

Expression und Charakterisierung von *Aspergillus nidulans* Hydrophobinen und deren potentieller Einsatz im Denkmalschutz

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Lex Winandy

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: Mittwoch, 17. Oktober 2018

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2015 bis Mai 2018 am Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	1
II Einleitung	2
Kapitel 1: Hydrophobine	2
1.1 Rolle pilzlicher Hydrophobine	2
1.2 Hydrophobine in <i>Aspergillus nidulans</i>	6
1.3 Biotechnologische Anwendung von Hydrophobinen	9
Kapitel 2: Konservierung von steinernen Monumenten	11
2.1 Schutz vor Umwelteinflüssen	11
2.2 Verfestigung der Bausubstanz	14
Kapitel 3: Antimikrobielle Peptide	16
3.1 Struktur antimikrobieller Peptide	17
3.2 Wirkungsweise der AMPs	18
3.3 Synthetische AMPs	22
Zielsetzung	23
III Ergebnisse	24
Kapitel 1: Heterologe Expression und Charakterisierung pilzlicher Hydrophobine	24
1.1 Aufbau eines alternativen Expressionssystems für pilzliche Hydrophobine	24
1.2 Aufreinigung der Hydrophobine aus <i>E. coli</i>	26
1.3 Beschichtung von harten Oberflächen	27
1.4 Rasterkraftmikroskopie	30
1.5 Effekt der Hydrophobinbeschichtung	34
1.6 Stabilität der Hydrophobinbeschichtung	34
1.7 Hydrophobine als Emulgator	37
Kapitel 2: Hydrophobine als wasserabweisende Beschichtung zum Schutz steinerner Monumente	41
2.1 Beschichtung unterschiedlicher Lithotypen	41
2.2 Bestimmung der Eindringtiefe der Hydrophobine in den Stein	43
2.3 Hydrophobierung der Lithotypen	44
2.4 Feuchtedurchgang	47
2.5 Stabilität der Beschichtung	48

2.6 Langzeitstabilität	50
Kapitel 3: Fusion von antimikrobiellen Peptiden an Hydrophobine	51
3.1 Design der Fusionsproteine	51
3.2 Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i> und Test auf antimikrobielle Aktivität	52
3.3 Proteinaufreinigung aus <i>S. cerevisiae</i> und Test auf antimikrobielle Aktivität	55
IV Diskussion	59
Kapitel 1: Heterologe Expression und Charakterisierung pilzlicher Hydrophobine	59
1.1 Aufreinigung der Hydrophobine aus <i>E. coli</i>	59
1.2 Charakterisierung der aufgereinigten Hydrophobine	60
Kapitel 2: Hydrophobine als wasserabweisende Beschichtung zum Schutz steinerner Monumente	64
Kapitel 3: Fusion von antimikrobiellen Peptiden an Hydrophobine	67
V Material und Methoden	70
1 Chemikalien	70
2 Verwendete Lithotypen	70
3 Verwendete Organismen	71
4 Kultivierung der Organismen	72
4.1 Kultivierung der Bakterienstämme	72
4.2 Kultivierung von <i>A. nidulans</i>	73
4.3 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	74
5 Molekularbiologische Methoden	74
5.1 Präparation von <i>A. nidulans</i> RNA und cDNA	74
5.2 Klonierung von PCR-Produkten und <i>Site-directed Mutagenesis</i>	75
5.3 Insertion von Peptiden via <i>Primerligation</i>	79
5.4 Transformation und Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	80
5.5 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	82
6 Biochemische Methoden	83
6.1 Aufreinigung der Hydrophobine aus <i>E. coli</i>	83
6.2 Aufreinigung der Hydrophobine aus <i>S. cerevisiae</i>	84
6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	84
6.4 Western Blot	85
6.5 Oberflächenbeschichtung mit Hydrophobinen	86

6.6 Test auf Beschichtungsstabilität	86
6.7 Test auf Emulsion Stabilisierung	87
7 Mikroskopie	88
7.1 Lichtmikroskopie	88
7.2 Rasterkraftmikroskopie	89
8 Weitere Methoden	90
8.1 Feuchtedurchgang	90
8.2 Kontaktwinkelmessung	91
VI Literaturverzeichnis	92
Publikationsliste	115
Danksagung	116
Anhang	117

I Zusammenfassung

Pilzliche Hydrophobine sind kleine, amphiphile Proteine, die sich an hydrophil-hydrophoben Grenzflächen zu einem *Monolayer* assemblieren und so die Oberflächeneigenschaften verändern, was sie für eine Vielzahl an biotechnologischen Anwendungen interessant macht. In dieser Arbeit wurde ein Expressionssystem entwickelt, das die heterologe Expression von Hydrophobinen unterschiedlicher Klasse in *Escherichia coli* ohne die Fusion an einen permanenten N-terminalen *Tag* ermöglicht. Durch den Einsatz des Signalpeptids PelB war es möglich, die Hydrophobine DewA, DewC, DewD und DewE aus *Aspergillus nidulans* und HFBI aus *Trichoderma reesei* zu produzieren und ihre biochemischen Eigenschaften zu charakterisieren. Alle Hydrophobine waren in der Lage an Oberflächen zu binden, die Hydrophobizität von Glas zu erhöhen und zeigten emulgatorische Fähigkeiten in einem Öl-Wasser Gemisch. Während das typische Klasse I Hydrophobin DewA die stabilsten Beschichtungen auf harten Oberflächen bildete, zeigten die nicht direkt einer Klasse zuordbaren Hydrophobine DewD und DewE die besten Eigenschaften als Emulgator. Die Ergebnisse unterstützen die zuletzt aufgekommenen Forderungen nach einer Überarbeitung der Einteilung der Hydrophobine und postulieren die Einführung einer neuen, intermediären Klasse.

Zusätzlich wurde der Einsatz der Hydrophobine DewA und HFBI im Denkmalschutz untersucht. Die Proteine waren in der Lage, eine hydrophobe aber Wasserdampfdurchlässige Beschichtung nach dem GoreTex®-Modell auf drei unterschiedlichen Lithotypen zu bilden. Die große Eindringtiefe der Hydrophobine in das Gestein macht einen Einsatz jedoch nicht nur als wasserabweisende Beschichtung, sondern auch als Vorbehandlung bei der Konsolidierung von brüchigem Gestein denkbar. Die Eigenschaft, die Polarität von Oberflächen zu verändern und die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten zu verringern, könnte zu einem besseren Eindringen der Konsolidierungsmittel in den Stein führen.

Abschließend wurden antimikrobielle Peptide an das Hydrophobin DewA fusioniert, heterolog aus *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* aufgereinigt und auf ihre antibakterielle und fungizide Wirkung untersucht. Die hergestellten bakteriziden Oberflächen sind ein erster Schritt im Kampf gegen Antibiotika-resistente Bakterienstämme.

II Einleitung

Kapitel 1: Hydrophobine

1.1 Rolle pilzlicher Hydrophobine

Hydrophobine sind kleine, amphiphile Proteine mit einer Größe von 50 bis 150 Aminosäuren (Wessels, 1994), die nur in Ascomyceten und Basidiomyceten vorkommen (Linder *et al.*, 2005). Sie wurden erstmals 1990 als Proteine, die die Oberfläche der Fruchtkörper und Sporen von *Schizophyllum commune* wasserabweisend machen, beschrieben (Schuren & Wessels, 1990) und erhielten dementsprechend auch ihren Namen (Wessels *et al.*, 1991). Hydrophobine werden von den Pilzen in das meist wässrige Milieu, in dem sie wachsen, sekretiert und assemblieren sich an der Luft-Wasser-Interphase zu einem *Monolayer* (Wösten & Wessels, 1997). Dies erlaubt die Ausbildung von Lufthyphen, indem die Hydrophobine die Oberflächenspannung des wässrigen Mediums verringern und die Hyphen so in die Gasphase vordringen können (Wessels *et al.*, 1991; Wösten *et al.*, 1999). Zusätzlich kleiden die amphiphilen Proteine die Luftkanäle der Fruchtkörper aus und verhindern so, dass Wasser in diese eindringen kann (Lugones *et al.*, 1999). Außerdem sind sie unersetzlich für die effiziente Verbreitung der Konidiosporen, da die amphiphile Beschichtung eine Aggregatbildung verhindert und gleichzeitig das Anhaften der Sporen an Insekten und Wassertropfen bevorteilt (Stringer *et al.*, 1991; Whiteford & Spanu, 2001).

Hydrophobine sind jedoch nicht nur für die Hydrophobizität pilzlicher Strukturen verantwortlich, sondern dienen in einigen Pilzstämmen der mutualistischen oder pathogenen Interaktion mit dem Wirt. So ist eine erhöhte Hydrophobin-Expression während der Symbiose von Ektomykorrhiza-Pilzen und Pflanzenwurzeln zu beobachten, diese dient vermutlich dem vereinfachten Gasaustausch zwischen den Symbionten (Tagu *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999; Tagu *et al.*, 2002). Das Hydrophobin MPG1 aus *Magnaporthe grisea* ist für die Bildung von Appressorien unerlässlich und stellt somit einen Pathogenitätsfaktor dar (Talbot *et al.*, 1993; Talbot *et al.*, 1996). Zusätzlich kann die Hydrophobinbeschichtung die Sporen vor dem Immunsystem des Wirtes verstecken (Aimanianda *et al.*, 2009). Eine Deletion des Hydrophobins RodA in *Aspergillus fumigatus* führt beispielsweise dazu, dass die

Sporen vom menschlichen Immunsystem angegriffen werden, wohingegen Wildtyp-Sporen unerkant bleiben. Zu den Hydrophobinen homologe Proteine wurden mittlerweile auch in Hefen und Bakterien beschrieben. Die *Chaplins* aus der bakteriellen Gattung *Streptomyces* (Cleassen *et al.*, 2003; Kodani *et al.*, 2005) und die *Repellents* aus *Ustilago maydis* (Teertstra *et al.*, 2006) übernehmen dabei ähnliche Funktionen wie die Hydrophobine.

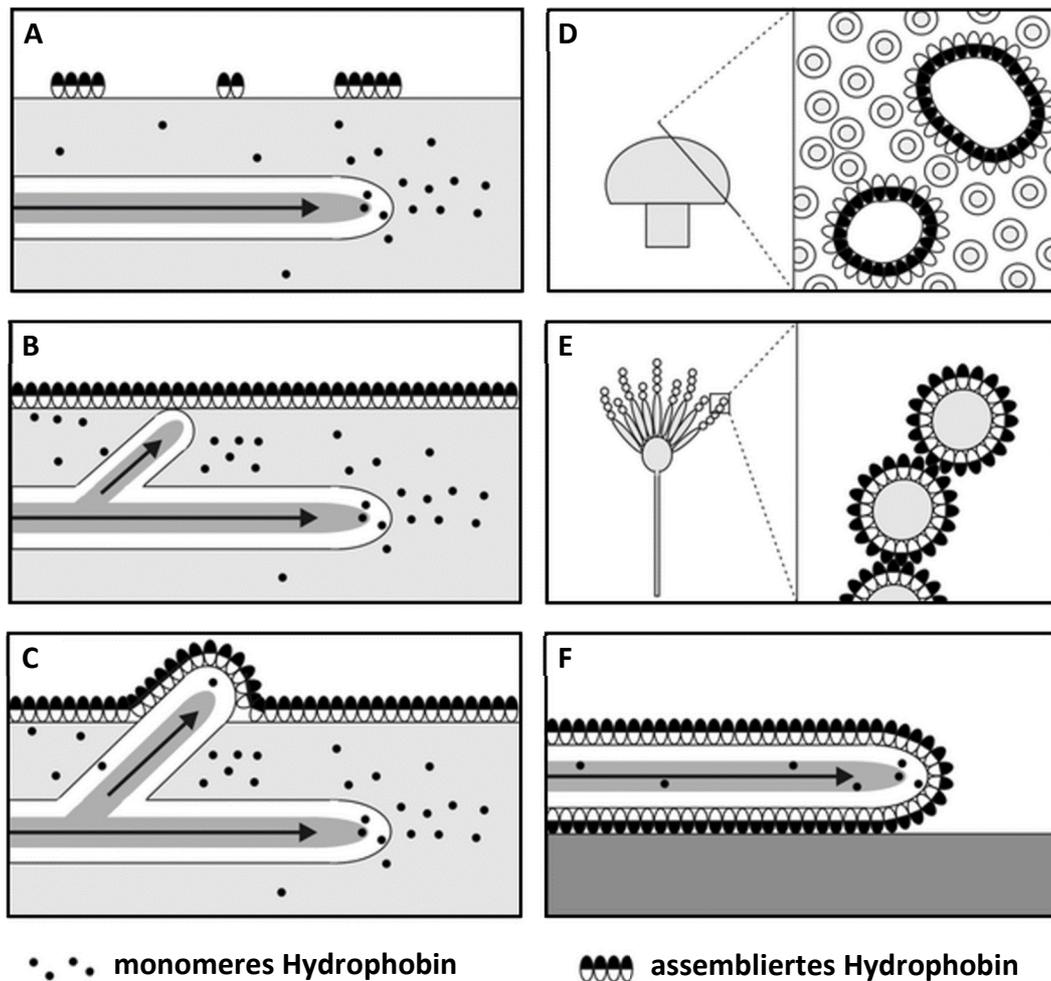
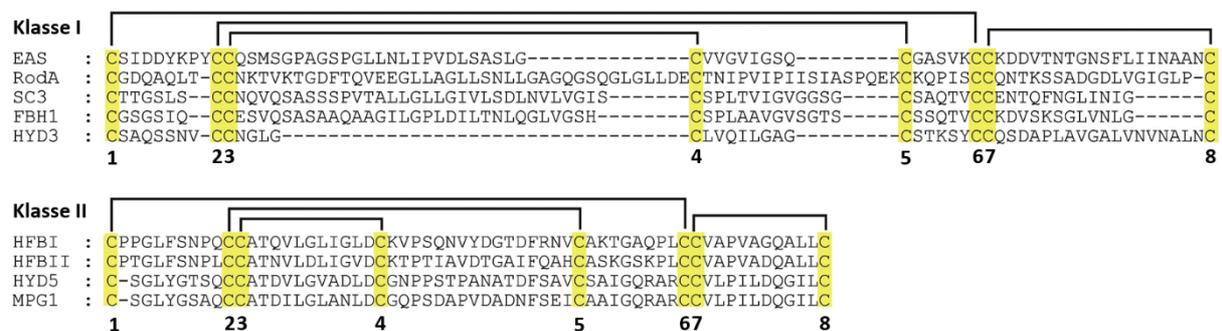


Abbildung 1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Funktionen der Hydrophobine

Die löslichen Hydrophobin Monomere werden von den Hyphen in das wässrige Milieu abgegeben (A) und assemblieren an der Wasser-Luft Interphase zu einem Monolayer (B), welcher die Wasseroberflächenspannung verringert und so das Ausbilden von Lufthyphen ermöglicht (C). D) Hydrophobine bedecken außerdem die Luftkanäle der Fruchtkörper und verhindern so das Eindringen von Wasser. E) Auf der Sporenoberfläche dienen die Hydrophobine der besseren Verbreitung der Sporen. F) Außerdem vermitteln die an der Zellwand angelagerten Hydrophobine die Anheftung an hydrophobe Oberflächen, wie es zum Beispiel bei der Infektion von Pflanzengewebe notwendig ist (verändert nach Wösten & Scholtmeijer, 2015).

Strukturell zeichnen sich Hydrophobine durch acht stark konservierte Cysteine aus, die vier intramolekulare Disulfidbrücken (Cys1-Cys6, Cys2-Cys5, Cys3-Cys4, Cys7-Cys8) bilden (de Vries *et al.*, 1993), sich sonst jedoch in ihrer Aminosäuresequenz sehr wenig ähneln. Unterteilt werden die Proteine anhand ihrer Größe und biochemischen Eigenschaften in zwei Klassen (Wessels, 1994). Klasse I Hydrophobine bestehen aus 100 bis 150 Aminosäuren. Ein Großteil von ihnen bildet an hydrophil-hydrophoben Grenzflächen Amyloide, sogenannte *Rodlets* aus, welche nur mit sehr starken, organischen Säuren von Oberflächen entfernt werden können (Wessels *et al.*, 1991; Linder *et al.*, 2005). Zusätzlich zeichnen sich die Klasse I Hydrophobine durch eine größere, ungeordnete Schleife zwischen dem dritten und vierten Cystein aus (Mackay *et al.*, 2001; Kwan *et al.*, 2006). Klasse II Hydrophobine sind kleiner (50 bis 100 Aminosäuren) und bilden weniger stabile Aggregate, die sich in Detergenzien und Alkohol auflösen (Wösten & de Vocht, 2000; Paananen *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den Klasse I Hydrophobinen ist die Anzahl an Aminosäuren zwischen den Cysteinen 3 und 4 sowie 4 und 5 bei den Klasse II Hydrophobinen stark konserviert (Linder *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2014). Durch die Untersuchungen von immer mehr Hydrophobinen wurde die Einteilung in nur zwei Klassen anhand der Länge der Aminosäuresequenz in Frage gestellt. Die Einführung von mindestens einer neuen, dritten Klasse wurde vorgeschlagen (Jensen *et al.*, 2010; Littlejohn *et al.*, 2012, Winandy *et al.*, 2018).



Klasse I: C-X₅₋₇-C-C-X₁₉₋₃₉-C-X₈₋₂₃-C-X₅-C-C-X₆₋₁₈-C

Klasse II: C-X₉₋₁₀-C-C-X₁₁-C-X₁₆-C-X₈₋₉-C-C-X₁₀-C

Abbildung 2: Alignment von Klasse I und Klasse II Hydrophobinen

Dargestellt sind die Aminosäuren zwischen dem ersten und dem achten Cystein. Die acht konservierten Cysteine sind in Gelb unterlegt, die vier gebildeten intramolekularen Disulfidbrücken mit Klammern hervorgehoben. Die stärkere Konservierung der Anzahl an Aminosäuren in den Klasse II Hydrophobinen ist gut zu erkennen. Verglichen wurden die Klasse I Hydrophobine EAS aus *Neurospora crassa*, RodA aus *Aspergillus fumigatus*, SC3 aus *Schizophyllum commune*, FBH1 aus *Pleutorus ostreatus* und HYD3 aus *Gibberella moniliformis* sowie die Klasse II Hydrophobine HFBI und HFBI I aus *Trichoderma reesei*, HYD5 aus *Gibberella moniliformis* und MPG1 aus *Magnaporthe grisea* (verändert nach Kwan *et al.*, 2008). Dargestellt ist außerdem die Aminosäurenformel der Klasse I und II Hydrophobine mit C = Cystein und X = beliebige Aminosäure (Littlejohn *et al.*, 2012).

Die tertiäre Proteinstruktur ist bis heute nur von relativ wenigen Hydrophobinen bekannt, vergleicht man deren Anzahl mit der Anzahl an publizierten Hydrophobingenen. Die Strukturen der Klasse II Hydrophobine HFBII und HFBI (Hakanpää *et al.*, 2004; Hakanpää *et al.*, 2006b) sowie des Klasse I Hydrophobins EAS (Kwan *et al.*, 2006) waren die ersten, die entschlüsselt wurden. Gemeinsam haben alle Hydrophobine einen Kern bestehen aus vier β -Faltblättern (Wösten & Scholtmeijer, 2015). Die Klasse II Hydrophobine sind kompakt aufgebaut und besitzen kurze L1 (zwischen Cys3 und Cys4) und L3 (zwischen Cys7 und Cys8) Schleifen sowie eine α -Helix in der L2 Schleife (zwischen Cys4 und Cys5) (Hakanpää *et al.*, 2006a; Rey *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014) (Abb. 3C). Die Klasse I Hydrophobine besitzen eine größere Variabilität sowohl in der Länge als auch im Aufbau der einzelnen Schleifen. EAS aus *Neurospora crassa* besitzt zum Beispiel unstrukturierte L1- und L3-Schleifen sowie ein kurzes β -Faltblatt in der L2-Schleife (Kwan *et al.*, 2006) (Abb. 3A). Andere Klasse I Hydrophobine wie DewA aus *Aspergillus nidulans* oder RodA aus *A. fumigatus* haben α -Helices in den L1- und L2-Schleifen (Morris *et al.*, 2013; Pille *et al.*, 2014). Obwohl sich die einzelnen Hydrophobine in der Aminosäuresequenz und der Tertiärstruktur sehr stark unterscheiden, können sie ihre Funktionen teilweise ersetzen. Gezeigt wurde dies beispielsweise für einen apathogenen *M. grisea* Mpg1 Deletionsstamm, der durch die Expression von Hydrophobinen aus anderen Stämmen teilweise rekomplementiert werden konnte (Kershaw *et al.*, 1998).

