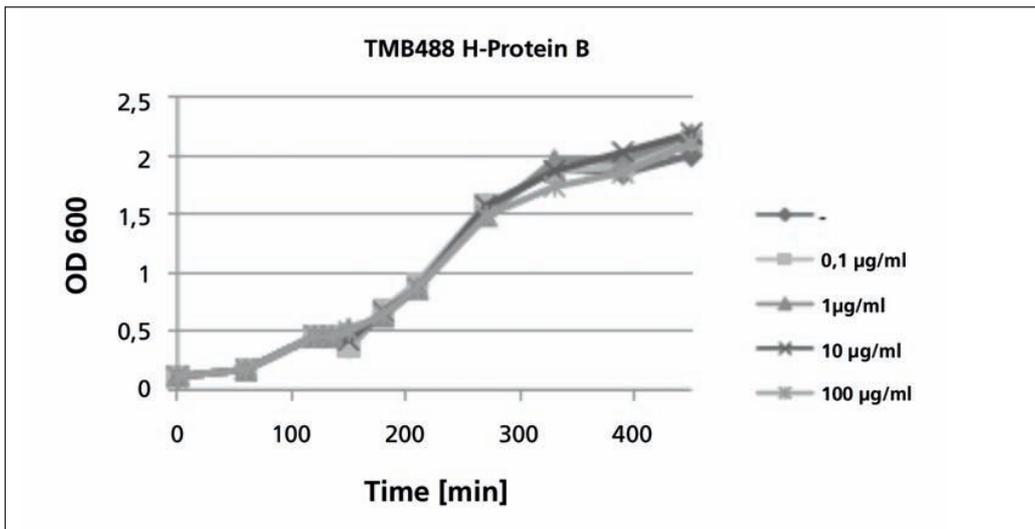


Figure 4: Growth curve of *B. subtilis* TMB488. The strain grew in LB-Media (lysogenic broth) with 5µg/ml chloramphenicol. A 100ml culture was inoculated at OD₆₀₀ 0.1 with a preculture of *B. subtilis* TMB488. Then let it grow until OD₆₀₀ 0.6 when it was split into five 10ml cultures. To each of these cultures we gave a different concentration of fusion hydrophobins (0.1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml and 100µg/ml). One of these grew without any add-on.

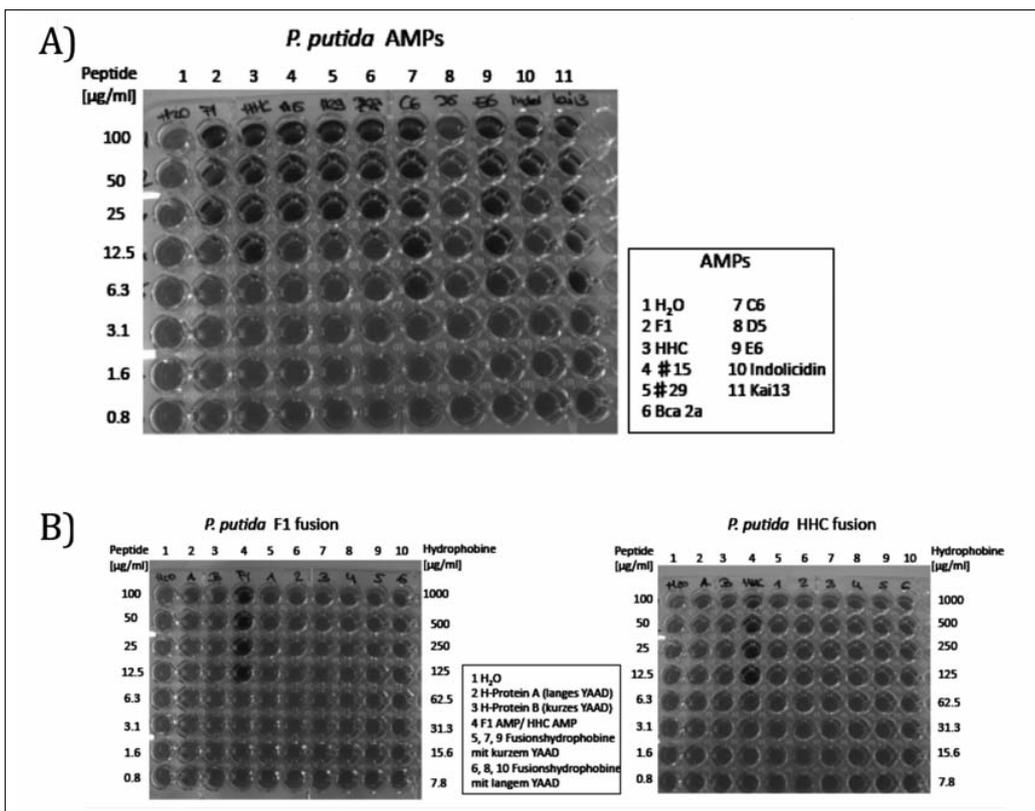


Figure 5: Peptide activity assays with *P. putida*. A) Testing 10 different AMPs for antimicrobial activity. As control serves aqua dest. In each column there is another peptide with decreasing concentration. B) In a second step the modified fusion proteins (5-10) were tested. In each column there is another modified fusion protein with decreasing concentration. As control serve the AMP (F1 or HHC), aqua dest. and the fusion hydrophobins from the BASF SE.