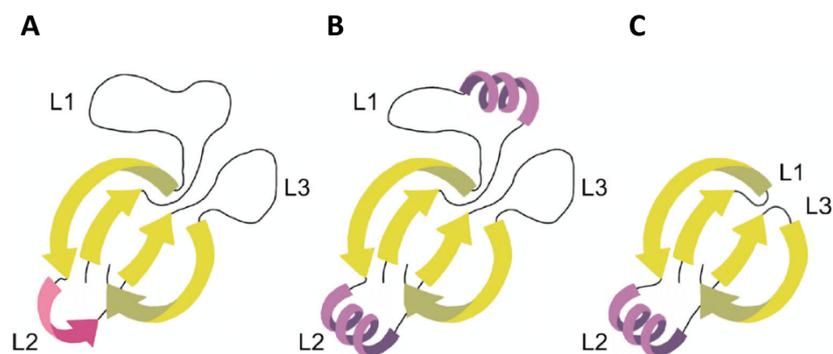


Abbildung 3: Die Tertiärstruktur der Hydrophobine

Schematische Darstellung der Klasse I (A, B) und Klasse II (C) Hydrophobine. Beide Klassen enthalten einen Kern aus vier β -Faltblättern und entweder eine α -Helix oder ein weiteres β -Faltblatt in der L2 Schleife. Bei den Klasse I Hydrophobinen sind die L1 und L3 Schleifen relativ groß und unstrukturiert wie bei EAS aus *N. crassa* (A) oder formen eine α -Helix in der L1 Schleife wie bei DewA aus *A. nidulans* oder RodA aus *A. fumigatus* (B). Die Klasse II Hydrophobine sind eher kompakt und zeichnen sich durch kurze, in der Anzahl an Aminosäuren stark konservierte L1 und L3 Schleifen aus (C) (verändert nach Wösten & Scholtmeijer, 2015).

1.2 Hydrophobine in *Aspergillus nidulans*

Der Gießkannenschimmel *A. nidulans*, ein homothallischer Ascomycet und Modellorganismus für eine Vielzahl biologischer Fragestellungen, besitzt mehrere Hydrophobine. Das erste wurde bereits kurz nach ihrer Entdeckung in *S. commune* beschrieben und erhielt den Namen RodA (*rodletless A*), da die Deletion dieses Proteins das Verschwinden der *Rodlets* auf der Sporenoberfläche zur Folge hatte (Stringer *et al.*, 1991). Das Fehlen von RodA führte ebenfalls zu weniger hydrophoben Kolonien und verklumpenden Sporen. Mittlerweile wurden fünf weitere Hydrophobine in *A. nidulans* bestätigt und DewA bis DewE genannt (*detergent wettable A-E*) (Stringer & Timberlake, 1995; de Groot *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010; Grünbacher *et al.*, 2014). Die meisten von ihnen wurden der Klasse I zugeordnet, auch wenn man sich bei DewD nicht darauf festlegen konnte (Jensen *et al.*, 2010). *In silico* Recherchen postulierten längst weitere vier Hydrophobin-ähnliche Proteine in *A. nidulans*, die in ihrem Aufbau jedoch nicht der klassischen Definition mit acht konservierten Cysteinen entsprechen (Littlejohn *et al.*, 2012). Alle sechs Hydrophobine lokalisieren an der Sporenoberfläche und sind für deren Hydrophobizität verantwortlich (Throm, 2011; Grünbacher *et al.*, 2014).

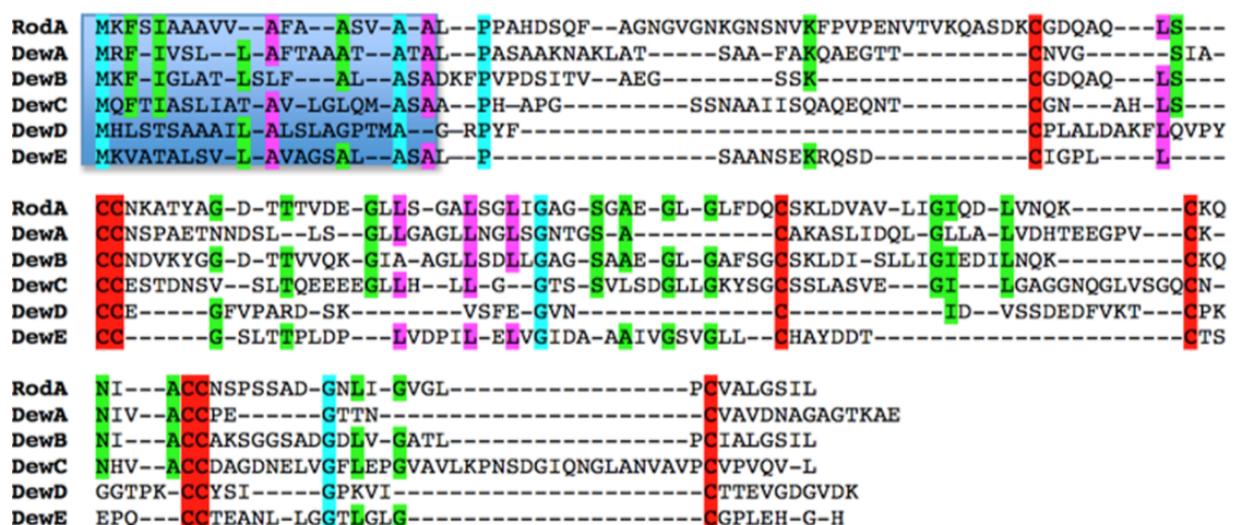


Abbildung 4: Alignment der sechs in *A. nidulans* bestätigten Hydrophobine

Alignment erstellt durch den Vergleich des Hydrophobizität-Musters der Aminosäuren. Die vorhergesagten Signalpeptide sind mit einem blauen Kasten unterlegt. Die acht charakteristischen Cysteine sind rot hervorgehoben. Die restlichen Farben stellen den Grad an Homologie zwischen den sechs untersuchten Hydrophobinen dar. Hellblau bedeutet 100%, Lila 71% und Grün 57% Homologie (Grünbacher *et al.*, 2014).

RodA und DewB besitzen einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker, mit dem sie in der Zellwand der Sporen fixiert sind. Eine Deletion des dazugehörigen Aminosäuremotivs führte bei DewB zum Verlust der Fähigkeit, an Oberflächen zu binden (Fokina *et al.*, 2016). Obwohl alle sechs Hydrophobine auf den Sporen vorzufinden sind, ist nur RodA essentiell für die Ausbildung der *Rodlets* genannten Mikrofibrillen. Während die Sporen des $\Delta rodA$ Stammes glatt sind, weisen die anderen Hydrophobin-Deletionsstämme weiterhin die spezifische *Rodlet*-Struktur auf den Sporen auf (Grünbacher *et al.*, 2014). In wässriger Lösung wurde jedoch gezeigt, dass sowohl DewA als auch das Klasse I Hydrophobin EAS aus *N. crassa* an der Wasser-Luft Grenzphase *Rodlets* ausbilden (Morris *et al.*, 2011; Lo *et al.*, 2014).

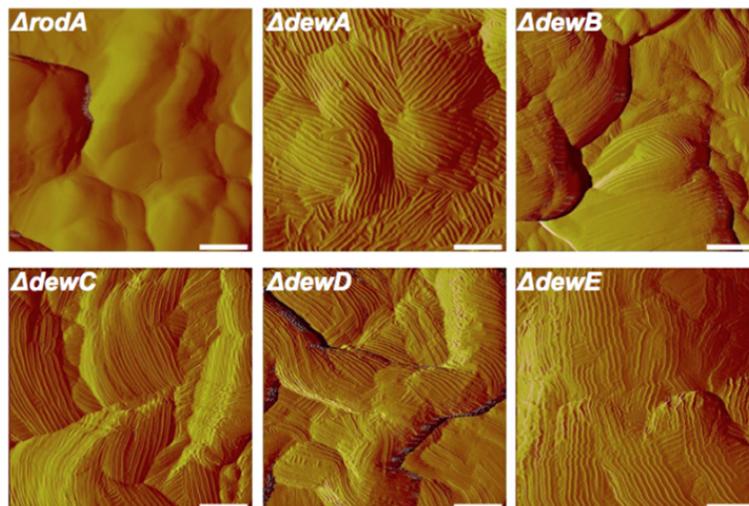


Abbildung 5: Struktur der Sporenoberfläche

Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Sporenoberflächen der verschiedenen *A. nidulans* Hydrophobin-Deletionsstämme. Gut sichtbar sind die *Rodlets*, die jedoch im $\Delta rodA$ Stamm fehlen (Grünbacher *et al.*, 2014).

Expressionsanalysen haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Hydrophobine eines Organismus zeitlich unabhängig voneinander exprimiert werden (Brown *et al.*, 2016; Fokina *et al.*, 2016). In *A. nidulans* werden die Hydrophobine RodA, DewA, DewB und DewC erst während der Entwicklung der Metulae und Phialiden exprimiert, wohingegen DewD und DewE bereits in vegetativen Hyphen exprimiert werden (Grünbacher *et al.*, 2014). Ein ähnliches Bild findet man in *S. commune*, wo das Hydrophobin SC3 nur in Lufthyphen, SC1 und SC4 hingegen nur in vegetativen Hyphen vorzufinden ist (Wessels *et al.*, 1991). Dies deutet darauf hin, dass unterschiedliche Hydrophobine verschiedene Funktionen in einem Organismus erfüllen und dementsprechend auch eigene biochemische Charakteristika besitzen.

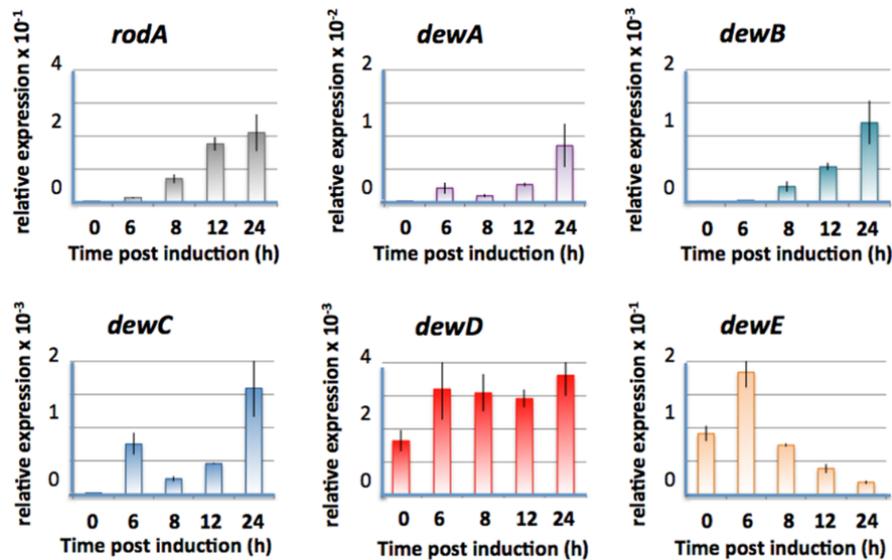


Abbildung 6: Expressionsanalysen der *A. nidulans* Hydrophobine

Die Expression der sechs bestätigten Hydrophobine nach dem Transfer des Myzels aus Flüssigkultur auf Festmedium. Die Hydrophobine RodA, DewA, DewB und DewC werden erst während der Entwicklung der Metulae und Phialiden exprimiert. DewD und DewE jedoch werden bereits in vegetativen Hyphen exprimiert (verändert nach Grünbacher *et al.*, 2014).

Tabelle 1: Charakteristika der bestätigten und potentiellen *A. nidulans* Hydrophobine (Littlejohn *et al.*, 2012; Grünbacher *et al.*, 2014).

Name	Aminosäuren	Cysteine	Aminosäurenformel	Klassifizierung
RodA	157	8	C-X ₇ -CC-X ₃₉ -C-X ₁₈ -C-X ₅ -CC-X ₁₇ -C	Klasse I
DewA	135	8	C-X ₆ -CC-X ₃₁ -C-X ₂₃ -C-X ₅ -CC-X ₆ -C	Klasse I
DewB	135	8	C-X ₇ -CC-X ₃₉ -C-X ₁₈ -C-X ₅ -CC-X ₁₇ -C	Klasse I
DewC	143	8	C-X ₆ -CC-X ₃₈ -C-X ₂₂ -C-X ₅ -CC-X ₃₅ -C	vermutlich Klasse I
DewD	101	8	C-X ₁₃ -CC-X ₁₇ -C-X ₁₂ -C-X ₇ -CC-X ₈ -C	unbekannt
DewE	109	8	C-X ₅ -CC-X ₃₂ -C-X ₆ -C-X ₅ -CC-X ₁₃ -C	vermutlich Klasse I
AN4845	376	28	kein 8-Cystein Motiv	unbekannt
AN5290	175	10	kein 8-Cystein Motiv	unbekannt
AN7327	179	10	kein 8-Cystein Motiv	unbekannt
AN11982	251	11	kein 8-Cystein Motiv	unbekannt

1.3 Biotechnologische Anwendung von Hydrophobinen

Aufgrund ihrer Eigenschaft, selbstständig an Grenz- und Oberflächen zu assemblieren und so die Eigenschaft dieser zu verändern, sind Hydrophobine für biotechnologische Anwendungen von großem Interesse. Lange Zeit konnte man jedoch nur sehr geringe Mengen der Proteine direkt aus dem pilzlichen Gewebe gewinnen, indem man dieses in kochender SDS-Lösung und mit Trifluoressigsäure behandelte (Scholtmeijer *et al.*, 2001). Erste Versuche der rekombinanten Expression erfolgten mit dem Klasse I Hydrophobin EAS in *E. coli* (Kwan *et al.*, 2006). Die Aufreinigung von Hydrophobinen aus *E. coli* im industriellen Großmaßstab gelang erstmals der BASF SE (Wohlleben *et al.*, 2010). Durch die N-terminale Fusion der Synthase YaaD aus *Bacillus subtilis* an das Hydrophobin DewA aus *A. nidulans* war es möglich, große Mengen des Fusionsproteins aus Einschlusskörperchen aufzureinigen. Seitdem wurden Hydrophobine in vielen Anwendungsgebieten erforscht. Beispielsweise wird deren Einsatz als Emulgator für Wasser-Öl Gemische (Wohlleben *et al.*, 2010) oder als schaumstabilisierender Zusatz untersucht (Murray, 2007; Basheva *et al.*, 2011). Dies wird in der Lebensmittelindustrie, z.B. bei der Bierherstellung, als störend empfunden (Shokribousjein *et al.*, 2011). Industriell eingesetzt wird das Fusionsprotein H*B der BASF SE (YaaD_DewA) von der RIBLER GmbH aus Stuttgart als Zusatzstoff im Kaltleim, der beim Buchbinden zum Einsatz kommt. Durch den Einsatz des Hydrophobins wird die Verbindung des Leims mit dem Papier verbessert, was zu stabileren Klebeflächen führt. Bereits gezeigt werden konnte auch, dass die immunologisch inerten Hydrophobine die Aufnahme von hydrophoben Pharmazeutika vereinfacht (Akanbi *et al.*, 2010), diese vor dem zu schnellen Abbau durch körpereigene Enzyme schützt (Zhao *et al.*, 2016) und eine gezielte, dosierte Abgabe der Medikamente an den Körper ermöglicht (Valo *et al.*, 2010; Bayry *et al.*, 2012). Die Fähigkeit der Hydrophobine, sich in Wasser-Tensid-Gemischen an der nicht-anionischen Tensidphase anzulagern, ermöglicht deren Einsatz in der selektiven Proteinaufreinigung im AMTPS Verfahren (*aqueous micellar two-phase system*) (Lahtinen *et al.*, 2008; Joensuu *et al.*, 2010). Auch die Anwendung als Schmiermittel, als Beschichtung zur Verminderung des Biofilmwachstums oder der Einsatz in Biosensoren wurden untersucht (Hektor & Scholtmeijer, 2005; Zhao *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015). Die heterologe Expression ermöglicht es ebenfalls, funktionelle Gruppen, Peptide oder ganze Enzyme an Hydrophobine zu fusionieren. So konnten Titanoberflächen mit Fusionsproteinen aus DewA und den Peptiden

RGD und LG3 so modifiziert werden, dass Osteoblasten besser anhaften und Titanimplantate möglicherweise besser und schneller im Körper verwachsen (Boeuf *et al.*, 2011). Eine Verbesserung der Enzymaktivität sowie das Funktionalisieren von Oberflächen mit aktiven Enzymen waren ebenfalls durch die Fusion mit Hydrophobinen möglich (Ribitsch *et al.*, 2015; Fokina *et al.*, 2016).

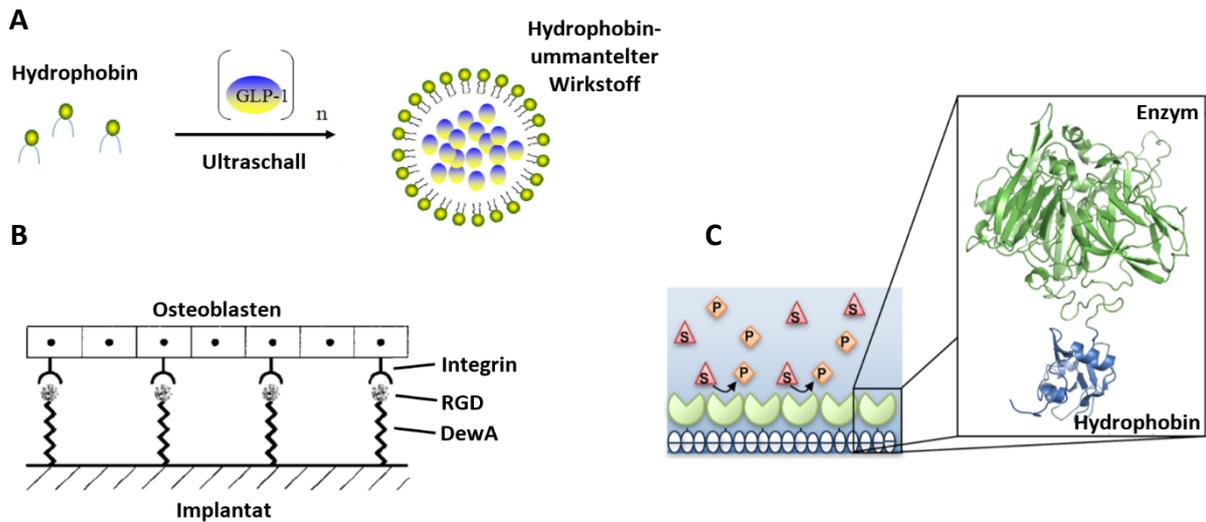


Abbildung 7: Beispiele der biotechnologischen Anwendung von Hydrophobinen

A) Ummantelung von Pharmazeutika zur besseren Aufnahme und dem Schutz vor dem enzymatischen Abbau (verändert nach Zhao *et al.*, 2016). **B)** Beschichtung von Titanoberflächen mit DewA_RGD Fusionsprotein erlauben Osteoblasten, besser an Implantaten zu haften (verändert nach Kantelehner *et al.*, 1999). **C)** Funktionalisierung von Glas mit aktiven Enzymen durch DewA_Laccase Fusionsproteine (verändert nach Fokina *et al.*, 2016)

Kapitel 2: Konservierung von steinernen Monumenten

Die Instandhaltung von steinernen Monumenten und Gebäuden besteht aus zwei Arbeitsfeldern, dem Schutz des Baumaterials vor dem Verfall und dem Verfestigen (Konsolidieren) von denaturierter Bausubstanz.