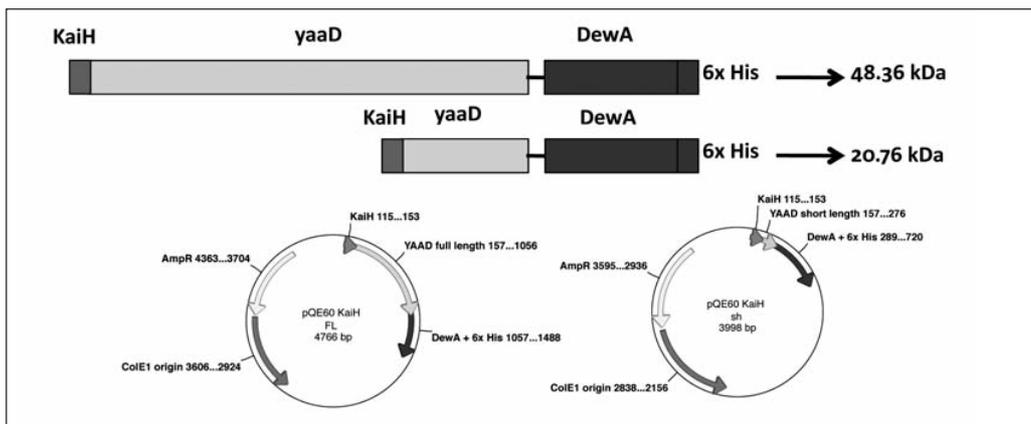


Figure 6: Modified fusion hydrophobins with the cationic antimicrobial peptide KaiH. Fusion of the AMP to the N-terminal side of yaaD and cloning in the pQE60 vector.

2. Characterization of hydrophobin coated surfaces

In this project hydrophobin coated surfaces and their properties are studied with respect to bacterial cell adhesion, cell differentiation, and cellular growth with the aim to influence biofilm formation.

In a first step unmodified recombinant fusion hydrophobins were used and a coating protocol was developed. The hydrophobin coated surfaces were characterized under various aspects.

2.1 Surface coating with hydrophobins

Glass surfaces were used as reference material for coating experiments. Glass is a very hydrophilic material and thus comparable to ceramic materials. The glass surfaces were coated with the fusion hydrophobins H*Protein A and H*Protein B. The used concentration of the hydrophobin solution was 10 μ M. The glass surfaces were coated according to *Janssen et al. (2004)*. The hydrophobins were solved in buffer (50mM Tris-HCl, 1mM CaCl₂, pH 8). Subsequently, the surfaces were cleaned with ethanol and incubated for 1-16 hours at 23-80 °C in the hydrophobin solution. During the incubation the hydrophobins self-assembled on the surface in α -helical conformation. The surfaces were rinsed with distilled water and dried at room temperature. Half of the surfaces was further treated for the induction of a β -sheet shift. The β -sheet conformation of the hydrophobin coating is said to be more

stable than the α -helical conformation. For this the surfaces were incubated for 10 minutes at 80 °C in 2 % SDS-solution, subsequently rinsed with distilled water and dried.

Different parameters like incubation temperature and incubation time might influence the self-assembly behavior and the postulated monolayer of hydrophobins. These parameters were changed to analyze the fundamental characteristics of fusion hydrophobins on surfaces.

2.2 Characterization of hydrophobin coated surfaces

Different surface analysis methods were applied for the characterization of hydrophobin-coated surfaces and the clarification of the influence of the variable coating parameters. The hydrophobin-coated surfaces were analyzed in matters of change of surface hydrophobicity and homogeneity of the coating. In addition also the adsorption characteristics of hydrophobins were studied.

Change of surface hydrophobicity

Contact angle measurement (CA) is a simple-to-adopt method for surface analysis. It is used to detect the presence of films or coatings and to determine their properties. The contact angle describes the shape of a liquid droplet resting on a solid surface and thus gives information about the wettability of the surface. The more a liquid droplet spreads, the smaller is the contact angle and the more hydrophilic

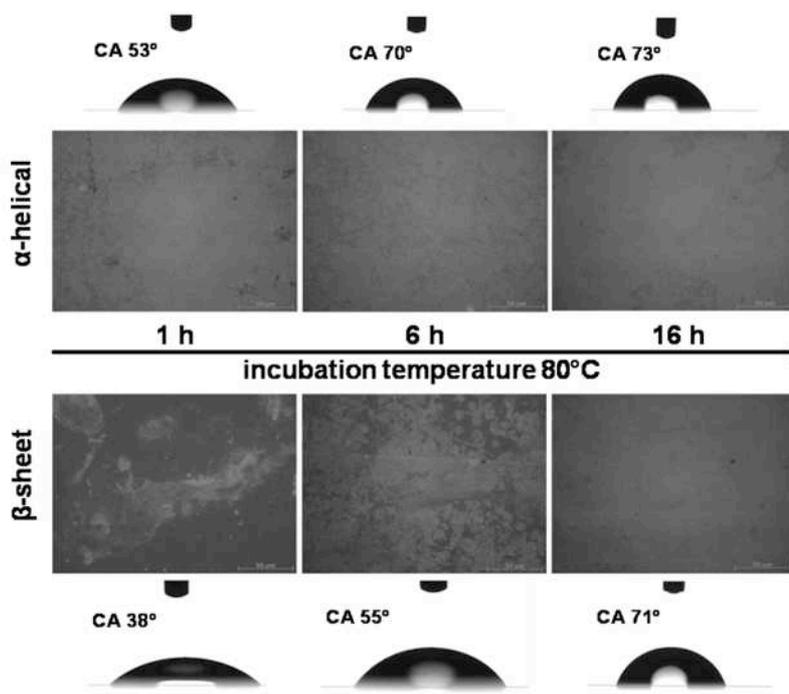


Figure 7: Contact angles and immunofluorescence microscopy are applied to monitor the change of surface hydrophobicity and coating homogeneity of hydrophobin coated surface. The fusion hydrophobins H*Protein A and H*Protein B adhere in a temperature and time dependent manner. The longer the incubation time the more homogenous is the coating in alpha-helical and beta-sheet conformation. Less surface hydrophobicity is lost with the induction of the beta-sheet shift at long incubation times.

is the surface. Since hydrophobins are amphiphilic proteins, which self-assemble on surfaces the contact angle of uncoated vs. coated surfaces is changed and used as a parameter for the efficiency of the coating.

For contact angle measurements the *Contact Angle System OCA20* and the software *SCA20* (Dataphysics, Filderstadt, Germany) were used. The contact angle of a 5 μ l water droplet (sessile drop technique) was calculated with the Laplace-Young equation. The contact angle was determined on at least five different spots on the surface.

The hydrophobin coating changed the wettability of the glass surface. Glass is a hydrophilic material (contact angle $11^\circ \pm 2^\circ$). With the self-assembly of the hydrophobins on the glass surface it became more hydrophobic. The change of the surface wettability was dependent on the incubation time, the incubation temperature and the hydrophobin conformation.

H*Protein A and H*Protein B changed the wettability of the glass surface in a very similar way. Longer incubation times and an increased temperature resulted in significant hydrophobicity changes of about 60° (Figure 7). The induction of the β -sheet shift caused losses of

up to 20° of primarily achieved surface hydrophobicity. Here a big influence of incubation temperature and incubation time was noticed. Coatings prepared at room temperature lose much more hydrophobicity compared to coatings at 80°C . The longer the incubation time the more stable was the coating and the less was lost with the induction of the β -sheet shift.

These results indicated that the longer the incubation time and the higher the incubation temperature the more efficient and stable was the hydrophobin coating. A **long incubation time (16h)** and **high incubation temperature (80°C)** increased the **surface hydrophobicity** of hydrophobin coated surfaces significantly.

In addition to the surface hydrophobicity also the stability of hydrophobin coatings was determined with contact angle measurements. The surface hydrophobicity of freshly coated surfaces was compared to the surface hydrophobicity of surfaces stored at room temperature for up to five weeks. The coating was stable and no change was detected in surface hydrophobicity over time.

Homogeneity of hydrophobin coating

To determine the homogeneity of the hydrophobin coating immunofluorescence microscopy was applied. Immunofluorescence microscopy is often used in biology and medicine to visualize proteins and their distribution. The proteins act as antigens and can be detected with fluorescent labeled antibodies. They are studied using a fluorescence or confocal microscope.

For the detection of the hydrophobin layer on the surface a primary Anti-his antibody was used which specifically binds to the His-tag of the proteins. A secondary fluorescent labeled antibody binds to the Fc region of the primary antibody and could be detected with the fluorescence microscope.

The characteristics of H*Protein A and H*Protein B on glass surfaces were very similar. Surface coatings prepared at room temperature in α -helical protein conformation were homogenous with just a few holes and cracks. The longer the incubation time the more homogenous was the coating, but the differences were insignificant. After the induction of the β -sheet shift the surface coating was very disordered. On glass surfaces coated for one respectively six hours at room temperature no hydrophobin coating was detectable with immunofluores-

cence microscopy after the β -sheet shift. These results were in accord with the contact angle data, which showed that a lot of hydrophobicity was lost on these surfaces.

The surfaces which were coated at 80 °C were much more homogenous compared to the surfaces coated at room temperature. There were slight differences between the various incubation times, but all coatings in α -helical conformation were homogenous (Figure 7). After the induction of the β -sheet shift big differences occurred. The longer the incubation time the more homogenous was the coating. These results confirmed the contact angle data. The longer the incubation time and the higher the incubation temperature the more homogenous was the coating in the α -helical and the β -sheet conformation. It was essential to incubate the materials for **16 hours at 80 °C** in the protein-solution to form a **homogenous hydrophobin-layer in α -helical and β -sheet conformation**.

To confirm the results of the immunofluorescence microscopy AFM (atomic force microscope) measurements were applied. The measurement were performed in the measurement cell of an MFP-3D BioAFM (Asylum, Mannheim) having a commercial Si_3N_4 cantilever of

H*Protein A alpha

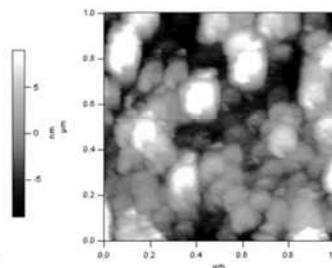
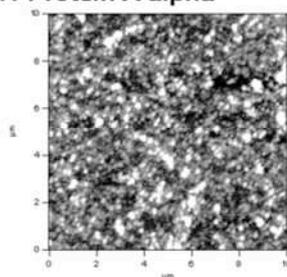
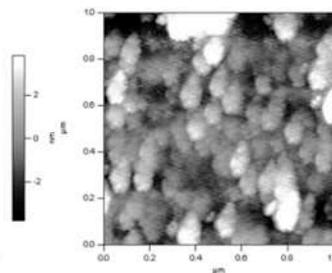
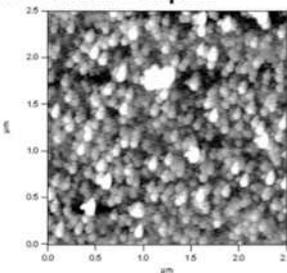


Figure 8: AFM height images of glass surfaces coated with H*Protein A and H*Protein B in alpha helical conformation for 16 hours at 80 °C. The proteins self assemble on the surfaces in ordered globular structures.

H*Protein B alpha



a normal spring constant of 0,56 N/m (nano and more) in air. The microscope was operating in an AC-mode, where the tip was scanned back and forth at 0° along the horizontal line in a scan range of 10 µm. The AFM was used with a 5 µm z-range and 150 µm x- and y-range scanner (type J Digital instruments). Topographic images were evaluated with the Scanning Probe Image Processor (SPIP).