2.1 Schutz vor Umwelteinflüssen

Die größte Herausforderung in der Konservierung von steinernen Gebäuden ist der Schutz vor Wasser (Poli *et al.*, 2004), sei es Regen, Kondenswasser oder die Feuchtigkeit, die durch kapillare Kräfte aus dem Untergrund aufsteigt (Andreotti *et al.*, 2018). Dabei sind die unzähligen Gefrier- und Auftauzyklen von Feuchtigkeit, die im Inneren des Steines eingeschlossen ist, hauptsächlich verantwortlich für deren Zerfall. Dazu kommt die chemische Korrosion, verursacht durch verschmutzte Luft und sauren Regen sowie das Auskristallisieren von Salzen (Toniolo *et al.*, 2002). Daher ist der einfachste Weg, den Verfall der steinernen Bausubstanz zu verhindern, eine Erhöhung der Hydrophobizität der Steinoberfläche. Während der letzten Dekaden wurde eine Vielzahl an physikalischen und chemischen Behandlungen vorgeschlagen, um die Wasserabsorption in den Stein zu verhindern. Eine Möglichkeit, Oberflächen wasserabweisender zu machen, ist es, die Rauheit dieser zu erhöhen (Tserepi *et al.*, 2006; Chau *et al.*, 2009). Der erfolgreiche Einsatz von Plasmalasern zur Oberflächenbehandlung (Coulson *et al.*, 2000; Tserepi *et al.*, 2006) wurde jedoch verworfen, da sie im Gebäudeschutz weder logistisch noch wirtschaftlich vertretbar war (Manoudis *et al.*, 2009). Andere Methoden sind das Auftragen von natürlichen oder synthetischen Wachsen (Klingspore & Kwiatowski, 1992), von Acryl- oder Siloxan-basierten Harzen (van Hees *et al.*, 1997; Alessandrini *et al.*, 2000) und von Perfluoralkoxy-Polymeren (Toniolo *et al.*, 2002), die alle eine wasserabweisende Schicht auf der Oberfläche bilden. In den letzten Jahren wurde der Zusatz von Nanopartikeln zu den bereits etablierten Polymer-basierten Schutzmitteln erforscht. Anorganische Siliziumoxid- (SiO_2) und Titanoxid- (TiO_2) Nanopartikel wurden Polymethylmethacrylat, Polyalkylsiloxanen (Manoudis *et al.*, 2008; Manoudis & Karapanagiotis 2014) oder Polydimethylsiloxan (PDMS) (Kapridaki & Maravelaki-Kalaitzaki, 2013) beigemischt und konnten so die Hydrophobizität der Polymerbeschichteten Oberflächen weiter erhöhen (Colangiuli *et al.*, 2015; Munafò *et al.*, 2015).

Doch die Beschichtung von steinernen Oberflächen mit den organischen Polymeren hat auch negative Auswirkungen. So verlieren einige Produkte schon nach kurzer Zeit ihre wasserabweisende Wirkung (Toniolo *et al.*, 2002; Matteini, 2008), verändern die Farbe des Substrates oder lösen sich von diesem ab (Esposito Corcione *et al.*, 2016; Graziani *et al.*, 2016). Eine weitere Anforderung an die Produkte ist die Möglichkeit, wieder restlos von der Oberfläche entfernbar zu sein. Diese wurde in der Charta der Steinrestauratoren niedergeschrieben (Ministero della Pubblica Istruzione, 1972; De Naeyer *et al.*, 2000) und mehrfach von Wissenschaftlern hervorgehoben, da viele der verwendeten Produkte dieser Anforderung nicht entsprechen (Della Volpe *et al.*, 2000; Kourkoulis, 2006).

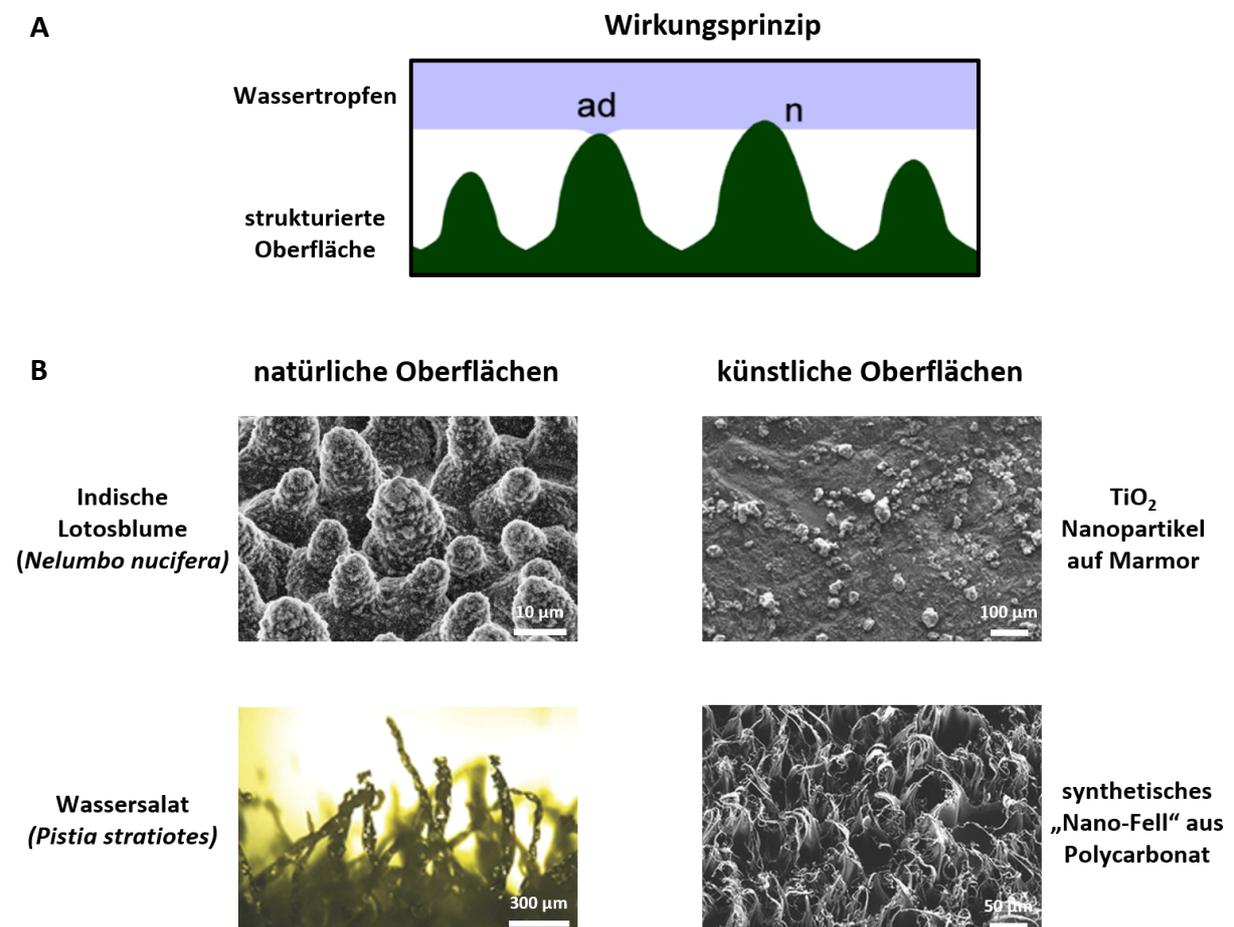


Abbildung 8: Hydrophobe Oberflächen

A) Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips einer hydrophoben Oberfläche. Das Wasser hat nur sehr geringen Kontakt zur Oberfläche und kann so nicht an ihr haften (verändert nach Ensikat *et al.*, 2011). **B)** Zwei Beispiele der künstlichen Nachahmungen von natürlich vorkommenden wasserabweisenden Oberflächen. Bekannt ist vor allem die schmutzabweisende Blattoberfläche der Lotosblume mit ihren unzähligen Pili, die durch das Aufbringen von Nanopartikeln auf glatten Oberflächen nachgeahmt wird (verändert nach Ensikat *et al.*, 2011; Manoudis *et al.*, 2009). Ein anderes Beispiel ist die mit feinen Haaren besetzte Blattoberfläche des Wassersalates, dessen hydrophober Charakter durch ein synthetisches Fell aus nanostrukturierten Polycarbonat-Härchen auf Solarpaneele übertragen wird (Vüllers *et al.*, 2016).

Doch nicht nur eindringendes Wasser ist verantwortlich für den Zerfall der steinernen Bausubstanz von Monumenten und Gebäuden. Aggressive, phenolische Chemikalien und Farbstoffe greifen die Steinoberfläche an und machen sie porös, was sie noch anfälliger für das Eindringen von Wasser macht. Seit der Entdeckung seiner photokatalytischen Aktivität (Renz, 1921) wurde TiO_2 in einer Vielzahl chemischer Prozesse eingesetzt und findet auch seit einigen Jahren Einsatz im Denkmalschutz (Munafò *et al.*, 2015). Das hydrophile Titanoxid wird, wie oben beschrieben, hydrophoben organischen Polymeren als Nanopartikel beigemischt und auf steinerne Gebäude aufgetragen. Durch die lichtinduzierte, katalytische Aktivität ist TiO_2 in der Lage, phenolische Ringe zu zerstören und somit Farbstoffe abzubauen, wie es am Beispiel von Rhodamin, Methylenblau und an anderen Azo-Farbstoffen gezeigt wurde (Lu *et al.*, 2015; Quagliarini *et al.*, 2018; Roveri *et al.*, 2018).

Auch Mikroorganismen, die als Biofilm auf den Steinoberflächen wachsen, sind verantwortlich für optische Schäden an Monumenten und dem Verfall der Bausubstanz. Dabei handelt es sich neben den dominant vorkommenden Cyanobakterien sowie Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Pseudomonas* und *Staphylococcus* auch um Pilze, Algen und Flechten (Warscheid & Braams, 2000; McNamara & Mitchell, 2005; Scheerer *et al.*, 2009). Sie greifen den Stein durch die Absonderung von sauren Metaboliten an, bohren sich hinein oder zerstören den ästhetischen Aspekt des Gebäudes durch das Verändern der Farbe (Herrera *et al.*, 2004; Nuhoglu *et al.*, 2006). Um eine Kolonisierung der Steinoberflächen zu verhindern, wird der Einsatz von Silber-, Zirconiumoxid- und Kupferoxid-Nanopartikeln vermehrt erforscht (Miller *et al.*, 2015; Sierra-Fernandez *et al.*, 2017; Zarzuela *et al.*, 2017).

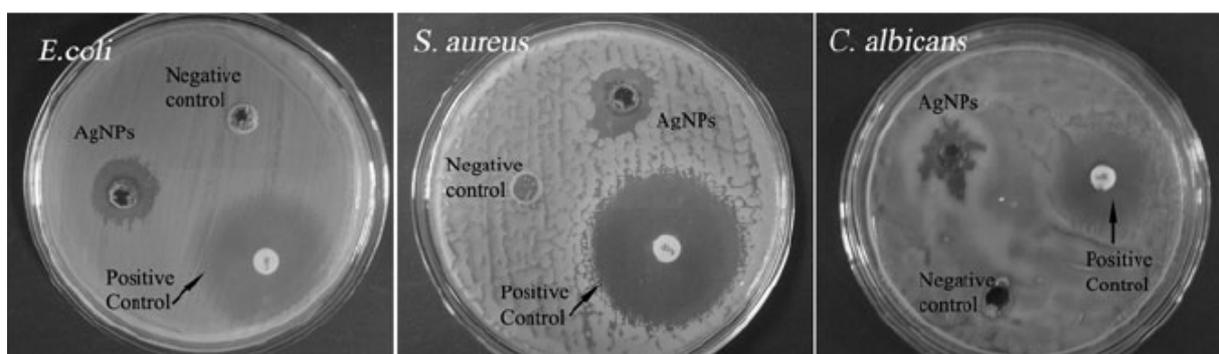


Abbildung 9: Antimikrobielle Wirkung von Nanopartikeln

Hemmhoftest von Silber-Nanopartikeln gegen das gramnegative Bakterium *E. coli*, das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus* und die Hefe *Candida albicans*. Chloramphenicol wurde als Positivkontrolle, n-Hexan als Negativkontrolle eingesetzt (Shah *et al.*, 2015).

2.2 Verfestigung der Bausubstanz

Neben dem Schutz der Bausubstanz vor weiterem Verfall ist das Konsolidieren, also das Reparieren von bereits entstandenen Schäden, die zweite, große Herausforderung im Denkmalschutz. Durch äußere Einflüsse entstehen im Stein größere Poren und allgemein eine erhöhte Porosität, was das Material mechanisch instabiler werden lässt. So erhöht sich gleichzeitig die Anfälligkeit für das Eindringen von Wasser, wodurch weiterer Verfall begünstigt wird (Cardell *et al.*, 2003; Steiger *et al.*, 2011). Erste Versuche, die porösen Steinoberflächen zu konsolidieren, erfolgten mit Calciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Bariumhydroxid ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) und Ammoniumoxalat ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$) (Schnabel, 1992; Price *et al.*, 1998; Lanterna *et al.*, 2000). Diese anorganischen Stoffe dringen jedoch nicht tief in den Stein ein und verfestigen das behandelte Material nur in der äußersten Schicht. Die heutzutage am weitesten verbreiteten Stoffe zur Konsolidierung sind die organischen Alkoxysilane, da sie tiefer in den porösen Stein eindringen und so zu einer stärkeren Verfestigung führen. Das am meisten benutzte Produkt ist TEOS (Tetraethoxysilan), welches nach dem Eindringen in den Stein mit der Restfeuchtigkeit reagiert, polymerisiert und aushärtet (Wheeler, 2005; Pinto & Delgado Rodrigues, 2008). Das gebildete Silikat-Polymer bildet dabei Brücken zwischen den einzelnen Steinkörnern und verleiht dem porösen Material so mehr Stabilität. Der Nachteil an Alkoxysilanen ist das Schrumpfen der Chemikalie beim Auspolymerisieren, was zu Spannungen und Rissen im Produkt und dadurch auch im Stein führt (Weiss *et al.*, 2000; Wheeler *et al.*, 2000). Andere organische Stoffe wie Epoxidharze wären in der Lage, dem Stein eine größere mechanische Stabilität zu vermitteln, sind aber aufgrund ihrer hohen Viskosität und der einhergehenden Farbveränderung des Substrates nicht geeignet, Steine zu konsolidieren (Selwitz, 1992).

Ähnlich wie beim Schutz vor Umwelteinflüssen hielten auch Nanopartikel Einzug bei der Reparatur entstandener Schäden in steinernen Oberflächen, da ihre geringe Größe und die damit veränderte Oberflächenenergie das Eindringen in den Stein vereinfachen soll (Sierra-Fernandez *et al.*, 2018). Als erstes Produkt wurden Calciumhydroxid-Nanopartikel in Isopropanol in den Stein eingebracht (Ziegenbalg *et al.*, 2008; Giorgi *et al.*, 2010). Nach dem Verdampfen des Alkohols reagieren die Nanopartikel mit Kohlendioxid und der Restfeuchtigkeit im Stein zu Calciumcarbonat. Ein Nachteil ist jedoch das Isopropanol, da der Alkohol beim Verdampfen die Nanopartikel wieder teilweise aus den tieferen Steinschichten

herauszieht (Borsoi *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu ist die Verwendung von Diammoniumhydrogenphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), das im Stein mit dem vorhandenen Calzit zu Hydroxyapatit reagiert, besser zur Konsolidierung geeignet. Die Nanopartikel werden in einer wässrigen, leicht basischen Lösung aufgetragen, welche langsamer und gleichmäßiger trocknet, sodass die Partikel tiefer im Stein verbleiben (Naidu *et al.*, 2011; Sassoni *et al.*, 2011; Sassoni *et al.*, 2013).

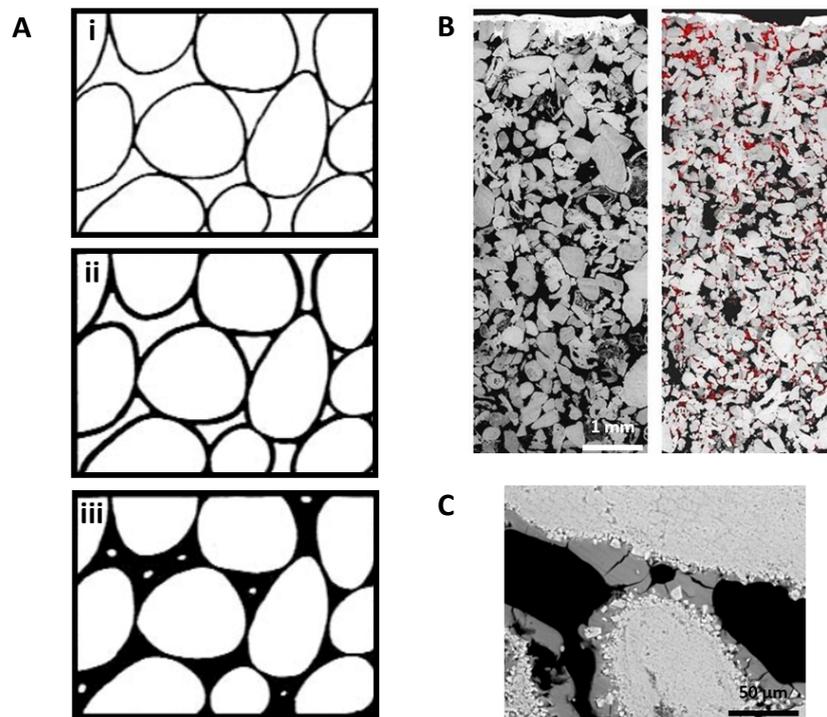


Abbildung 10: Konsolidierung von porösem Steinmaterial

A) Schematische Darstellung eines körnigen, nicht konsolidierten Steines (**i**), eines Steines mit einem Verfestigungsmittel, das Brücken bildet, um die einzelnen Körner miteinander zu verbinden (**ii**) und eines Steines behandelt mit einem Produkt, das die Hohlräume größtenteils ausfüllt (**iii**) (verändert nach Clifton & Frohnsdorff, 1980). **B)** SEM-Aufnahme (*Scanning Electron Mikroscope*) eines unbehandelten (links) und mit TEOS behandelten Kalksteins (rechts). Das gebildete Silikat-polymer ist in Rot hervorgehoben (verändert nach Milchín *et al.*, 2016). **C)** SEM-Detaillaufnahme der Brückenbildung zwischen den einzelnen Körnern eines mit TEOS behandelten Kalksteins. Das Steinmaterial ist in Weiß, das Silikat-Polymer in Hellgrau dargestellt (Coltelli *et al.*, 2018).

Kapitel 3: Antimikrobielle Peptide

Durch die Entdeckung von Penicillin im Jahr 1929 (Fleming, 1929) und dessen industrieller Produktion in den frühen 40er Jahren gelang der Medizin der bis dato größte Schritt in der Bekämpfung von Wund- und Infektionskrankheiten. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche weitere Antibiotika entdeckt, wie z. B. Streptomycin (Schatz *et al.*, 1944) und Aureomycin (Duggar, 1948). Die Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen hält jedoch an, da sich vermehrt antibiotikaresistente Pathogene entwickeln, deren Eindämmung eine der größten Herausforderungen in der modernen Medizin darstellt.

Ein solcher Wirkstoff stammt dabei vielleicht aus der Gruppe der antimikrobiellen Peptide (AMPs), wovon das erste 1962 aus der Haut der Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) isoliert wurde (Kiss & Michl, 1962). Sie werden von zahlreichen Organismen wie Protozoen, Pilzen, Pflanzen, Insekten, Vögeln, Fischen und Säugetieren einschließlich des Menschen produziert (Martin *et al.*, 1995; Hancock & Lehrer, 1998; Wang & Wang, 2004; Leippe *et al.*, 2005). AMPs sind ein Bestandteil der angeborenen, unspezifischen Immunantwort (Boman, 1995) und dienen der primären Abwehr eindringender Pathogene (Zaslouff, 2002; Oppenheim *et al.*, 2003; Hancock *et al.*, 2006). Sehr nah miteinander verwandte AMPs sind über mehrere Reiche des Lebens verteilt. Dies lässt vermuten, dass AMP-Gene bereits bei den ursprünglichen Eukaryoten, noch vor der Aufteilung in verschiedene Reiche, vorhanden waren (Lehrer & Ganz, 1999; Lehrer, 2007; Zhu, 2008). Bis heute (Stand 04.08.2018) sind laut der *Antimicrobial Peptide Database* 2521 Peptide mit einer antibakteriellen, 1078 Peptide mit einer fungiziden und 182 Peptide mit einer antiviralen Wirkung bekannt (Wang & Wang, 2004; Wang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016). Unter ihnen sind auch Peptide, die wirksam gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) sind (Jenssen *et al.*, 2006; Hancock *et al.*, 2006). Kürzlich wurde sogar der Einsatz von AMPs als Wirkstoff gegen Krebszellen positiv getestet (Mader & Hoskin, 2006; Mader *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009).