On glass surfaces hydrophobins adhered in ordered protein layers. Surface coatings performed at 80 °C with H*Protein A and H*Protein B in alpha-helical and beta-sheet conformation showed a globular protein adsorption pattern (Figure 8). These results were in accordance with the immunofluorescence microscopy. Also at the **nano level** hydrophobin coatings performed for **16 hours at 80 °C** were **homogenous**.

Adsorption characteristics of hydrophobins

The adsorption characteristics of fusion hydrophobins were monitored with QCM-D (quartz crystal microbalance with dissipation) measurements. QCM is a very sensitive tool to detect changes in weight and thus a helpful method to sense adsorption processes on surfaces. The quartz crystal microbalance determines a mass per unit area by measuring the change in frequency of a quartz crystal resonator. The resonance is disturbed by the addition or removal of a small mass due to, for example, protein deposition at the surface of the acoustic resonator. It can be used under vacuum, in gas phase and in liquid environments. In addition to measuring the frequency, the dissipation is measured. The dissipation is a parameter quantifying the damping in the system, and is related to the sample's viscoelastic properties.

The adsorption of H*Protein A and H*Protein B (10µM in 50mM Tris-HCl, 1mM CaCl₂, pH 8) were analyzed on a SiO₂ coated quartz crystal. The protein layer thickness and the absorbed mass were calculated with the Voigt viscoelastic model. The protein adsorption was monitored for up to 16 hours at 20 °C and a flow rate of 50 µl/min. The stability of the for-

med protein layer was determined by rinsing with 2% SDS solution.

H*Protein A formed a layer of 17 ± 3 nm and H*Protein B of 14 ± 2 nm on the SiO₂ surface. After 1 hour of incubation the maximum layer thickness was already reached. No more changes were observed during further incubation. These results were in accordance with the data of the contact angle measurements and the immunofluorescence microscopy. To achieve a homogenous hydrophobin coating and a significant change of the surface hydrophobicity short incubation times were sufficient. The formed coating thickness of 17 ± 3 nm respectively 14 ± 2 nm matched the expected thickness of hydrated monolayers of fusion hydrophobins. The fact that even with a longer incubation time no changes of the larger thickness were monitored, pleads for the formation of a stable monolayer.

The adhered protein mass was 17 ± 3 mg/m² for H*Protein A and 14 ± 2 mg/m² for H*Protein B (Figure 9). Unfortunately the formed protein layer was not stable under these conditions. After rinsing with 2% SDS solution the hydrophobin layer was detached completely. As already mentioned, the temperature plays an important role in the formation of a stable hydrophobin layer. Contact angle measurement and immunofluorescence microscopy have shown that higher temperatures (80 °C) were necessary to form stable monolayers. The QCM experiments were performed at 20 °C. This might result in this non-stable hydrophobin layer.

Various surface analysis methods were established and applied for the characterization of hydrophobin coated surfaces. At a later stage of this project these techniques will also be used for the characterization of surface coatings with modified fusion hydrophobins. The influence of the modification on the surface performance of the fusion hydrophobins will be determined.

3. Analysis of microbial biofilm formation on different surfaces

Biofilms were grown on natural as well as

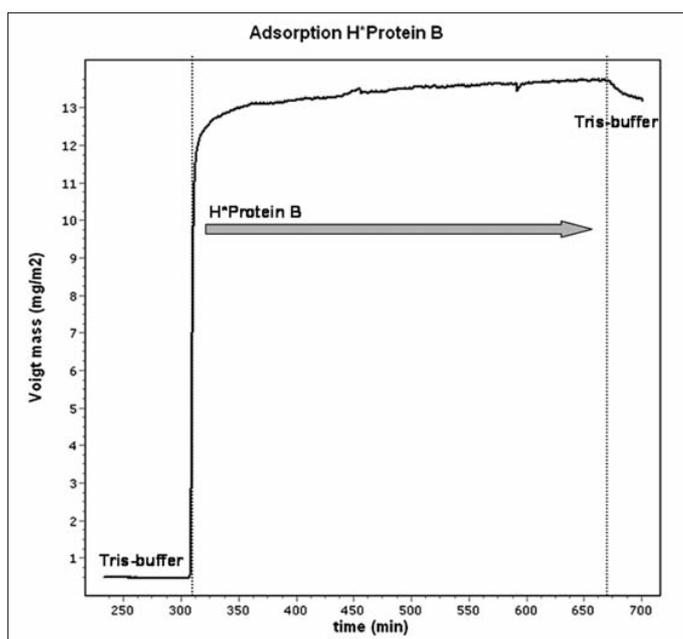


Figure 9: Adsorption of hydrophobin H*Protein B (10 μ M) in Tris buffer (50mM Tris, 1mM CaCl₂, pH 8.0) on SiO₂ surface monitored with QCM-D. The adsorped mass was quantified with Voigt viscoelastic model.

hydrophobin coated surfaces with single species and natural mixed populations. Different methods were applied and established to analyze the bacterial and fungal population in terms of population composition, microbial density and spatial distribution. Additionally the interaction of bacteria and fungi in biofilms was monitored.

3.1 Bacterial biofilm formation

Microbial biofilms represent a special, very successful life form of bacteria. The microorganisms benefit in this symbiotic life form from metabolic exchange, genetic flexibility and protection, which a biofilm offers in comparison to planktonic growth. Nearly all bacterial species are able to exhibit this type of growth firmly adhering to a substrate, in addition to the planktonic freely floating growth variety. A special characteristic of all biofilms, besides firm adhesion to one site, is their highly structured character (Costerton *et al.* 1999, Costerton *et al.* 2001.) The development of a biofilm proceeds in various chronological steps. These are dependent on the involved bacterial species external factors and also surface characteristics. The first step, the initial adhesion is reversible. With the production of a matrix of organic molecules, the extracellular matrix, the adhesion gets irreversible. The bacteria are

embedded in the extracellular matrix, which also offers new habitats to other organism such as other bacteria or fungi. The biofilm starts to mature and to form three-dimensional structures. A mature biofilm releases single cells, which again adhere to the substrate and start the biofilm life cycle again.

In order to characterize the influence of hydrophobin coated surfaces on bacterial biofilm formation the primary adhesion as well as mature biofilms grown on uncoated and coated surfaces were analyzed.

Primary adhesion

The primary adhesion is the first and consequently the crucial step at the change from planktonic to sessile growth.

Primary adhesion of *Escherichia coli* on hydrophobin coated and uncoated glass slides

To analyze the primary bacterial adhesion a GFP-tagged *E. coli* strain (*E. coli* BW3110, pJOE 4056.2 His e-GFP) was used. After induction of the promoter with 0.2% Rhamnose the »green fluorescent protein« (GFP) is stable expressed intracellular. The bacteria can be detected with the epifluorescence microscope without further labeling steps.

E. coli was grown in biofilm reactor on hydrophobin coated and uncoated glass slides and

the bacterial adhesion was monitored at different time points for **up to 24 hours**. The biofilm was washed in 0.89 % NaCl to remove loosely attached microorganisms and subsequently analyzed with epifluorescence microscopy. More bacteria adhered on hydrophobin coated glass slides compared to uncoated glass slides.

Quantification of biofilm growth

For the quantification of the first steps of the biofilm formation a crystal violet assay was applied. Individual cavities of a 96-well microtiter plate (polystyrol) were coated with H*Protein A and H*Protein B according to the established protocol. The **GFP-tagged *E. coli*** (*E. coli* BW3110, pJOE 4056.2 His e-GFP) was grown overnight and diluted in sterile growth medium (OD_{600nm} 0.25). 100 µl bacterial suspension were portioned in each cavity and incubated at 37 °C for **up to 6.5 hours**. The adhered bacteria were stained with crystal violet and the biofilm formation could be quantified with the determination of the optical density at 590nm.

At most time points a higher adhesion of *E. coli* was detected on hydrophobin coated surfaces compared to uncoated surfaces. After just 0.5 hours a significant higher bacterial adhesion on the various hydrophobin coated surfaces was monitored. This effect diminished and even inverted after 6.5 hours. Now more bacteria adhered on hydrophobin coated surfaces compared uncoated polystyrol (Figure 10).

Mature biofilm

The mature **bacterial biofilms** were grown in **wastewater effluent** on hydrophobin coated and uncoated glass slides for up to **four weeks** and subsequently analyzed in terms of population composition, microbial density and spatial distribution.

Population analyses

Molecular biological population analyses like PCR-DGGE (polymerase chain reaction with subsequent denaturing gradient gel electrophoresis) allow studying the diverse population of bacteria in wastewater biofilms. Population analyses were used to detect variations in the composition of the bacterial population on hydrophobin coated and uncoated surfaces. For the analysis of the bacterial population the biofilm DNA was isolated and amplified in a PCR-reaction with the primer set 27f and 517r targeting the eubacterial 16S rDNA. The 16S rDNA of prokaryotes is the most conserved (least variable) gene and for this reason used to identify bacteria. The initial PCR-reaction resulted in a mixture of PCR amplicons which all have the same length (526 bp). Sequence variations like differences in GC content and distribution were used to separate these amplicons in a denaturing gradient gel electrophoresis. Here each band represents one bacterial species. DGGE banding patterns can be used to visualize variations in microbial diversity and provide a rough estimate of the richness

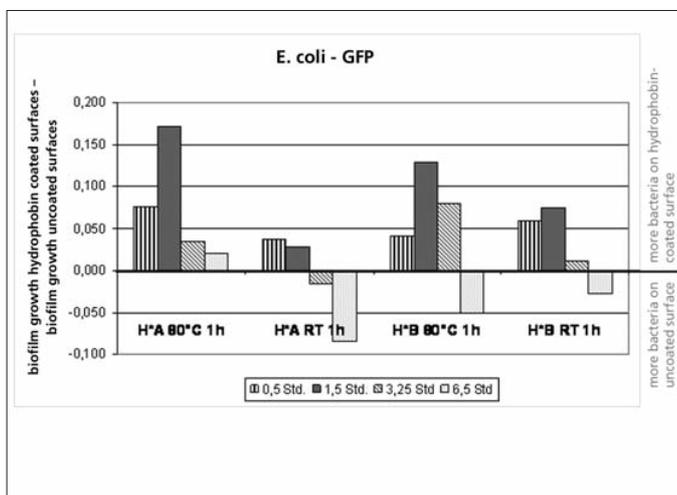


Figure 10: The primary adhesion of *E. coli* was monitored at different time points and quantified with crystal violet staining.

The differences in the biofilm growth on hydrophobin coated and uncoated surfaces are shown. At early time points (0.5 h) significantly more bacteria adhere on hydrophobin coated surfaces.