3.1 Struktur antimikrobieller Peptide

AMPs bestehen in der Regel lediglich aus neun bis 50 Aminosäuren und zeichnen sich durch eine hohe strukturelle Diversität aus. Ein Großteil der AMPs besitzt durch die Anhäufung der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin eine positive Nettoladung, was ihnen das Anlagern an die negativ geladene Plasmamembran ermöglicht. Zusätzlich bestehen die Peptide bis zu 50% aus hydrophoben Resten, was ihnen einen amphiphilen Charakter verleiht (Hancock & Chapple, 1999; Hancock, 2001). Aufgrund der nicht existierenden Homologie zwischen den AMPs ist eine starre Einteilung unmöglich, doch man hat sich grob auf die Klassifizierung in vier Gruppen geeinigt (Andreu & Rivas, 1998; Hancock, 2001; Brogden, 2005).

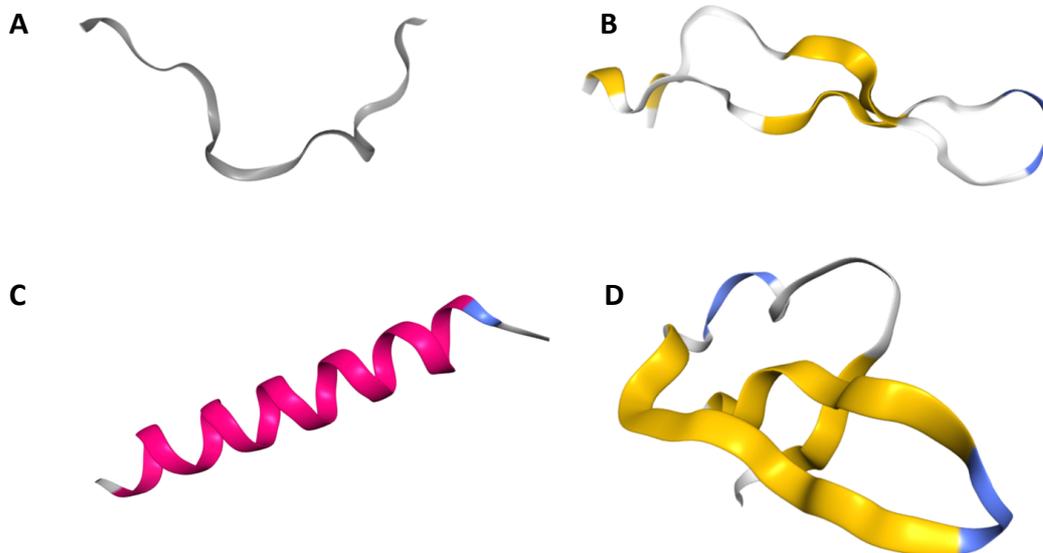


Abbildung 11: Schematische Darstellung der vier AMP-Gruppen

A) lineare, gestreckte Peptide ohne Sekundärstruktur wie das Indolicidin aus dem Hausrind (1G89). **B)** Peptide mit β -Faltblättern und Schleifenstruktur (β -hairpin) wie das Lactoferrin, ebenfalls aus dem Hausrind (1LFC). **C)** α -helikale Peptide wie das Distinctin D1 aus der Haut der Makifrösche (1XKM). **D)** Peptide mit mehreren β -Faltblatt Strukturen, die durch zwei bis drei Disulfidbrücken stabilisiert werden. Ein Beispiel hierfür ist das menschliche α -Defensin 1 (3GNY). Die 3D-Abbildungen wurden mit dem NGL Viewer erstellt (Rose & Hildebrand, 2015), die entsprechenden PDB-Codes sind angegeben.

Lineare Peptide wie Indolicidin (Rozek *et al.*, 2000), das aus den neutrophilen Granulozyten des Hausrindes isoliert wurde, enthalten keine sekundären Strukturen und besitzen lediglich eine gestreckte Spiralstruktur (Abb. 11A). Das AMP Lactoferrin (Hwang *et al.* 1998), ebenfalls aus dem Hausrind, enthält wie die anderen AMPs der zweiten Gruppe zwei β -Faltblätter und

bildet eine Schleifenstruktur (β -hairpin), die durch eine Disulfidbindung stabilisiert wird (Abb. 11B). Amphipatische, α -helikale Peptide wie das Distictin D1 aus der Haut der Makifrösche (*Phyllomedusa distincta*) (Raimondo *et al.*, 2005) oder das menschliche LL-37 (Cowland *et al.*, 1995; Larrick *et al.*, 1995) nehmen ihre Struktur erst in Gegenwart von anionischen Tensiden, Alkoholen oder Phospholipiden ein (Brogden, 2005). In wässriger Lösung sind sie unstrukturiert und zeigen erst durch die Ausprägung der α -Helix eine antimikrobielle Wirkung (Abb. 11C) (Park *et al.*, 2000). Zu der vierten Gruppe AMPs gehört das menschliche α -Defensin 1 (Wei *et al.*, 2009). Die Peptide dieser Gruppe besitzen mehrere β -Faltblatt-Strukturen und werden durch zwei bis drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert (Abb. 11D). Peptide mit β -Faltblatt- und α -helikalen-Strukturen sind die am meisten verbreiteten in der Natur (Hancock, 2001).

3.2 Wirkungsweise der AMPs

Durch elektrostatische und hydrophil-hydrophobe Wechselwirkungen sind antimikrobielle Peptide in der Lage, mit der Plasmamembran des Zielorganismus zu interagieren und diese teilweise zu zerstören. Vor allem der Wirkmechanismus von AMPs gegen eine Vielzahl von Bakterien ist untersucht. Die kationischen AMPs werden von den negativ geladenen Membranen der Bakterien angezogen, können sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters in die Membran integrieren und diese so permeabilisieren (Brogden, 2005). Die Wirkungsweise wurde in *in vitro* Experimenten an künstlichen Lipiddoppelmembranen nachgewiesen. Dazu wurden Phospholipid-Mizellen, die in ihrem Inneren einen Farbstoff tragen, mit unterschiedlichen AMPs behandelt und der Farbstoffaustritt dokumentiert (Kang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten müssen die AMPs, um ihre Wirkung an der Cytoplasmamembran zu entfalten, *in vivo* die Mureinschicht der grampositiven und die äußere Membran der gramnegativen Bakterien passieren. Im Gegensatz zu den grampositiven Bakterien, wo dieser Mechanismus nicht wirklich verstanden ist, ist die Wirkungsweise in gramnegativen Bakterien zumindest teilweise erforscht (Brogden, 2005). Die positiv geladenen AMPs verdrängen durch ihre hohe Affinität zu den Lipopolysacchariden der äußeren Membran Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Kationen, was zur Instabilität der äußeren Membran führt (Jenssen *et al.*, 2006). Durch eine konsekutive, nicht

näher erforschte, selbstinduzierte Aufnahme kommt es zu einer vermehrten Translokation der AMPs zur inneren Membran (Hancock, 1997).

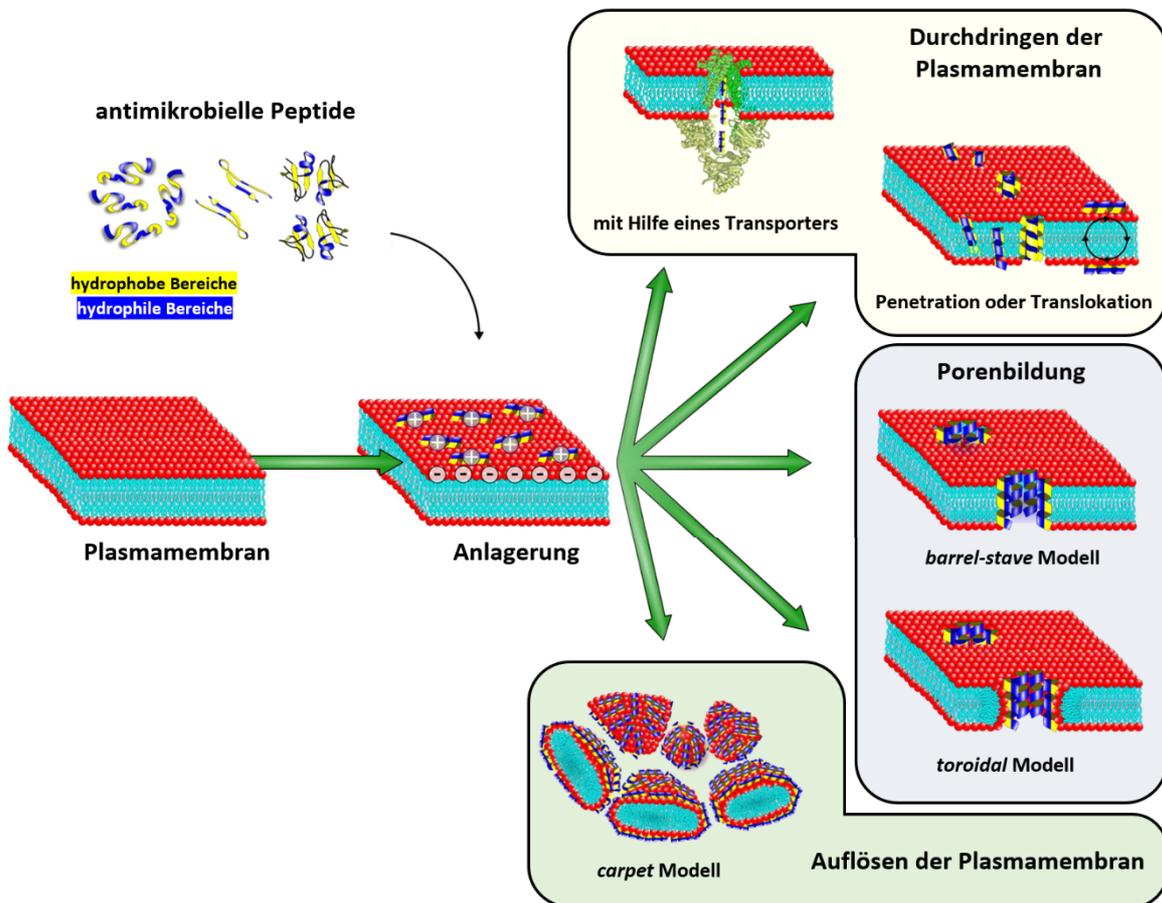


Abbildung 12: Wirkmechanismus der antibakteriellen Peptide auf die Cytoplasmamembran

Die kationischen AMPs lagern sich an der negativ geladenen Plasmamembran an und können dank ihres amphiphilen Charakters in diese integrieren. Entweder passieren die AMPs die Membran durch Translokation oder mit Hilfe eines Transporters und entfalten ihre Wirkung im Cytoplasma, oder sie beschädigen die Plasmamembran durch Porenbildung (nach dem *barrel-stave* oder *toroidal* Modell) oder lösen diese auf (nach dem *carpet* Modell) (verändert nach Ageitos *et al.*, 2017).

Der Wirkmechanismus der antimikrobiellen Peptide beruht entweder auf der Porenbildung und dem Auflösen der Cytoplasmamembran oder der Störung intrazellulärer Prozesse nach Passieren der Plasmamembran. Für die Wirkungsweise an der Cytoplasmamembran gibt es drei Erklärungsmodelle, die je nach AMP zutreffen.

Das erste ist das *barrel-stave* Modell. Dabei lagern sich die AMPs mit ihrer hydrophoben Seite an die Lipidreste der Phospholipide und bilden Poren, deren Kern aus den hydrophilen

Seiten der AMPs besteht. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid Alamethicin aus *Trichoderma viride* (Bechinger, 1999). Die α -helikalen AMPs bilden aus drei bis elf Molekülen wassergefüllte Poren mit einem Durchmesser von 2,5 – 3 nm (Sansom, 1993; Matsuzaki *et al.*, 1995).

Das zweite ist das *toroidal* Modell, bei dem sich die α -helikalen Peptide in die Plasmamembran einlagern und so eine Spannung innerhalb der Membran erzeugen. Dies führt zu einer Krümmung der Lipiddoppelmembran und der Entstehung von Poren, deren Inneres von den polaren Kopfgruppen der Phospholipide und den hydrophilen Seiten der AMPs ausgekleidet ist (Brogden, 2005). Ein Beispiel für diesen Wirkmechanismus ist das Magainin 2 aus dem afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987). Im Gegensatz zum *barrel-stave* Modell bestehen die Poren nur aus vier bis sieben Peptidmonomeren und haben einen flexibleren Durchmesser von 3 – 5 nm (Matsuzaki *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001).

Das dritte ist das *carpet-like* Modell. Im Gegensatz zu den vorherigen Modellen lagern sich die AMPs hierbei horizontal an die Plasmamembran an, es kommt nicht zur Porenbildung (Pouny *et al.*, 1992). Nach dem Erreichen einer kritischen AMP-Konzentration an der Außenseite erfolgt der Zusammenbruch der Plasmamembran, vermutlich unter der Bildung von Micellen (Shai, 1999; Ladokhin & White, 2001). Das AMP Ovispirin aus dem Knochenmark des Hausschafes ist ein Beispiel für diesen Wirkmechanismus (Kalfa *et al.*, 2001). Doch die antibakterielle Wirkung der AMPs beruht nicht nur auf der Perforierung der Plasmamembran, sondern auch auf der Störung intrazellulärer Prozesse. So hat man festgestellt, dass Bac7 Fragmente in das Cytoplasma von *E. coli* eindringen, ohne die Plasmamembran zu zerstören. Das Wachstum der behandelten Bakterienkulturen wurde trotzdem um den logarithmischen Faktor 2,5 verringert (Gennaro & Zanetti, 2000). Das Spektrum an Angriffsziele reicht dabei von der Proteinbiosynthese über die DNA-Replikation, enzymatische Prozesse bis hin zur Zellatmung (Lehrer *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2000; Patrzykat *et al.*, 2002; Boman, 2003).

Obwohl über tausend AMPs mit fungizider Wirkung bekannt sind, ist der Wirkmechanismus dieser Peptide weit weniger untersucht als der der antibakteriellen Peptide. Und auch hier gilt, dass durch die große strukturelle Diversität keine genauen Wirkmechanismen vorhersagbar sind (van der Weerden *et al.*, 2013). Auch unterscheidet sich die Zusammensetzung der pilzlichen Plasmamembran von der bakteriellen, was unterschiedliche

Wirkmechanismen hervorrufen muss (Matsuzaki, 1999). So besitzen pilzliche Plasmamembranen unterschiedliche, anionische Phospholipide und zusätzlich Ergosterol (Bloch, 1983; Theis & Stahl, 2004). Außerdem umgibt die Zellen eine Zellwand, die aus Proteinen, Chitin, Glukan- und Mannanpolymeren besteht. Bei filamentösen Pilzen und Hefen besteht die Zellwand zu über 50% aus β -1,3-Glucanpolymeren, die über β -1,6-Bindungen miteinander verknüpft sind (Schoffelmeer, 1999). Dazu kommt eine dünne Schicht Chitin entlang der Plasmamembran sowie glykosylierte Proteine (Bowmann & Free, 2006).

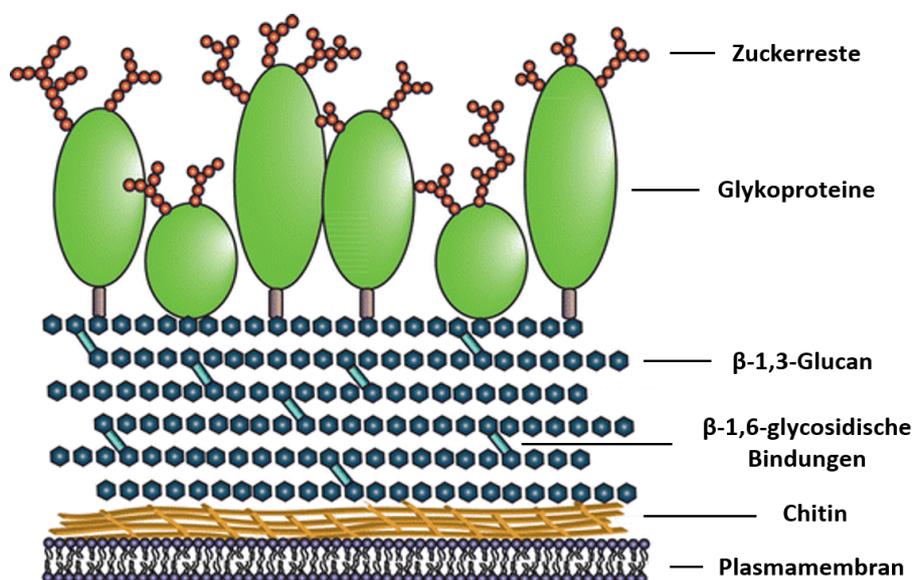


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der pilzlichen Zellwand

Dargestellt sind die Glykoproteine (grün) mit anhaftenden Zuckerresten (orange), das β -1,3-Glucannetzwerk (dunkelblau) mit den β -1,6-glycosidischen Bindungen (hellblau), und das Chitin (gelb), das auf der Plasmamembran aufliegt (verändert nach van der Weerden *et al.*, 2013).

Die größte Klasse an fungiziden AMPs bilden die Defensine oder Defensin-ähnliche Peptide (van der Weerden *et al.*, 2013). Wie bei den antibakteriellen AMPs unterscheidet man bei den fungiziden Peptiden zwischen denen, die Schäden an der Plasmamembran der Pilze verursachen, und denen, die in die Zellen eindringen und dort ihre Wirkung entfalten. Laut neuesten Studien besteht jedoch kein direkter Kontakt der AMPs mit den Phospholipiden der Membran (Hegesüs & Marx, 2013). Die AMPs binden an spezifische Domänen in den *lipid rafts*, was eine hohe räumliche Konzentration an fungiziden Peptiden ermöglicht (De Coninck *et al.*, 2013). Durch transiente Poren oder mit Hilfe von Transportern ist es den

AMPs möglich, in das Cytoplasma vorzudringen (Marx *et al.*, 2008) und dort die Bildung von Sauerstoffradikalen und den programmierten Zelltod herbeizurufen (Leiter *et al.*, 2005; Aerts *et al.*, 2011).

3.3 Synthetische AMPs

In den letzten zehn Jahren ist das Herstellen von synthetischen antimikrobiellen Peptiden in den Mittelpunkt der AMP-Forschung gerückt und dient dabei verschiedenen Zwecken (Ouardien *et al.*, 2018). AMPs sind nur in sehr geringen Mengen aus den natürlichen Produzenten zu gewinnen, was eine großflächige Anwendung als Antibiotika-Ersatz unmöglich macht (Ghosh & Halder, 2015). Außerdem ermöglicht das synthetische Herstellen von AMPs die Modifizierung der Aminosäuresequenz. Dadurch ist es möglich, den Wirkungsmechanismus der einzelnen Strukturen innerhalb der AMPs zu analysieren und möglicherweise deren Wirkung zu verbessern (Ouardien *et al.*, 2018). Viele natürliche AMPs haben unerwünschte Nebeneffekte wie das Schädigen von Säugerzellen, die durch ein besseres Verständnis des Peptidaufbaus und den Austausch von Aminosäuren gelöst werden könnten (Brogden & Brogden, 2011; Czaplewski *et al.*, 2016). Die Erforschung und Herstellung von künstlichen antimikrobiellen Peptiden, deren Sequenz nicht mit der von natürlichen AMPs übereinstimmt, ist auch deshalb wichtig, da bereits einige pathogene Bakterienstämme bekannt sind, die Resistenzen gegen bestimmte Peptide aufweisen (Guilhelmelli *et al.*, 2013). Ein AMP, auf dessen Basis über hundert verschiedene Varianten synthetisch hergestellt wurden (Hilpert *et al.*, 2005), ist das nur zwölf Aminosäuren große Bactenecin (RLCRIVVIRVCR), was in den Neutrophilen von Rindern gefunden wurde (Romeo *et al.*, 1988). Das durch eine Disulfidbrücke stabilisierte Peptid zeigt eine mäßige Wirkung gegen gramnegative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) und grampositive (*Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerosis*) Bakterien. Bereits das Ersetzen der Cysteine durch Alanine und damit das Entfernen der Disulfidbrücke verstärkte die Wirkung gegen grampositive Bakterien um 50 % (Wu & Hancock, 1999).

Zielsetzung

Seit der Entdeckung der Hydrophobine und der Möglichkeit, sie heterolog in größerem Maßstab zu produzieren, ergeben sich immer mehr potentielle Anwendungsbereiche für die kleinen, amphiphilen Proteine. Die Expression in *E. coli* ist dabei jedoch an die Fusion der Hydrophobine an bestimmte Peptide gebunden. In dieser Arbeit soll ein System entwickelt werden, das die Expression unterschiedlichster Hydrophobine in *E. coli* ohne die Fusion an einen permanenten N-terminalen *Tag* ermöglicht. Die für die Expression ausgewählten *A. nidulans* und *T. reesei* Hydrophobine werden anschließend auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht und mögliche technologische Anwendungen getestet. Außerdem sollen die bis dato teilweise nicht klassifizierten *A. nidulans* Hydrophobine einer der zwei postulierten Hydrophobinklassen zugeordnet werden.

Zusätzlich soll der Einsatz von Hydrophobinen im Denkmalschutz untersucht werden. Das Projekt *NANO-CATHEDRAL (Nanomaterials for conservation of European architectural heritage developed by research on characteristic lithotypes)* beschäftigt sich mit der Anwendung von Nanopartikeln zum Schutz steinerner Monumente vor dem Verfall. Die klassischen Produkte stoßen aufgrund ihrer limitierten Schutzeigenschaften an ihre Grenzen und neue, innovative Mittel werden benötigt. Aufgrund der Eigenschaft, hydrophile Oberflächen in hydrophobe zu verwandeln, sollen die natürlich vorkommenden Nanopartikel Hydrophobine als wasserabweisende Beschichtung auf verschiedenen Lithotypen getestet werden.

Die heterologe Expression von Proteinen ermöglicht es, diese nach Wunsch zu verändern und zu modifizieren. So soll in einem weiteren Schritt die Fusion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) an Hydrophobine untersucht werden. Mit den AMP-Hydrophobin Fusionsproteinen sollen Oberflächen beschichtet und auf antibakterielle oder fungizide Eigenschaften hin getestet werden.

III Ergebnisse

Kapitel 1: Heterologe Expression und Charakterisierung pilzlicher Hydrophobine

1.1 Aufbau eines alternativen Expressionssystems für pilzliche Hydrophobine

Die Aufreinigung der amphiphilen, für technische Anwendungen sehr interessanten Hydrophobine aus den pilzlichen Ursprungstämmen ist mit einem sehr großen Aufwand und einer sehr geringen Ausbeute verbunden, was die industrielle Verwendung dieser Proteine lange Zeit unmöglich machte. Die Produktion eines Hydrophobins im großen Maßstab gelang erstmals der BASF SE (Wohlleben *et al.*, 2010) mit der heterologen Expression des Hydrophobins DewA in *E. coli*. Durch die N-terminale Fusion einer verkürzten Version der Synthase YaaD aus *B. subtilis* an das Hydrophobin konnten große Mengen dieses Fusionsproteins (genannt H*B) gewonnen werden (Abb. 13A). Der mit 40 Aminosäuren relativ große Fusionspartner macht eine Charakterisierung des Hydrophobins schwierig, da er dessen biochemische Eigenschaften möglicherweise maskiert. Außerdem ist eine Verwendung dieses Expressionssystems im Projekt *NANO-CATHEDRAL (Nanomaterials for conservation of European architectural heritage developed by research on characteristic lithotypes)*, unter welchem diese Arbeit entstanden ist, nicht möglich, da die BASF SE diese Technologie patentiert hat (Patent No. US 7,892,788 B2, Subkowski *et al.* 2011). Anstelle des Peptids YaaD wurde in dieser Arbeit das Signalpeptid PelB N-terminal an die Hydrophobine DewA, DewC, DewD, DewE und HFBI aus *A. nidulans* und HFBI aus *Trichoderma reesei* fusioniert (Abb. 13B). Das 22 Aminosäuren große Signalpeptid PelB stammt aus der Pektinlyase B aus *Pectobacterium carotovorum* und bewirkt die Translokation der Fusionsproteine über den Sec-Sekretionsweg in das Periplasma (Yoon *et al.*, 2010; Sockolosky & Scoka, 2013). Eine erfolgreiche Aufreinigung von PelB-Fusionsproteinen wurde bereits für das HIV-1 Protein Vpu (Deb *et al.*, 2017) sowie für Hydrophobine der Klasse II (Przylucka *et al.*, 2017) gezeigt. Zusätzlich tragen die Fusionsproteine einen C-terminalen 6-fach His-tag zum Nachweis und einer möglichen *down-stream* Aufreinigung.

Für die Herstellung der Expressionsvektoren wurden die Gene *dewA*, *dewC*, *dewD* und *dewE* aus *A. nidulans* cDNA amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *SphI* und *HindIII* in das Plasmid pET28a kloniert (Abb. 13C). Das für das Klasse II Hydrophobin HFBI codierende Gen wurde Codon-optimiert, synthetisiert und ebenfalls über die oben genannten Restriktionsschnittstellen in pET28a eingebracht. Das für das Signalpeptid PelB kodierende DNA-Fragment wurde aus zwei komplementären Oligonukleotiden durch *Primerligation* hergestellt und N-terminal über die Schnittstellen *NcoI* und *SphI* vor die jeweiligen Hydrophobine kloniert. Durch *Site-Directed Mutagenesis* wurde abschließend die *NcoI* Schnittstelle vor *pelB* entfernt, um eine optimale Distanz zwischen Fusionsprotein und der T7/lacO Promotor-Region mit der enthaltenen Pribnow-Box zu gewährleisten.

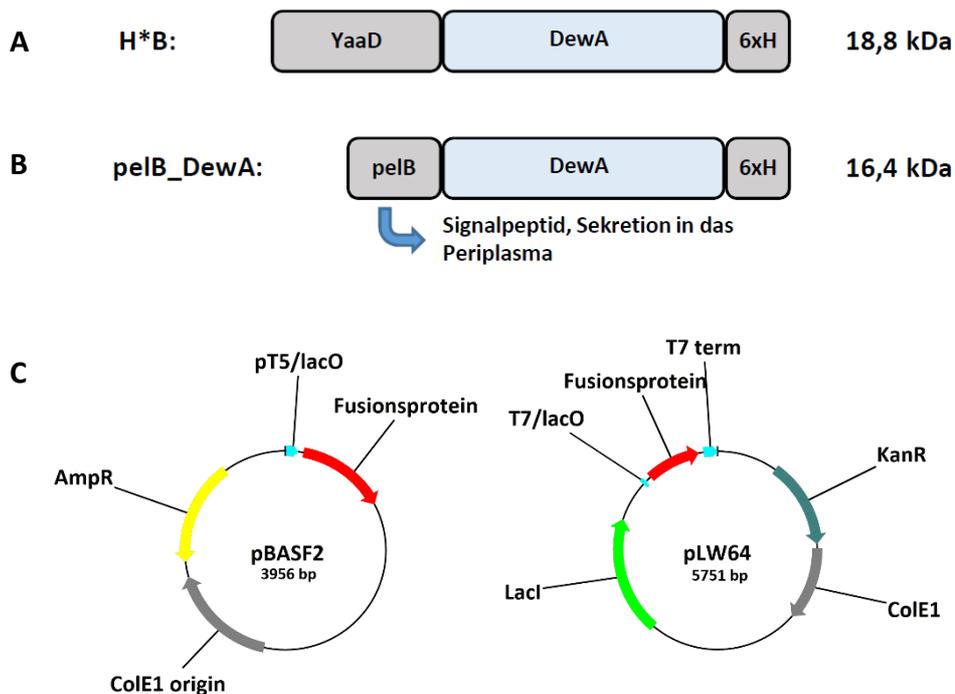


Abbildung 14: Expressionssystem für pilzliche Hydrophobine

A) Schematische Darstellung des Fusionsproteins H*B, bestehend aus dem Peptid YaaD aus *B. subtilis*, dem Hydrophobin DewA und einem 6-fach His-Tag. **B)** Schematische Darstellung des Fusionsproteins zur heterologen Expression von DewA. Das Hydrophobin wurde N-terminal an das Signalpeptid PelB aus *Pectobacterium carotovorum* fusioniert und C-terminal an einen 6-fach His-tag. Für beide Proteine ist die theoretische Masse angegeben. **C)** Vektorkarten der Plasmide zur Expression der Fusionsproteine H*B (pBASF2) und pelB_DewA (pLW64).

1.2 Aufreinigung der Hydrophobine aus *E. coli*

Die heterologe Proteinexpression fand in frisch mit dem Expressionsvektor transformierten, chemisch kompetenten SHuffle® T7 *E. coli* statt. Ausgehend von einer Übernachtskultur wurde die Hauptkultur in einem Schikanekolben angeimpft und auf eine OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 wachsen gelassen, bevor der T7 Promotor mit 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert wurde. Nach der Inkubation über Nacht wurde die Kultur geerntet und die Zellen mit der *Frensh Pressure Cell Press* (AMINCO, Maryland, USA) aufgeschlossen. In mehreren Zentrifugations- und Waschschritten wurden die Einschlusskörperchen, in denen sich die Hydrophobine zusammenlagern, aufgereinigt. Durch die Zugabe von NaOH wurden die Einschlusskörperchen aufgeschlossen und das Hydrophobin ging in Lösung. Mit H₃PO₄ wurde der pH auf 8,0 eingestellt und die löslichen Hydrophobine wurden von den restlichen festen Bestandteilen durch Zentrifugation getrennt. Die aufgereinigten Hydrophobine konnten in *Roti®-Blue* gefärbten SDS-Gelen und per Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 15). Dabei waren neben der Monomer-Bande auch Banden zu erkennen, welche in ihrer Größe Dimeren oder Trimeren entsprechen.

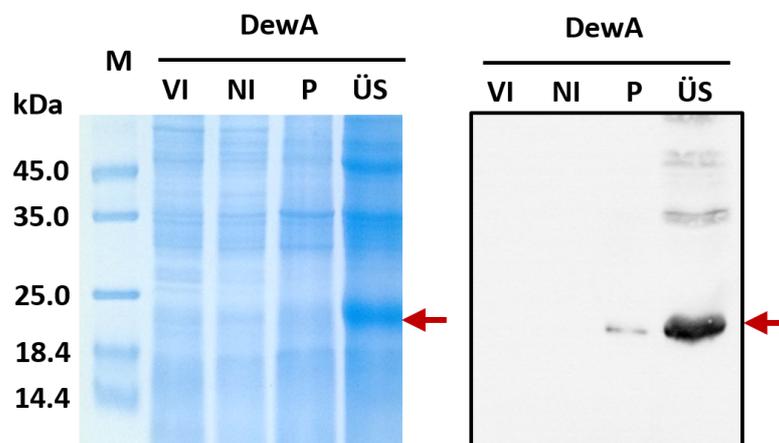


Abbildung 15: Nachweis des aufgereinigten Hydrophobins DewA

Das in *E. coli* heterolog exprimierte Protein DewA (roter Pfeil) wurde aus den Einschlusskörperchen aufgereinigt und in einer SDS-PAGE mit 15%igem Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend im Gel mit *Roti®-Blue* gefärbt oder für zwei Stunden bei 40 V auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. M = Größenstandard, VI = Probe der Kultur vor der Induktion mit IPTG, NI = Probe der Kultur 16 Stunden nach der Induktion mit IPTG, P = Pellet nach dem Aufschließen der Einschlusskörperchen, ÜS = Überstand mit dem löslichen Hydrophobin nach dem letzten Zentrifugationsschritt (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).

Mit diesem Expressionssystem war es möglich, neben DewA auch die weiteren Klasse I Hydrophobine aus *A. nidulans*, DewC, DewD und DewE sowie das Klasse II Hydrophobin HFBI aus *T. reesei* in großen Mengen zu gewinnen (Abb. 16). Die Ausbeute für eine 1-Liter Kultur betrug für DewA 2,3 mg/ml in 20 ml Endvolumen, was einer Gesamtmenge von 46 mg entspricht. Die Ausbeuten für DewC, DewD, DewE und HFBI lagen bei 68 mg, 42 mg, 38 mg und 26 mg. Die Hydrophobine wurden anschließend gefriergetrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

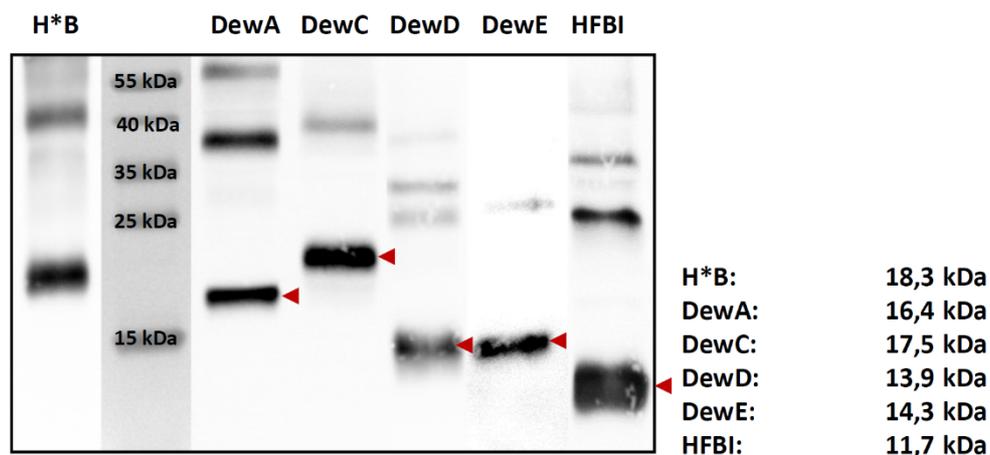


Abbildung 16: Nachweis der aufgereinigten *A. nidulans* Klasse I Hydrophobine DewA, DewC, DewD und DewE sowie des Klasse II Hydrophobins HFBI aus *T. reesei*

Die aus *E. coli* heterolog aufgereinigten Hydrophobine wurden in einer SDS-PAGE mit 15%-igem Gel aufgetrennt, für zwei Stunden bei 40 V auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und immunhistochemisch mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen (roter Pfeil). Aufgetragen wurden 23 µg DewA, 34 µg DewC, 21 µg DewD, 19 µg DewE und 26 µg HFBI. Als Kontrolle ist das ebenfalls heterolog produzierte Fusionsprotein H*B aufgetragen (20 µg). Die theoretische Masse der Proteine ist angegeben.

1.3 Beschichtung von harten Oberflächen

Die Beschichtung von harten Oberflächen fand angelehnt an Rieder *et al.* (2011) statt. Um die optimalen Bedingungen für gleichmäßige Hydrophobinbeschichtungen zu ermitteln, wurde lyophilisiertes DewA in unterschiedlichen Konzentrationen in Beschichtungspuffer gelöst und auf gereinigte Objektträger gegeben. Diese wurden in einer Feuchtekammer für zwei Stunden bei 60 °C gebacken, mit Wasser gewaschen und trocken gelassen. Mit primären Antikörpern gegen den 6-fachen His-tag und Cy3-gekoppelten sekundären

Antikörpern wurden die Hydrophobine im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Eine gleichmäßige Beschichtung konnte bei einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml nachgewiesen werden. Niedrigere (50 µg/ml) oder sehr viel höhere Konzentrationen (500 µg/ml) führten zu unvollständigen Beschichtungen oder Protein-Akkumulationen auf der Oberfläche (Abb. 17). Ausgehend von diesem Ergebnis wurden Objektträger auch mit den anderen Hydrophobinen mit einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml beschichtet und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Mit DewC, DewD und HFBI konnten vergleichbare Beschichtungen erreicht werden. DewE allerdings zeigte eine ungleichmäßige, körnige Verteilung der Hydrophobine auf der Oberfläche (Abb. 18). Diese konnte auch nicht durch geringere oder höhere Mengen an DewE im Beschichtungspuffer vermieden werden (Abb. 19).

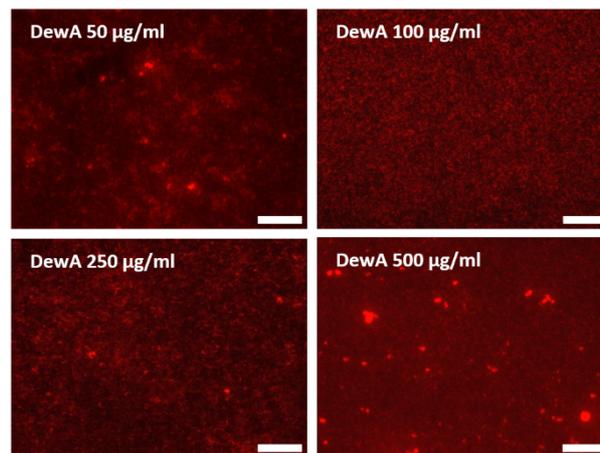


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Beschichtung von Objektträgern mit unterschiedlichen Konzentrationen DewA

Gläserne Objektträger wurden für zwei Stunden bei 60°C mit unterschiedlichen DewA-Konzentrationen beschichtet. Nach mehreren Waschschrinen wurden die Hydrophobine mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Eine gleichmäßige Beschichtung konnte mit 100 µg/ml erreicht werden. Bei geringeren oder viel höheren Konzentrationen kam es zu unvollständigen Beschichtungen (50 µg/ml) oder zu Protein-Aggregaten auf der Oberfläche. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm (Winandy *et al.*, 2018).

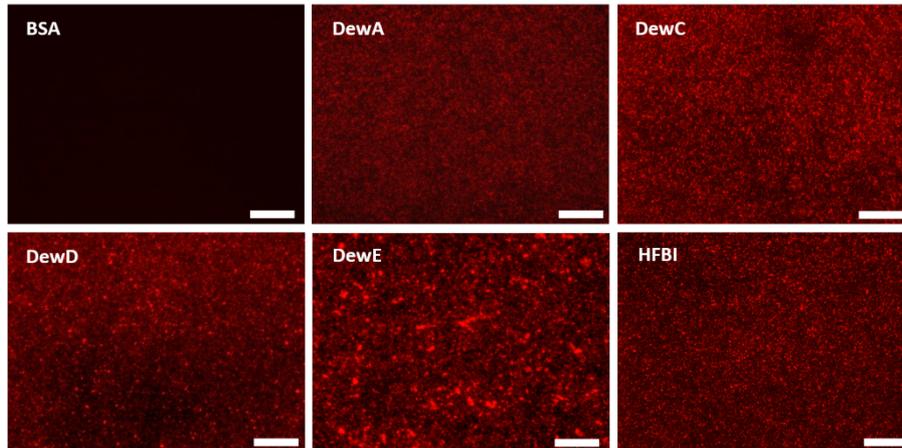


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Beschichtung von Objektträgern mit den Hydrophobinen DewA, DewC, DewD, DewE und HFBI

Gläserne Objektträger wurden für zwei Stunden bei 60°C mit den Hydrophobinen DewA, DewC, DewD, DewE und HFBI mit einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml beschichtet. Als Negativkontrolle diente BSA. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Hydrophobine mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Eine erfolgreiche Oberflächenbeschichtung war mit allen Hydrophobinen möglich. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm (Winandy *et al.*, 2018).

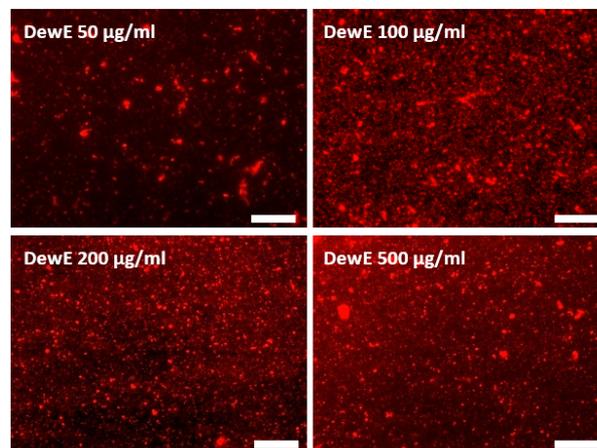


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Beschichtung von Objektträgern mit unterschiedlichen Konzentrationen DewE.