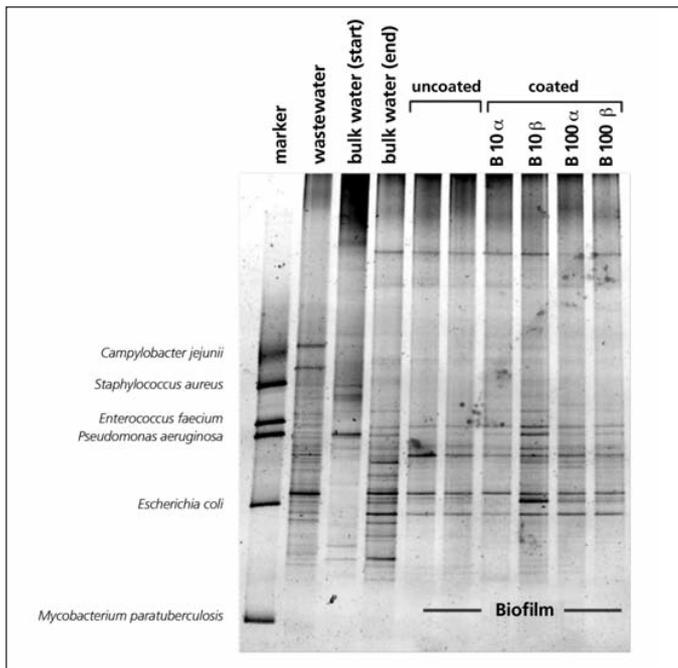


Figure 11: DGGE profiles of amplified partial 16S rRNA genes of planktonic wastewater bacteria (right) and wastewater biofilms (left). The bands obtained from different pure cultures of hygienically relevant bacteria serve as reference marker (left): *Campylobacter jejunii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Mycobacterium paratuberculosis* (top to bottom). The banding pattern of wastewater biofilms on uncoated and coated materials showed no significant differences.

and abundance of predominant microbial community members. The bacterial population was analyzed with PCR-DGGE (Figure 11). The planktonic bacterial population (left) differed clearly from the biofilm population (right). No significant differences were visible in the banding pattern of biofilms grown on different surfaces. The bacteria adhered with the same preference to natural and hydrophobin coated surfaces.

Microbial density

A further characteristic of biofilm growth is besides the population composition the number of bacteria growing in a biofilm. Colony forming units (CFU) were used to estimate the growth density. The biofilm was washed in 0,89% NaCl to remove loosely attached microorganisms, scraped of the surface with a sterile cell scraper, resuspended in sterile PBS and serially diluted. Suitable dilution steps were plated in triplicates on DEV-agar. They were incubated for up to 7 days at 37 °C. The bacterial colonies were counted and the number of bacteria per square cm was calculated. A lot of bacteria grew on the uncoated and hydrophobin coated surfaces, but there was no significant difference in the cell numbers on various materials.

Spatial distribution of biofilm growth

Biofilms were stained directly on the surface with the DNA intercalating fluorescent dye Syto9 to scan the spatial distribution of biofilm growth. Prior to fluorescent staining the biofilm was washed in 0.89% NaCl to remove loosely attached microorganisms. Syto9 solution was dropped on the biofilm sample to stain all present microorganisms. The sample was incubated for 20 minutes in the dark at room temperature and subsequently washed carefully with water. The slides were prepared with the mounting media Citifluor and a coverslip for fluorescence microscopy. No significant differences were observed in the spatial distribution of the biofilm growth on uncoated and hydrophobin coated surfaces.

Different steps of biofilm development were monitored on hydrophobin coated and uncoated surfaces. Hydrophobin coated surfaces influence the primary bacterial adhesion. The bacteria are attracted by the hydrophobin coated surfaces and adhere in higher numbers as on uncoated surfaces. But the impact of hydrophobin coated surfaces on biofilm formation seems to be time dependent. In mature biofilms (4 weeks) no differences in biofilms

established on natural and hydrophobin coated surfaces could be detected.

The established techniques for the biofilm characterization will further be applied to characterize the influence of modified hydrophobins on biofilm formation. The hydrophobins will be modified with antimicrobial peptides to enhance their effect on biofilm formation.

3.2 Fungal biofilm formation

In addition to bacteria there are also fungi inside of a biofilm. When the mature biofilm is formed, fungi joined the biofilm. To analyze the fungal populations in biofilms we use native biofilms. A native biofilm is a biofilm, which can be found in the natural environment and harbors more than one microorganism species. In a native biofilm, protozoan, algae, bacteria and fungi can be found.

Design of a clone library

To analyze and identify the fungal population of a biofilm a molecular biological approach was used and a clone library was designed. A clone library offers the advantage that also fungi, which are not able to grow on agar plates, can be detected and identified. With a clone library it is possible to estimate the abundance of single fungal species in biofilms. For the generation of the clone library the complete biofilm DNA was isolated and amplified in a PCR-reaction with the primer set ITS1 and ITS4. These primers are specific for the ITS-region of eukaryotes. The ITS-region is well suited for the identification of fungi since it has a higher variability than other regions of the rDNA. The PCR products were cloned in *Escherichia coli* and tested with a colony PCR (primer set M13/T7) and the restriction enzyme

Table 1: Isolated fungi and protozoa from native biofilms. A clone library was designed for the isolation of the fungi with the amplified ITS-region in *E. coli*. The sequences were analyzed by a M13/T7 PCR, a digestion and by the online-tool BLAST. Plant 1 and 2 are the different places in the purification plant of Karlsruhe/Neureut. Plant 1 is the place in the mechanical treatment direct after the rack and the second place was in the biological treatment of the plant. Influent biofilm is a biofilm, which was incubated in influent wastewater for one month. The isolates from the biofilm of the lake are also listed in the table.