Gläserne Objektträger wurden für zwei Stunden bei 60°C mit unterschiedlichen DewE-Konzentrationen beschichtet. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Hydrophobine mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bei allen getesteten Konzentrationen ist eine ungleichmäßige, körnige Verteilung der Proteine auf der Oberfläche sichtbar. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm (Winandy *et al.*, 2018).

1.4 Rasterkraftmikroskopie

Um die von den Hydrophobinen gebildeten Beschichtungen genauer zu untersuchen wurden sie am Rasterkraftmikroskop untersucht. Dazu wurden beschichtete Objektträger an der Luft von einem *Cantilever* mit einer Resonanzfrequenz von 65 kHz bis 75 kHz im Nicht-Kontakt-Modus „abgetastet“. Zunächst wurden Scans mit einer Seitenlänge von 20 μm angefertigt (Abb. 20A). Auf den Amplitudenbildern ist eine feinkörnige Oberfläche zu erkennen, welche sich deutlich von der reinen Glasoberfläche unterscheidet. Die abgebildeten feinen Strukturen glichen denen auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Eine detailreichere Abbildung der Oberflächenstruktur konnte durch Scans mit einer Seitenlänge von 1 μm und einer leicht höheren Resonanzfrequenz erreicht werden. Sichtbar wurde eine Schicht kleiner, kugeligter Strukturen von 10 nm - 20 nm Durchmesser, die teilweise von größeren Strukturen überdeckt wurden (Abb. 20B). Bei unbehandeltem Glas fehlten diese globulären Strukturen komplett. *Rodlet*-ähnliche Strukturen, wie sie auf der Oberfläche von Sporen vorzufinden sind, konnten weder für DewA noch für die vier anderen getesteten Hydrophobine nachgewiesen werden. Neben den Amplitudenbildern wurden auch Höhenbilder angefertigt. Diese ergaben für DewA ein Höhenprofil von -4 nm – 4 nm und demnach eine maximale Aggregat-Höhe von 8 nm (Abb. 21). Dies war vergleichbar mit den Ergebnissen für DewC (max. 6 nm), DewD (max. 8 nm) und HFBI (max. 6 nm). Bei den Beschichtungen mit DewE konnten Auslenkungen bis zu 20 nm im Höhenprofil gemessen werden. Diese größeren Aggregate waren auch deutlich auf dem Höhenbild als große, weiße Flächen erkennbar.

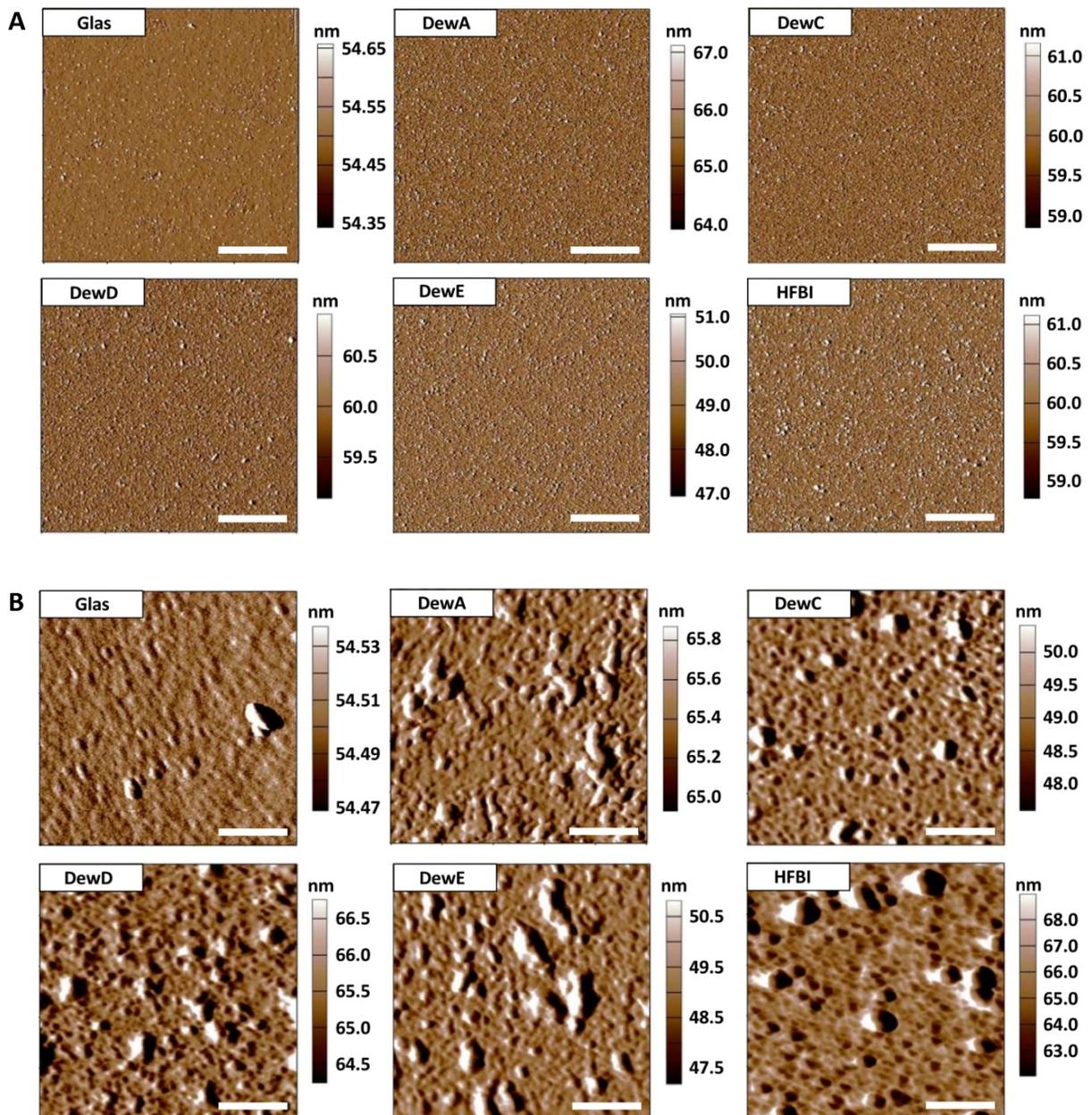


Abbildung 20: Rasterkraftmikroskopische Amplituden-Aufnahmen von unbehandeltem und mit Hydrophobinen beschichtetem Glas

Die Oberflächen wurden mit einem Silizium *Cantilever* bei einer Resonanzfrequenz von 65 kHz bis 75 kHz im Nicht-Kontakt-Modus gescannt. **A)** Scans mit einer Seitenlänge von 20 µm. Eine feinkörnige Oberflächenstruktur der Hydrophobinbeschichtung ist zu erkennen, die sich deutlich von der von unbehandeltem Glas unterscheidet. **B)** Scans mit einer Seitenlänge von 1 µm. Sichtbar sind kleine kugelige Strukturen, die teilweise von größeren überdeckt sind. Diese Strukturen fehlen komplett bei reinem Glas. Der Maßstabsbalken beträgt 5 µm für **(A)** und 200 nm für **(B)** (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).

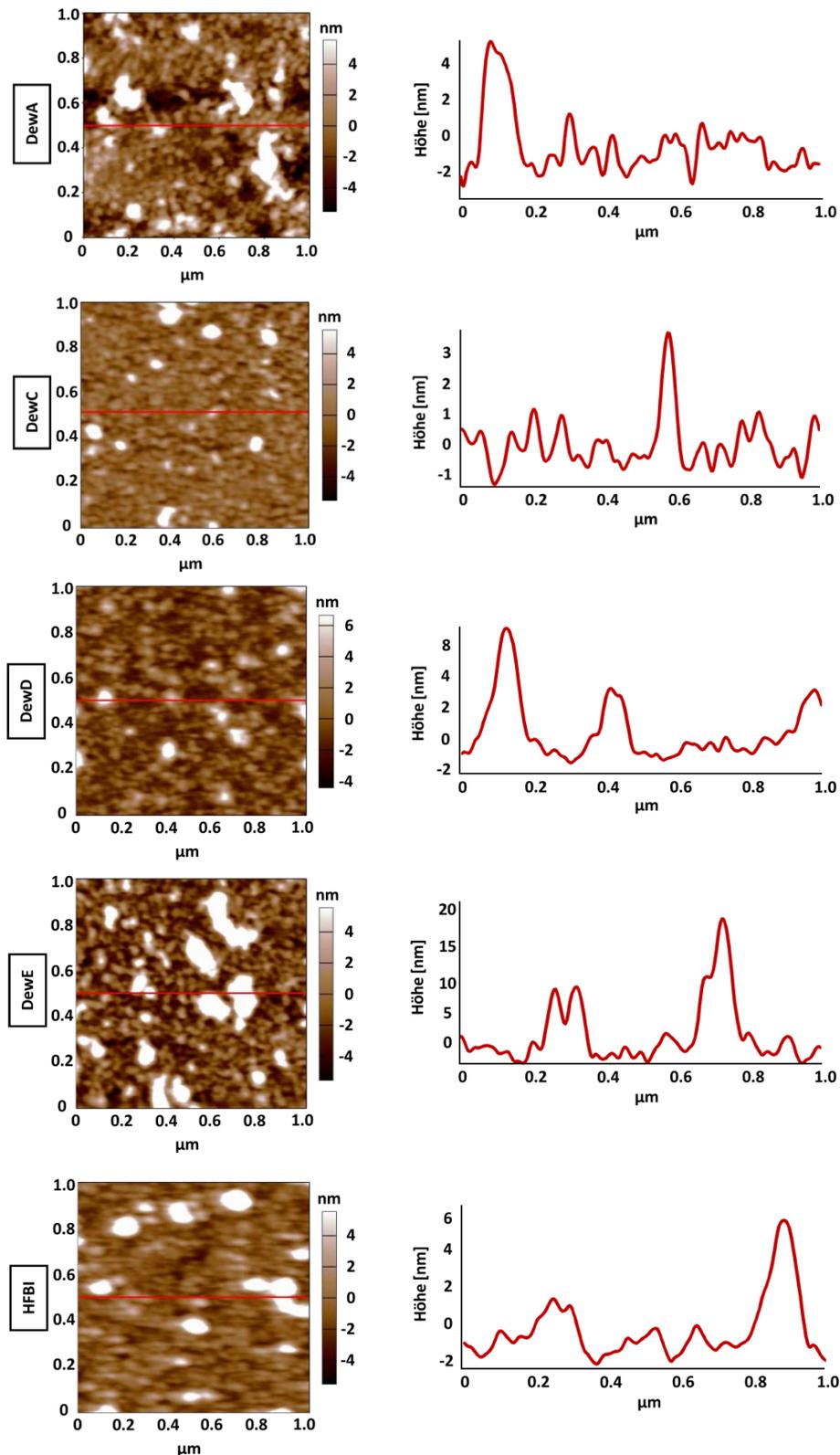


Abbildung 21: Rasterkraftmikroskopische Höhen-Aufnahmen der Hydrophobinbeschichtungen auf Glas und die dazugehörigen Höhenprofile

Die Oberflächen wurden mit einem Silizium *Cantilever* bei einer Resonanzfrequenz von 65 kHz bis 75 kHz im Nicht-Kontakt-Modus gescannt. Die Höhenprofile wurden entlang der in Rot gekennzeichneten Linie im Höhenbild generiert. DewA, DewC, DewD und HFBI zeigen vergleichbare Profile mit maximalen Aggregatdicken von 6 nm bis 8 nm. DewE hingegen bilden Aggregate mit bis zu 20 nm Dicke. Diese Proteinakkumulationen sind auch deutlich auf dem Höhenbild als große, weiße Flächen zu erkennen (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).

Zusätzlich wurde die Adhäsionskraft der ausgebildeten Hydrophobinbeschichtungen auf Glas untersucht (Abb. 22). Dazu wurde die Oberfläche nicht wie vorher beschrieben im Nicht-Kontakt-Modus „abgetastet“, sondern der *Cantilever* wurde gezielt an einer Stelle auf die Oberfläche gedrückt und wieder abgezogen. Die Auslenkung des *Cantilevers* wurde dabei dokumentiert und in einem *force plot* dargestellt. In Rot ist die Konvergenz, die Auslenkung den *Cantilevers* in Richtung Oberfläche, dargestellt, und in Blau die Divergenz, die Auslenkung des *Cantilevers* auf dem Rückweg. Durch diese Methode kann man zwischen harten, weichen und klebrigen Oberflächen unterscheiden. Bei allen fünf untersuchten Hydrophobinen sind die jeweilige Konvergenz und Divergenz fast deckgleich und deuten auf eine harte, nicht klebrige Oberfläche hin.

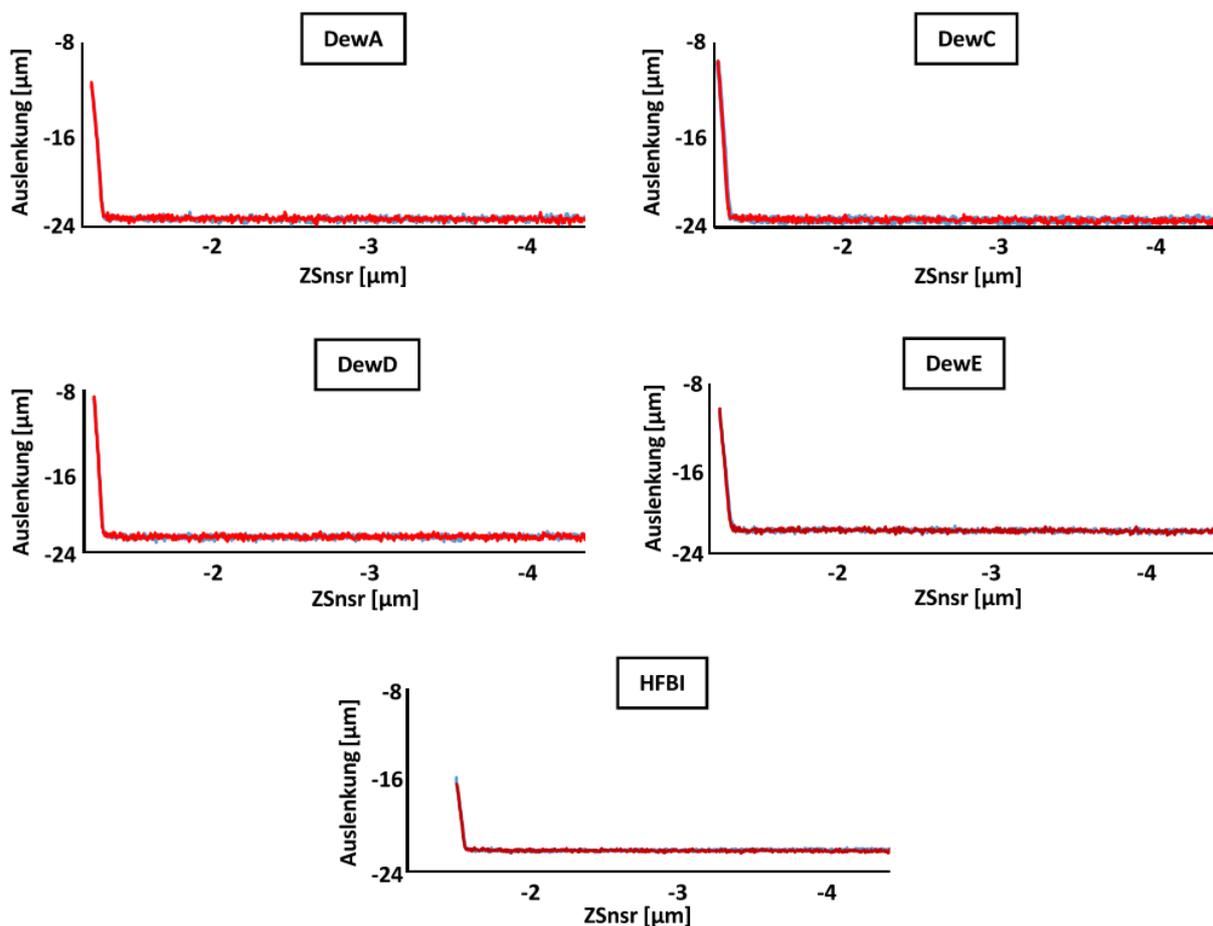


Abbildung 22: Adhäsionskraft-Messungen von Hydrophobin beschichtetem Glas

Für die Messung der Adhäsionskräfte der Hydrophobin-beschichteten Glasoberflächen wurde der *Cantilever* des Rasterkraftmikroskops gezielt auf die Oberfläche gedrückt, wieder abgezogen und seine Auslenkung während des Prozesses dokumentiert. In den *Force-Plots* ist auf der X-Achse die relative Distanz des *Cantilevers* zur Oberfläche und auf der Y-Achse die Auslenkung des *Cantilevers* relativ zur aufgebrauchten Kraft aufgetragen. In Rot ist die Konvergenz des *Cantilevers* zur Oberfläche hin und in Blau die Divergenz von der Oberfläche weg dargestellt. Bei allen fünf Hydrophobinen sind Konvergenz und Divergenz fast deckgleich und deuten auf eine harte, nicht klebrige Oberfläche hin (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).

1.5 Effekt der Hydrophobinbeschichtung

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen Hydrophobinbeschichtungen auf die Benetzbarkeit der behandelten Oberflächen zu testen, wurden die Wasserkontaktwinkel bestimmt. Hierzu wurde ein Tropfen Wasser auf die Oberfläche gegeben und die Winkel, die der Tropfen mit der Oberfläche bildet, gemessen (Abb. 23A). Unbeschichtetes Glas wies Kontaktwinkel von $29,6 \pm 2,4^\circ$ auf. Die Beschichtungen mit DewA und DewE bildeten die wasserabweisendsten Oberflächen mit Kontaktwinkeln von $76,3 \pm 0,6^\circ$ und $76,8 \pm 1,2^\circ$. Mit DewC und DewD beschichtetes Glas war weniger hydrophob mit Kontaktwinkeln von $66,0 \pm 1,2^\circ$ und $62,2 \pm 1,9^\circ$. Der hydrophobe Effekt des Klasse II Hydrophobins HFBI lag mit $71,8 \pm 1,4^\circ$ in der Mitte der getesteten Beschichtungen (Abb. 23B). Insgesamt konnten alle Hydrophobine dem Glas einen wasserabweisenden Charakter verleihen.

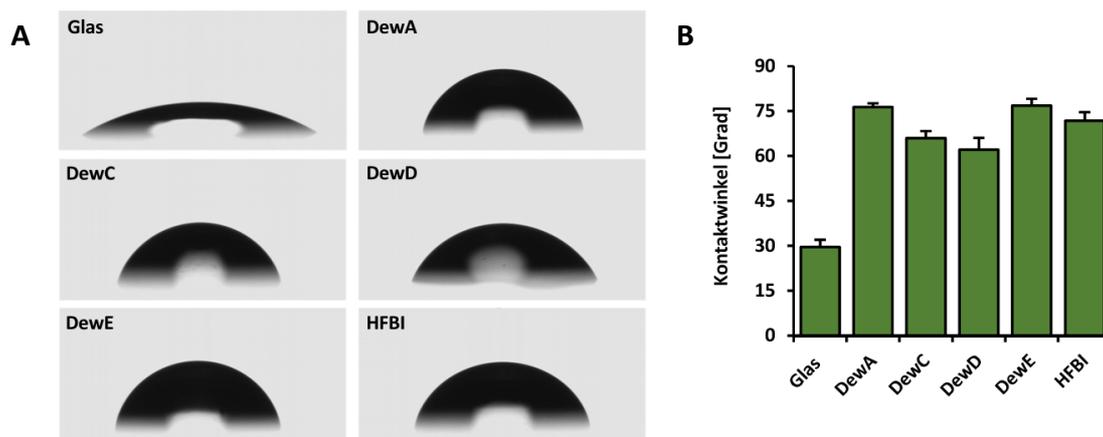


Abbildung 23: Effekt der Hydrophobinbeschichtung auf Glas

A) Aufnahmen von Wassertropfen auf unbeschichtetem und mit Hydrophobinen beschichtetem Glas. B) Messungen der Kontaktwinkel, die sich zwischen der Außenseite des Tropfens und der Oberfläche bilden. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 20$ (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).