Species	Order	Season	Origin
<i>Achlya</i> sp.	Saprolegniales	Winter	Plant 1
<i>Anguillospora longissima</i>		Winter	Lake
uncultured Blastocladiomycota		Spring	Plant 2
<i>Candida boidinii</i>	Saccharomycetales		Influent biofilm
<i>Candida pelliculosa</i>	Saccharomycetales	Winter	Plant 1
<i>Candida tropicalis</i>	Saccharomycetales	Winter, Spring	Plant 1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Capnodiales	Winter	Lake
<i>Fusarium merismoides</i> var. <i>merismoides</i>	Hypocreales	Fall	Plant 1
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Saccharomycetales	Spring	Plant 1
<i>Geotrichum</i> sp. (<i>Galactomyces</i> sp.)	Saccharomycetales	Spring, Fall	Plant 1
<i>Mortierella</i> sp.	Mortierellales	Winter	Plant 1
<i>Mucor racemosus</i>	Mucorales		Influent biofilm
<i>Nectria lugdunensis</i>	Hypocreales	Winter	Lake
<i>Penicillium commune</i>	Eurotiales		Influent biofilm
<i>Pichia anomala</i>	Saccharomycetales	Winter	Plant 1
<i>Phoma herbarum</i>		Winter	Lake
<i>Phythium</i> sp.	Pythiales	Winter	Plant 1
<i>Protoventuria alpina</i>	Helotiales	Summer	Plant 1
<i>Rhinoctadiella atrovirens</i>	Chaetothyriales	Spring	Plant 1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Sporidiobolales	Spring	Plant 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	Spring	Plant 1
<i>Sporobolomyces lactosus</i>	Erythrobasidiales	Fall	Plant 1
<i>Sporobolomyces symmetricus</i>	Erythrobasidiales	Spring	Plant 1
uncultured Tremellomycetes		Winter	Plant 1
<i>Trichosporon</i> sp.	Tremellales	Winter, Spring	Plant 1
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Tremellales	Winter	Plant 1
<i>Trichosporon domesticum</i>	Tremellales	Summer	Plant 1
<i>Trichosporon montevideense</i>	Tremellales	Winter	Plant 1
<i>Cyclidium glaucoma</i>	Pleuronematida	Spring	Plant 2
<i>Entamoeba</i> sp.	Entamoebida	Spring	Plant 1
<i>Oxytricha</i> sp.	Stichotrichida	Spring	Plant 2
<i>Paramecium tetraurelia</i>	Peniculida	Spring	Plant 2
<i>Zoothamnium</i> sp.		Winter, Spring	Plant 1, 2
<i>Zoothamnium plumula</i>		Winter	Plant 1

MspI. Clones, which showed different banding patterns on an agarose gel after the restriction digest, were sequenced.

The isolated and identified fungi and protozoa from wastewater biofilms and biofilm from a lake in Karlsruhe-Leopoldshafen are listed in table 1. In addition to these isolates, 111 clones were sequenced which were not described so far. All isolates of the biofilm from the plant in autumn, the Alb, the effluent and the Rhein were species, which are not described so far. Most of the undescribed clones belong to the genus *Candida* and *Trichosporon*, which can be shown in a genealogical tree. Until now it is in general not much known about fungi in biofilms. These clones are very interesting since they might be fungi preferably growing in biofilms (Table 1). There was no significant difference in the fungal population on uncoated and hydrophobin coated materials.

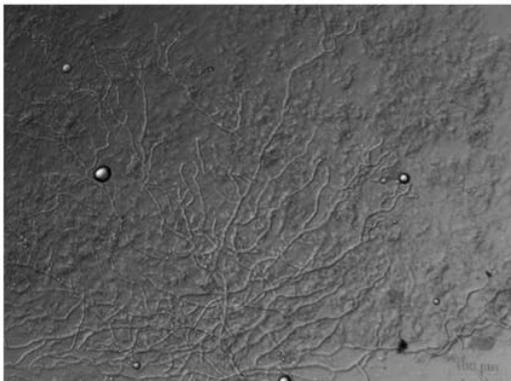
Spatial distribution of biofilm growth

Biofilms were stained with Calcofluor directly on the surface of glass slides. Calcofluor binds specifically to chitin and cellulose and stains fungi and algae. Prior to fluorescent staining the biofilm was washed in 0.85% NaCl to remove loosely attached microorganisms. For the staining of fungi and algae a small volume of 0.1% Calcofluor and 15 % KOH were dropped on the biofilm and subsequently washed with 70 % ethanol and water. The samples were analyzed with the fluorescence microscope (Figure 12).

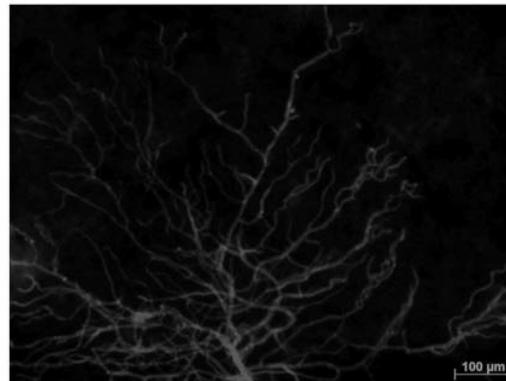
3.3 Interaction of bacteria and fungi in biofilms

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was applied to analyze the distribution and interaction of bacteria and fungi in biofilms. FISH is a technique used to detect and localize the presence of specific DNA sequences in situ. FISH uses specific fluorescent-labelled probes that bind to only those parts of the genome with

DIC



Calcofluor



Overlay

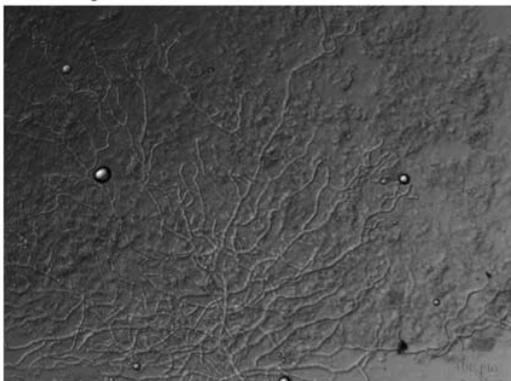


Figure 12: Spatial distribution of biofilms on uncoated surfaces stained with Calcofluor. The glass slide was incubated for four weeks in the influent of the purification plant in Karlsruhe/Neureut. After the incubation the slide was washed with 0.85 % NaCl and stained with 0.1 % Calcofluor and 15 % KOH and washed again with 70 % ethanol and water.

which they show a high degree of sequence similarity. With this technique different micro-organism groups can be stained in situ with diverse fluorescent dyes.

To analyze the interaction of bacteria and fungi two different probes were applied. EuUni was labeled with Fluorescein and bound to a highly conserved region of the eukaryotic 18S rRNA. The prokaryotic 16S rRNA was detected with the Cy3 labeled probe Eub338. The FISH was done as described *Baschien et al. 2008*. The biofilms were fixed, dehydrated and afterwards hybridized with the probes. The samples were analyzed with the fluorescence microscope. For our investigations we used glass slides, which were directly incubated in the influent of the plant Karlsruhe/Neureut and in the Alb (effluent of the plant). Figure 13 shows a FISH of a biofilm, which was incubated in the

influent of the plant. The slide was incubated for four weeks, washed with 0,85 % NaCl to remove loosely attached microorganisms and hybridized with both probes.

References

Baschien, C., Manz, W., Neu, T.R., Marvanová, L., Szewzyk, U. (2008). In situ detection of freshwater fungi in an alpine stream by new taxon-specific fluorescence in situ hybridization probes. *AEM*, Oct. 2008, p. 6427-6436

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284, 1318 – 1322.

Costerton, J. W., Damgaard, H. N., K. -J. Cheng (2001). Cell Envelope Morphology of Rumen Bacteria. *J Bacteriol.* 118, 1132-1143.

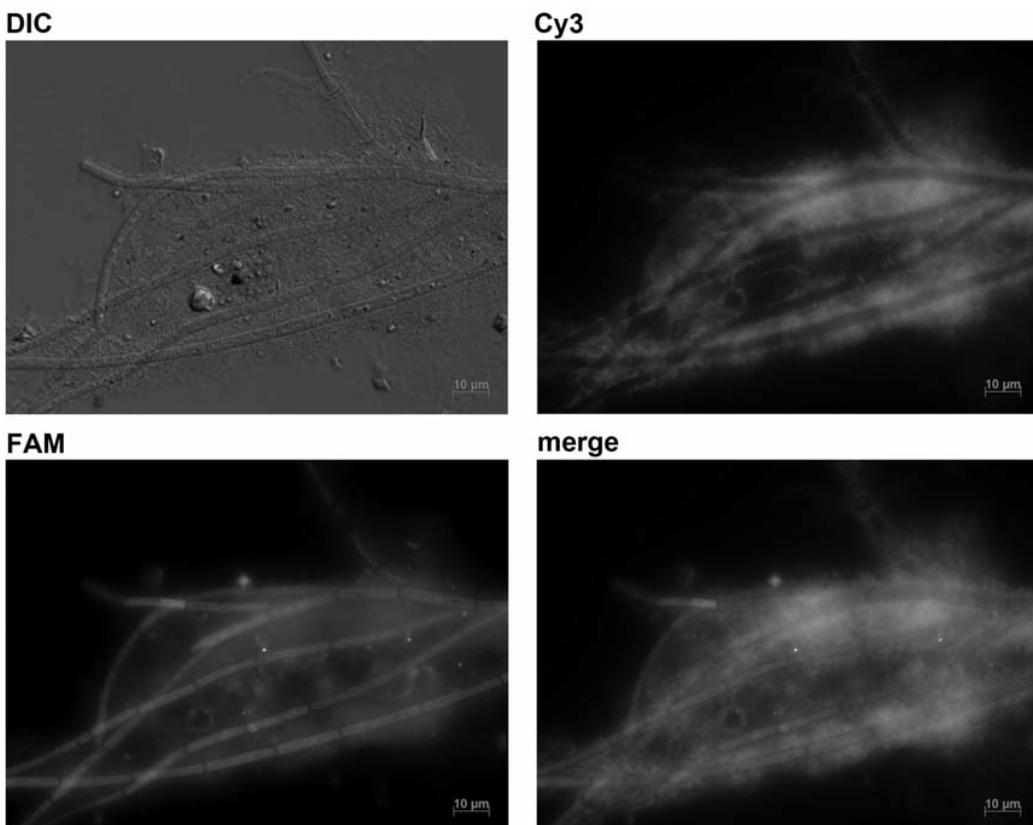


Figure 13: Fluorescence in situ hybridization with a biofilm of the purification plant. The glass slide was incubated for four weeks in the influent of the purification plant Karlsruhe/Neureut. Afterwards FISH was carried out with the specific probes for fungi and bacteria. The biofilms were fixed, dehydrated and hybridized with the probes. Shown in red is the bacteria specific probe (Cy3), in green the fungi specific probe (FAM).

Hilpert, K., Elliott, M., Jenssen, H., Kindrachuk, J., Fjell, C.D., Körner, J., Winkler, D.F., Weaver, L.L., Henklein, P., Ulrich, A.S., Chiang, S.H., Farmer, S.W., Pante, N., Volkmer, R., Hancock, R.E. (2009). Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity. *Chem Biol.* 2009 Jan 30;16(1):58-69.

Janssen, M.I., van Leeuwen, M.B., van Kooten, T.G., de Vries, J., Dijkhuizen, L., Wosten, H.A. (2004). Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state. *Biomaterials* 25 (14), 2731-2739

Jordan, S., Rietkötter, E., Strauch, M.A., Kalamorz, F., Butcher, B.G., Helmann, J.D., Mascher, T. (2007). LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition regulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 153, 2530-2540

Mania, D., Hilpert, K., Ruden, S., Fischer, R., Takeshita, N. (2010). Screening for antifungal peptides and their modes of action in *Aspergillus nidulans*. Not yet published.