1.6 Stabilität der Hydrophobinbeschichtung

Neben der Fähigkeit, gleichmäßige Beschichtungen auszubilden und die Charakteristika von Oberflächen zu verändern, spielt bei etwaigen technischen Anwendungen auch die Stabilität der Hydrophobine auf behandelten Flächen eine entscheidende Rolle. Um diese zu testen, wurden beschichtete Glasoberflächen mit Wasser, Ethanol, SDS, UV-Licht und Hitze

behandelt und die verbliebene Hydrophobinbeschichtung analysiert. Dazu wurden die freien Fenster von gläsernen *8-well* Objektträgern mit den unterschiedlichen Hydrophobinen beschichtet und die Objektträger zur Hälfte in die zu testende Lösung (ddH₂O, 70% EtOH und 1% SDS) gestellt (Abb. 24A). Darin wurden die Proben bis zu sieben Tage stehend inkubiert. Die Stabilität gegenüber UV-Licht wurde in einem DNA-Crosslinker, die Stabilität gegenüber Hitze in einem Hybridisierungssofen bei 80 °C getestet.

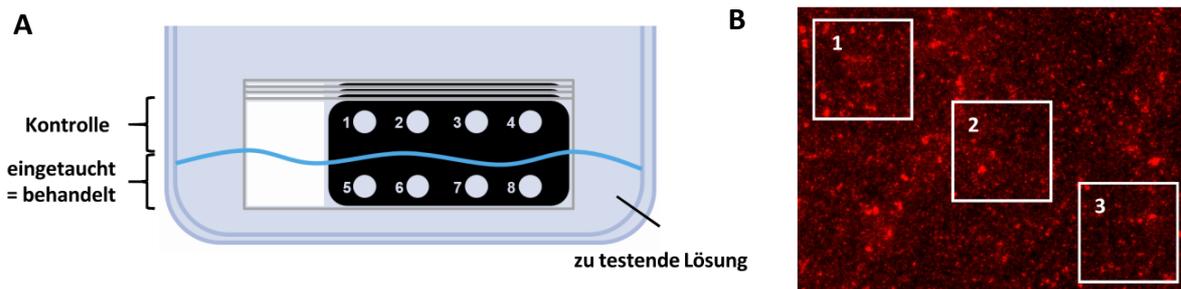


Abbildung 24: Schematischer Aufbau des Stabilitäts-Assay

A) Mit Hydrophobin beschichtete *8-well* Objektträger wurden zur Hälfte in die zu testende Lösung gestellt, fixiert und darin bis zu 7 Tage stehend inkubiert. **B)** Das Schema stellt die drei Regionen dar, von denen die Fluoreszenzintensität jeder mikroskopischen Aufnahme ausgewertet wurde.

Nach einem, drei oder sieben Tagen wurden die entsprechenden Objektträger aus den Lösungen entfernt, mit ddH₂O gespült und die Hydrophobine, mit Antikörpern nachgewiesen, am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Fluoreszenzintensität der eingetauchten Beschichtungen wurde mit der Intensität der nicht eingetauchten Beschichtungen verglichen, welche als 100% festgelegt wurden. Insgesamt wurden für jeden Zeitpunkt und jede Kondition drei Regionen von sechs Aufnahmen ausgewertet (Abb. 24B). Die Beschichtungen mit DewA stellten sich dabei als die stabilsten gegenüber Wasser, Ethanol und SDS heraus. Nach sieben Tagen in ddH₂O waren noch $97,6 \pm 4,2\%$ der Beschichtung vorhanden. 70% EtOH reduzierte die Beschichtung auf $92,3 \pm 5,2\%$ und 1% SDS auf $66,2 \pm 2,4\%$ (Abb. 25A). Die Behandlung mit ddH₂O führte nach einer Woche bei DewC zu einem Verlust von $2,9 \pm 1,8\%$ der Beschichtung. In 70% EtOH und 1% SDS inkubierte Beschichtungen mit DewC wiesen nach sieben Tagen noch eine Fluoreszenzintensität von $59,9 \pm 3,6\%$ bzw. $38,6 \pm 1,7\%$ auf (Abb. 25B). DewD und DewE formten die am wenigsten stabilen Beschichtungen. Nach einer Woche in Wasser waren noch $73,6 \pm 2,9\%$ bzw. $73,3 \pm 6,4\%$ der ursprünglichen Beschichtung vorhanden.

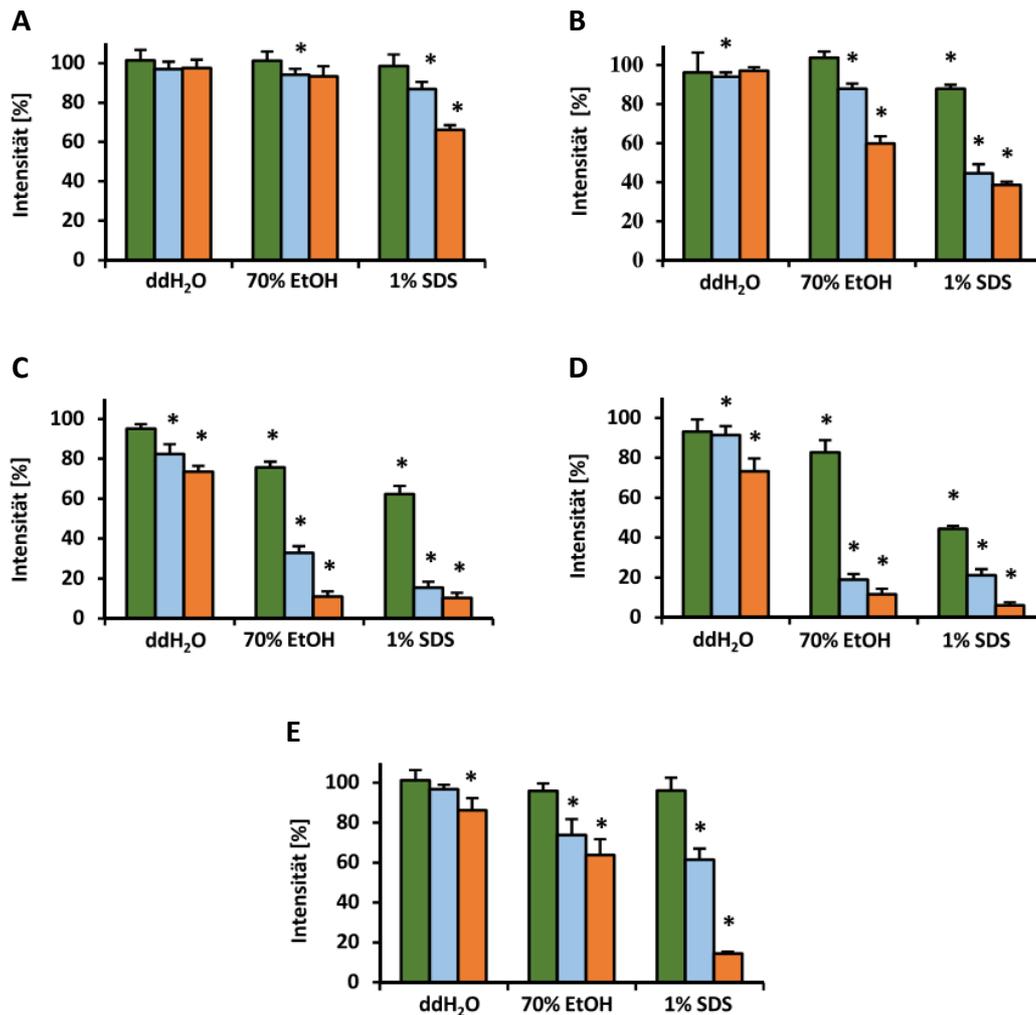


Abbildung 25: Ergebnisse des Stabilitäts-Assay

Nach der Inkubation der Hydrophobin-beschichteten *8-well* Objektträger in ddH₂O, 70% EtOH und 1% SDS wurden die Hydrophobine mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Diagramme zeigen die verbleibende Fluoreszenzintensität der Beschichtungen mit den Klasse I Hydrophobinen DewA (A), DewC (B), DewD (C), DewE (D) und dem Klasse II Hydrophobin HFBI (E) nach den Behandlungen mit den entsprechenden Lösungen. Angegeben sind die Fluoreszenzintensitäten nach einem Tag (Grün), drei Tagen (Blau) und sieben Tagen (Orange). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 18$ (* $p < 0,01$) (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).

Die Behandlungen mit EtOH und SDS entfernten die Hydrophobine DewC und DewD fast komplett von den Glasoberflächen (Abb. 25C und 25D). Die Beschichtungen mit dem Klasse II Hydrophobin HFBI waren relativ stabil gegenüber Wasser und EtOH und die Resultate vergleichbar mit denen von DewC. 1% SDS konnte allerdings $85,5 \pm 0,9\%$ der Beschichtung mit HFBI entfernen (Abb. 25E). Die Bestrahlung mit UV-Licht reduzierte die Beschichtungen mit DewA um $16,4 \pm 5,4\%$ und mit DewC um $10,7 \pm 1,7\%$ (Abb. 26). DewD, DewE und HFBI waren unstabiler gegenüber UV-C und wurden um $36,9 \pm 2,4\%$ bzw. um $35,8 \pm 7,7\%$ und um $30,5 \pm 7,6\%$ vermindert. Nach der Behandlung für zwei Stunden bei 80 °C im

Hybridisierungssofen zeigte die Beschichtung mit DewA eine verbleibende Fluoreszenzintensität von $65,0 \pm 3,9\%$ verglichen mit den nicht gebackenen Proben. DewD war am instabilsten mit nur noch $45,0 \pm 3,2\%$ vorhandener Beschichtung nach dem Backen. DewC, DewE und HFBI waren vergleichbar resistent gegenüber trockener Hitze mit verbleibenden Beschichtungen von $51,4 \pm 1,1\%$, $53,6 \pm 2,5\%$ und $52,1 \pm 4,0\%$.

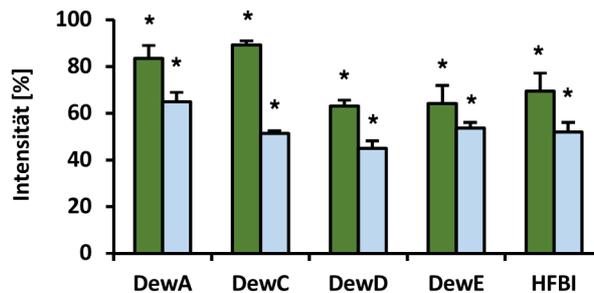


Abbildung 26: Stabilität der Hydrophobinbeschichtungen gegen UV-C und Hitze

Hydrophobin-beschichtete Objektträger wurden für 20 Minuten mit UV-C (254 nm Wellenlänge) bestrahlt oder für zwei Stunden bei 80°C gebacken. Anschließend erfolgte der Nachweis der Hydrophobine mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper sowie die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop. Das Diagramm zeigt die verbleibende Fluoreszenzintensität der Beschichtungen mit den unterschiedlichen Hydrophobinen nach der Belichtung mit UV-C (Grün) und dem Backen bei 80 °C (Blau). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 18$ (* $p < 0,01$) (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).

1.7 Hydrophobine als Emulgator

Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften und der pilzlichen Herkunft bieten sich Hydrophobine als natürliche Emulgatoren an. Die Fähigkeit stabile Emulsionen aus wasserlöslichen und -unlöslichen Flüssigkeiten zu bilden wurde mit einem einfachen Test analysiert. Hierzu wurden 2 ml Öl mit 2 ml hydrophobinhaltigem Wasser gut gemischt und die anschließende Phasentrennung per Videokamera dokumentiert. Als Kontrolle diente Wasser ohne Hydrophobinzusatz. Bei einer Hydrophobinkonzentration von 100 µg/ml stellte sich heraus, dass DewD die Phasentrennung am stärksten verlangsamt (Abb. 27). DewC und HFBI zeigten die schwächste Fähigkeit, als Emulgator zu dienen. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration auf 500 µg/ml verlangsamte sichtbar die Phasentrennung bei allen Hydrophobinen im Vergleich zu den 100 µg/ml (Abb. 28). DewD zeigte auch bei der höheren Konzentration die besten emulgatorischen Fähigkeiten.

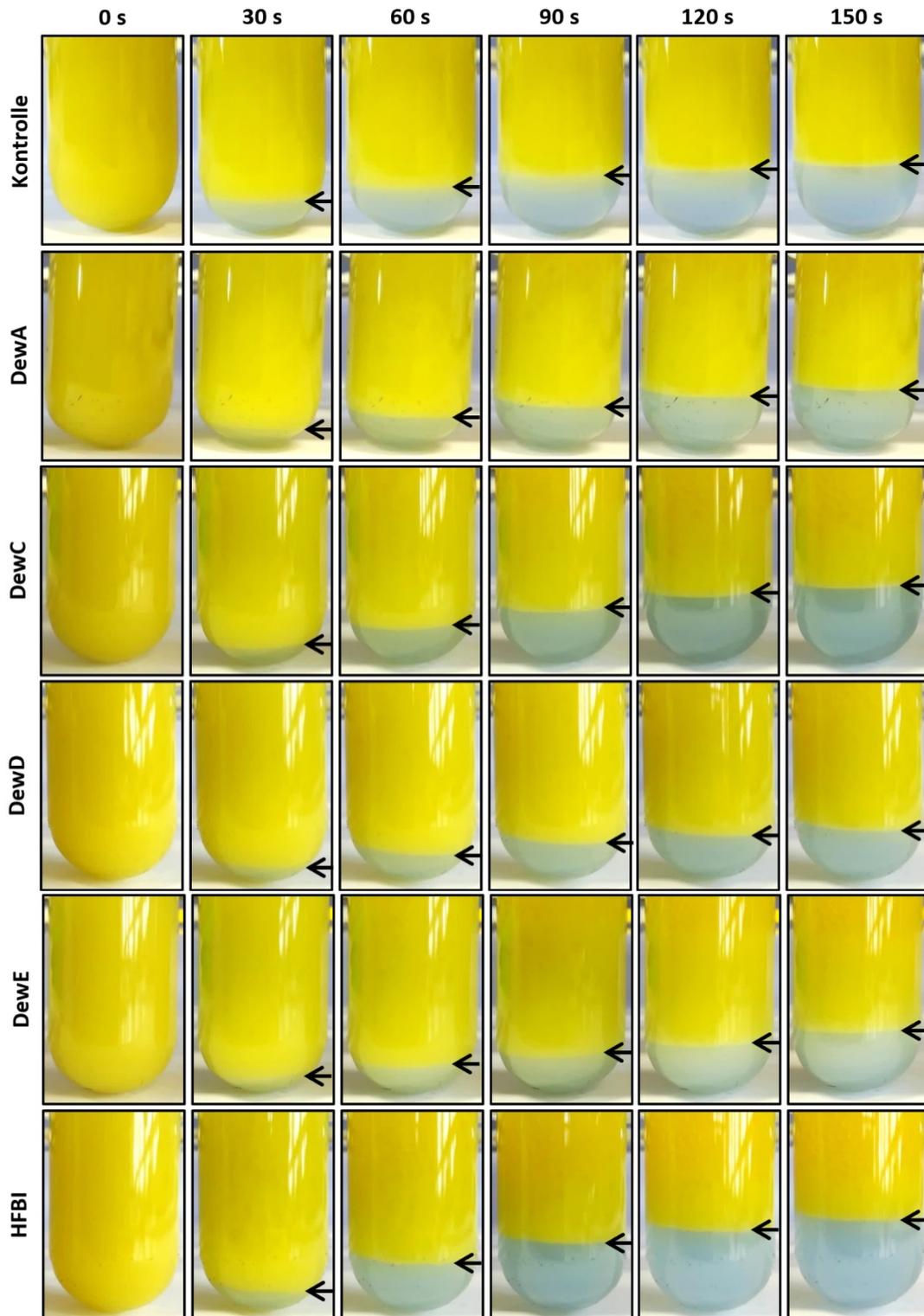


Abbildung 27: Emulsions-Assay mit 100 µg/ml Hydrophobin

2 ml Öl wurden mit 2 ml hydrophobinhaltigem Wasser gemischt und die Phasentrennung wurde über einen Zeitraum von 150 s dokumentiert. Die Endkonzentration Hydrophobin im Gesamtvolumen betrug 100 µg/ml. Der Pfeil markiert die Grenzphase zwischen Öl- und Wasserphase. DewD konnte die Auftrennung in wässrige und ölige Phase am stärksten verlangsamen (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).



Abbildung 28: Emulsions-Assay mit 500 µg/ml Hydrophobin

2 ml Öl wurden mit 2 ml hydrophobinhaltigem Wasser gemischt und die Phasentrennung wurde über einen Zeitraum von 150 s dokumentiert. Die Endkonzentration Hydrophobin im Gesamtvolumen betrug 500 µg/ml. Der Pfeil markiert die Grenzphase zwischen Öl- und Wasserphase. Im Vergleich zu einer Hydrophobinkonzentration von 100 µg/ml ist die Phasentrennung deutlich verlangsamt. DewD konnte die Auftrennung in wässrige und ölige Phase auch bei einer Proteinkonzentration von 500 µg/ml am stärksten verlangsamen (verändert nach Winandy *et al.*, 2018).

Für einen Langzeitversuch wurden 3 ml Öl mit 1 ml hydrophobinhaltigem Wasser (500 µg/ml als Endkonzentration) gemischt und für eine Woche unberührt stehen gelassen. Der höhere Prozentsatz Öl vereinfacht das Bilden einer stabilen Emulsion gegenüber der 1:1 Mischung der vorherigen Tests. Getestet wurde das Fusionsprotein aus YaaD und DewA der BASF SE, H*B, sowie die Hydrophobine DewA und DewD (Abb. 29). Nach sieben Tagen war die Phasentrennung bei der Probe mit dem H*B Protein vergleichbar mit der Wasserkontrolle. Verglichen mit dem H*B zeigte das DewA ohne das Peptid YaaD bessere emulgatorische Fähigkeiten. Die Phasentrennung bei DewD war am wenigsten weit vorangeschritten. Dieses Hydrophobin eignet sich demnach am besten als Emulgator in Wasser-Öl Mischungen.

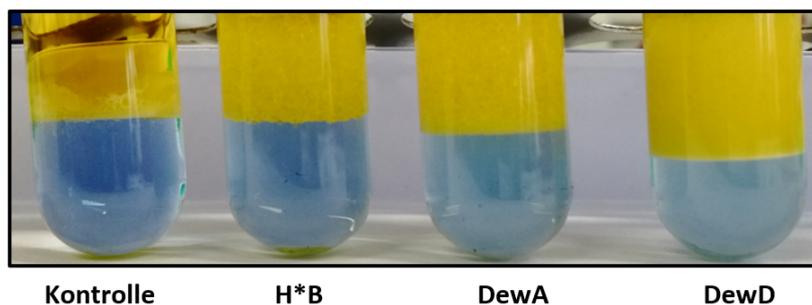


Abbildung 29: Emulsions-Assay über sieben Tage

3 ml Öl wurden mit 1 ml hydrophobinhaltigem Wasser gemischt und die Phasentrennung wurde nach sieben Tagen dokumentiert. Die Endkonzentration Hydrophobin im Gesamtvolumen betrug 500 µg/ml. DewA zeigt ohne das N-terminale Peptid YaaD bessere emulgatorische Fähigkeiten als mit dem Peptid (H*B). Bei DewD war die Phasentrennung am wenigsten vorangeschritten.

Kapitel 2: Hydrophobine als wasserabweisende Beschichtung zum Schutz steinerer Monumente

2.1 Beschichtung unterschiedlicher Lithotypen

Der Schutz steinerer Bauwerke vor Wasser ist eine der größten Herausforderungen der Restoration und Instandhaltung architektonischer Monumente. Durch das Eindringen von Wasser in den Stein und zigfache Gefrier- und Auftau-Zyklen entstehen Risse in der Struktur und die Steine werden brüchig. Die Fähigkeit der Hydrophobine, hydrophile Oberflächen in wasserabweisende zu verwandeln, macht sie zu interessanten Kandidaten, um die wasserinduzierte Degradierung steinerer Gebilde zu bekämpfen.

A



B



C



Abbildung 30: Herkunft der verwendeten Lithotypen

A) Der Obernkirchen Sandstein wurde im Kölner Dom (*Hohe Domkirche Sankt Petrus*) verbaut (www.dbu.de).
B) Der Balegem Kalkstein wurde beim Bau der Sint-Baafs Kathedrale in Gent verwendet (www.sintbaafskathedraal.be). **C)** Der Dom in Pisa (Dom Santa Maria Assunta) besteht hauptsächlich aus Carrara Marmor (eigene Aufnahme).

Zuerst wurde untersucht, ob die Hydrophobine in der Lage sind, an unterschiedliche Lithotypen zu binden und so deren Oberflächencharakteristika zu verändern. Dazu wurden Steinproben von Obernkirchen Sandstein, Balegem Kalkstein und Carrara Marmor mit dem Klasse I Hydrophobin DewA und dem Klasse II Hydrophobin HFBI beschichtet. Die entsalzten und getrockneten Steine wurde 5 mm tief in Hydrophobin enthaltenden Beschichtungspuffer (100 µg/ml DewA oder HFBI) gelegt und zwei Stunden lang bei 60 °C gebacken. Der Nachweis der Hydrophobine auf der Steinoberfläche im Fluoreszenzmikroskop war aufgrund der starken Autofluoreszenz der im Stein eingeschlossenen Mineralien nicht möglich (Abb. 31). Aus diesem Grund wurden die Hydrophobine auf der Oberfläche der Steine mit einem primären α -His Antikörper und einem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper nachgewiesen, wie sie im Western Blot Anwendung finden. Sowohl DewA als auch HFBI konnten an die drei unterschiedlichen Lithotypen binden (Abb. 32).

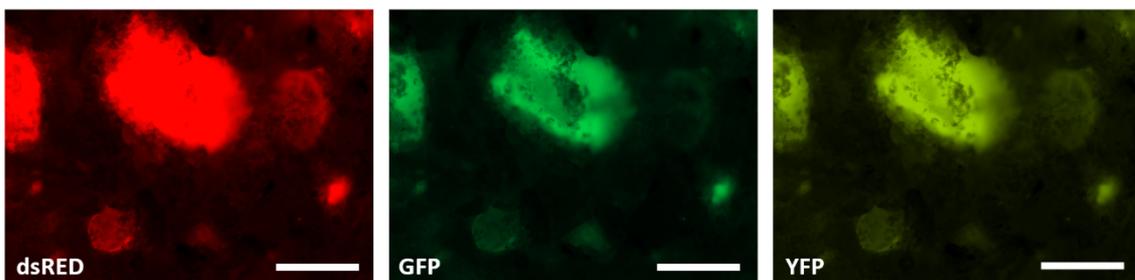


Abbildung 31: Autofluoreszenz vom Balegem Kalkstein

Der Kalkstein wurde am Fluoreszenzmikroskop mit den unterschiedlichen Anregungswellenlängen für die Fluorophore dsRED, GFP und YFP belichtet. Die starke Autofluoreszenz der Mineralien macht einen Nachweis der Hydrophobine auf der Steinoberfläche mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper unmöglich. Der Maßstabsbalken beträgt 200 µm.

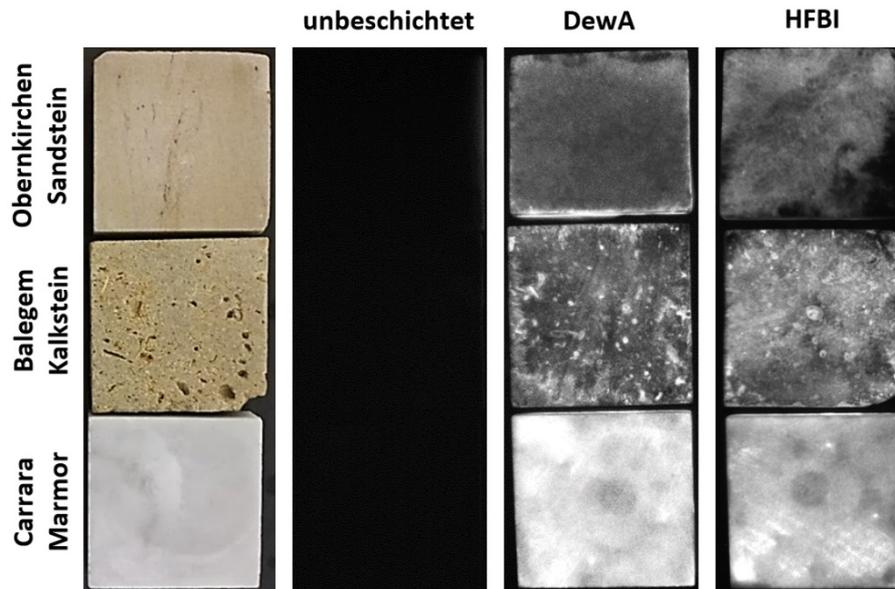


Abbildung 32: Nachweis der Hydrophobinbeschichtung von Obernkirchen Sandstein, Balegem Kalkstein und Carrara Marmor

Die drei Lithotypen wurden für zwei Stunden bei 60 °C mit DewA und HFBI beschichtet. Der Nachweis der Hydrophobine auf der Steinoberfläche erfolgte wie beim Western Blot mit einem primären α -His Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Als Negativkontrolle dienten unbeschichtete Steinproben der drei Lithotypen.

2.2 Bestimmung der Eindringtiefe der Hydrophobine in den Stein

Ein interessanter Aspekt im Zusammenhang mit der Instandhaltung und dem Schutz von steinernen Monumenten ist die Penetrationstiefe der aufgetragenen Schutz- und Verfestigungsmittel. Um die Eindringtiefe der Klasse I und II Hydrophobine in die verschiedenen Lithotypen zu testen, wurden 5 cm x 5 cm x 1 cm große Steinplättchen hochkant 5 mm tief in Hydrophobinlösung (100 μ g/ml DewA oder HFBI) gestellt und für zwei Stunden bei 60 °C gebacken. Nach drei Waschschrritten mit ddH₂O wurden die Steinplättchen getrocknet und mit Meißel und Hammer mittig geteilt. Anschließend fand der Nachweis der Hydrophobine durch α -His und Peroxidase-gekoppelte Antikörper statt. Sowohl DewA als auch HFBI konnten bis zu 1,5 cm in den Obernkirchen Sandstein eindringen, beim Balegem Kalkstein waren es bis zu 2 cm. Beim Carrara Marmor konnte keine oder wenn nur eine sehr geringe Penetration der zwei Hydrophobine in den Stein nachgewiesen werden (Abb. 33).

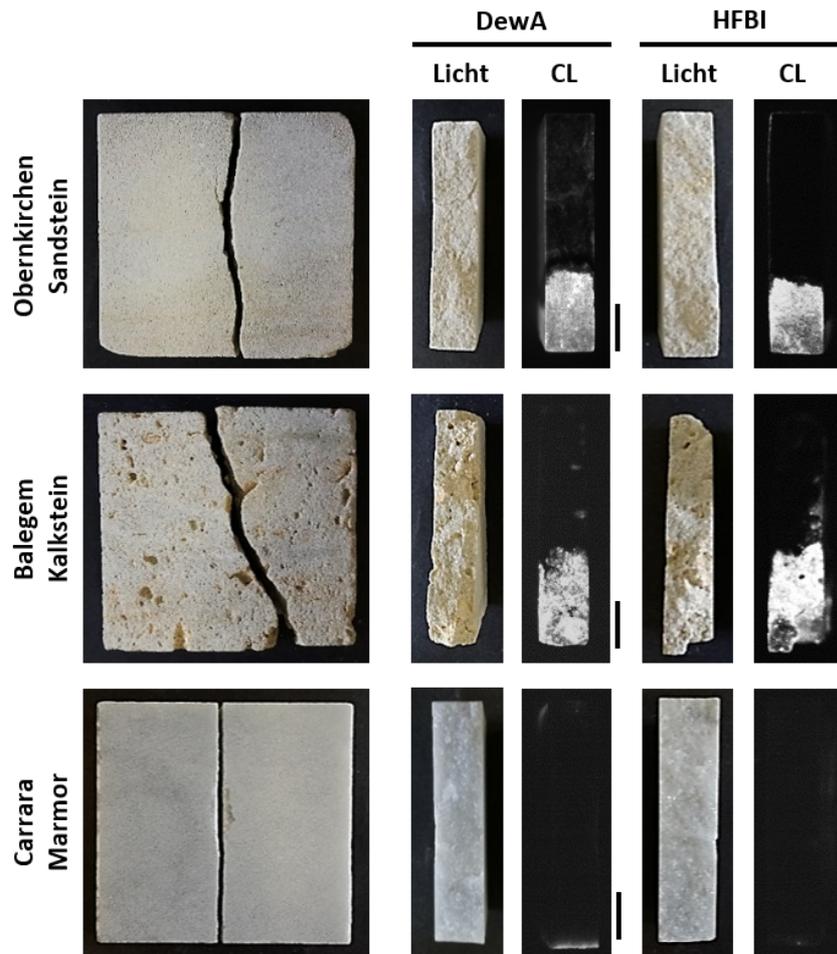


Abbildung 33: Eindringtiefe der Hydrophobine in den Stein

Steinplättchen der drei Lithotypen wurden hochkant 5 mm tief in Hydrophobinlösung gestellt, zwei Stunden bei 60 °C gebacken und trocknen gelassen. Anschließend wurden sie mittig gespalten und die Hydrophobine mit einem primären α -His Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Dargestellt sind Bilder der Steinbruchstücke bei Licht sowie die Chemilumineszenzaufnahmen (CL). Der Maßstabsbalken beträgt 1 cm.

2.3 Hydrophobierung der Lithotypen

Die wasserabweisende Wirkung der Beschichtung von Obernkirchen Sandstein, Balegem Kalkstein und Carrara Marmor mit den Hydrophobinen DewA und HFBI wurde mit der verlangsamten Absorption von Wassertropfen nachgewiesen. Dazu wurden auf unbeschichtete und mit Hydrophobin behandelte Steinproben Wassertropfen aufgetragen und die Absorptionsgeschwindigkeit des Tropfens mit einer Kamera dokumentiert.

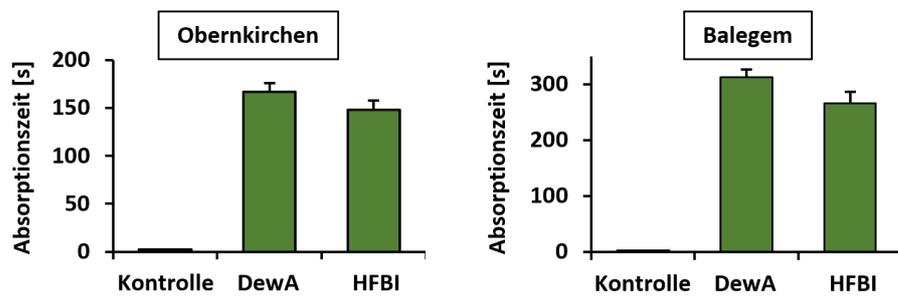
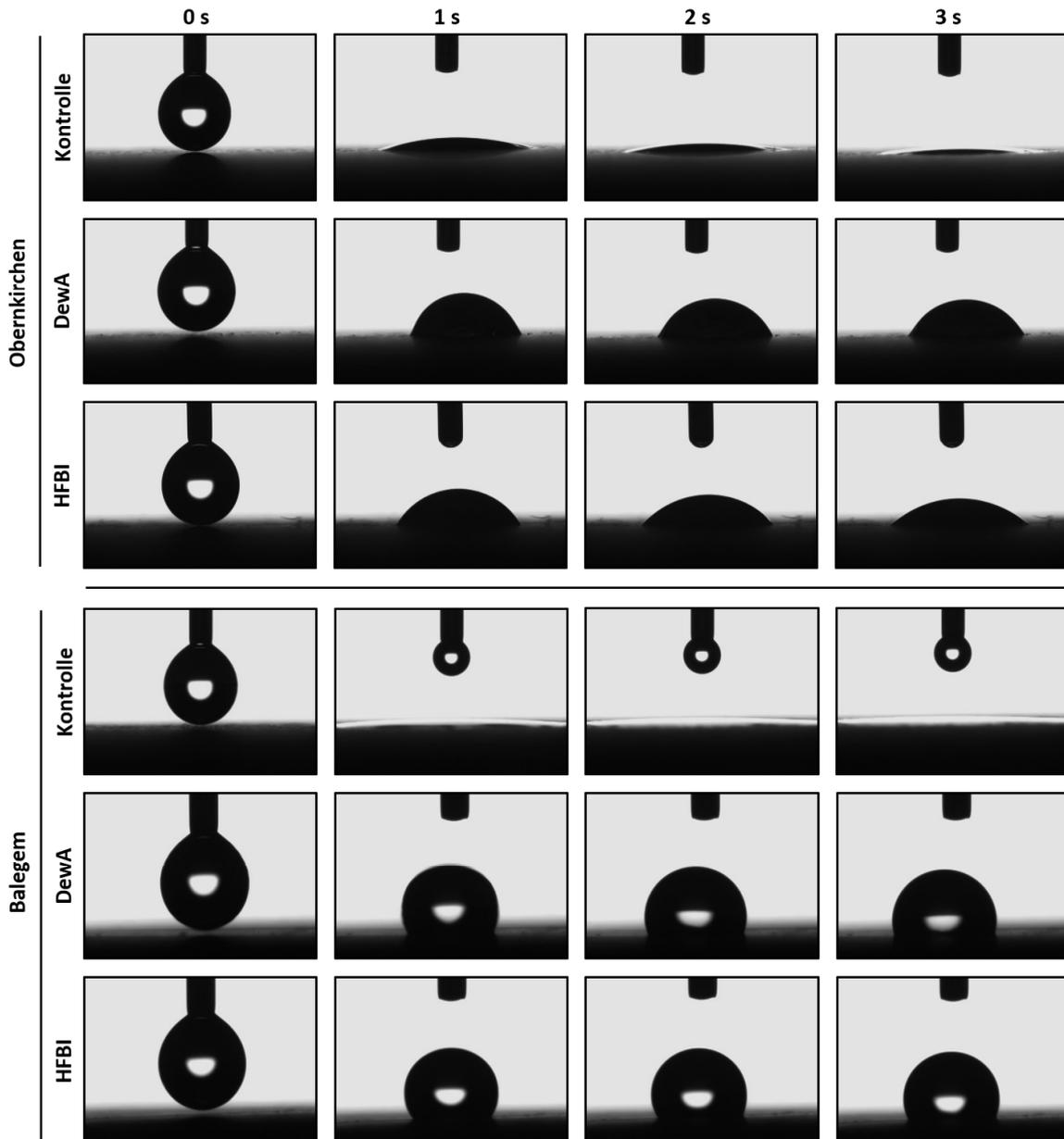


Abbildung 34: Hydrophobierung von Sand- und Kalkstein

Wassertropfen wurden auf unbehandelten und mit Hydrophobin DewA oder HFBI beschichteten Obernkirchen Sandstein und Balegem Kalkstein gegeben und das Einsinken des Tropfens mit einer Videokamera dokumentiert. Dargestellt sind Einzelbilder der Videoaufnahmen sowie die Absorptionszeiten der Wassertropfen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 3$.

Wassertropfen aufgetragen auf unbehandelten Obernkirchen Sandstein versanken innerhalb von $2,3 \pm 0,9$ s im Stein, wohingegen die Wassertropfen aufgetragen auf DewA beschichteten Sandstein im Durchschnitt $166,7 \pm 9,2$ s brauchten, um komplett im Stein zu versinken. Für HFBI behandelten Obernkirchen betrug die Absorptionszeit $148,3 \pm 10,6$ s. Ein ähnlicheres Bild ergab der Test bei dem Balegem Kalkstein, wo die Absorptionszeit auf unbeschichtetem Stein $1,7 \pm 0,3$ s betrug. Auf DewA behandeltem Kalkstein verweilte der Wassertropfen $312,3 \pm 14,3$ s auf der Oberfläche und bei HFBI $265,6 \pm 21,7$ s (Abb. 34). Um die Benetzbarkeit des Carrara Marmors zu bestimmen war eine andere Methode notwendig, da der Lithotyp Wasser nur in sehr geringen Mengen aufnimmt. Alternativ wurden die Kontaktwinkel der unbehandelten und beschichteten Marmoroberfläche bestimmt. Natürlicher Marmor zeigt Kontaktwinkel von $31,4 \pm 1,3$ ° auf. Dieser Wert konnte durch die Beschichtung mit DewA auf $78,8 \pm 1,4$ ° und mit HFBI auf $68,6 \pm 1,1$ ° gesteigert werden (Abb. 35).

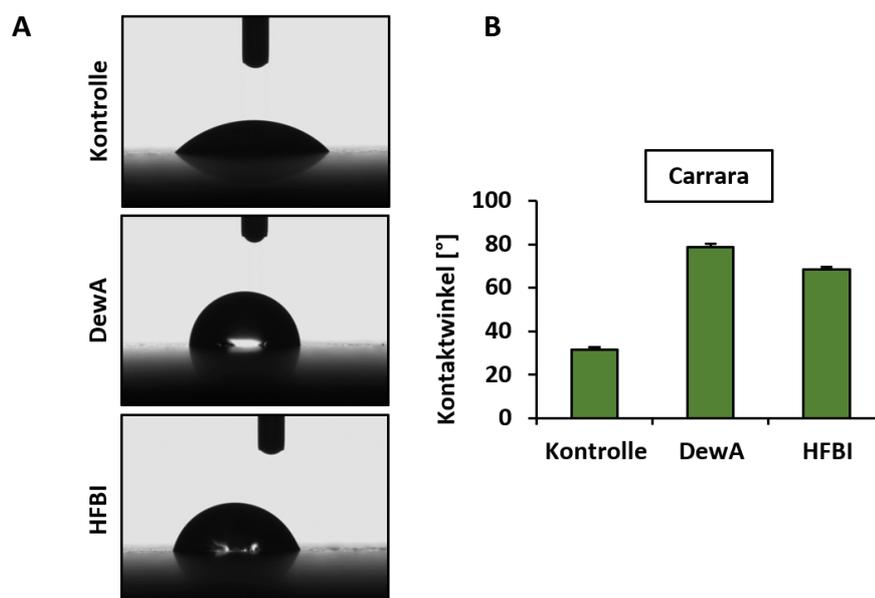


Abbildung 35: Hydrophobierung von Marmor

A) Aufnahmen von Wassertropfen auf unbehandeltem und mit den Hydrophobinen DewA und HFBI beschichtetem Marmor. **B)** Die Messungen der Kontaktwinkel der Marmoroberflächen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 10$.

2.4 Feuchtedurchgang

Die Fähigkeit zu „schwitzen“, also Feuchtigkeit durch den Stein nach Außen abzuleiten, wird als Feuchtedurchgang bezeichnet und wurde für die drei untersuchten Lithotypen analysiert. Dazu wurden unbeschichtete und beschichtete Steinproben auf einen wassergetränkten Schwamm gesetzt, der sich in einem Becher befand. Der Spalt zwischen Stein und Becher wurde mit Installationskitt verschlossen und die Gewichtsabnahme an der Feinwaage dokumentiert (Abb. 36). Diese ist gleichzustellen mit der Menge an Wasser, die durch den Stein nach Außen verdunstet. Nach 120 Stunden betrug der Wasserverlust von unbehandeltem Obernkirchen Sandstein $12,03 \pm 0,28 \text{ l/m}^2$. Durch die Steinproben, die mit DewA oder HFBI beschichtet waren, verdunsteten über den gleichen Zeitraum $12,15 \pm 0,16 \text{ l/m}^2$ beziehungsweise $12,78 \pm 0,36 \text{ l/m}^2$ (Abb. 37). Ein ähnliches Bild ergab sich bei dem Balegem Kalkstein. Der Wasserverlust betrug für unbehandelten Stein $11,9 \pm 0,11 \text{ l/m}^2$, für DewA beschichteten Stein $11,65 \pm 0,17 \text{ l/m}^2$ und für HFBI beschichteten Stein $11,14 \pm 0,21 \text{ l/m}^2$. Die Werte für den Feuchtedurchgang vom Carrara Marmor lagen deutlich unter denen des Sand- und Kalksteins mit Werten von $2,21 \pm 0,01 \text{ l/m}^2$ für unbeschichteten, $2,19 \pm 0,03 \text{ l/m}^2$ für DewA beschichteten und $2,11 \pm 0,03 \text{ l/m}^2$ für HFBI beschichteten Marmor. Signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der unbeschichteten und der beschichteten Steinproben waren keine festzustellen (zweiseitiger *Students T-Test* bei gleicher Varianz).



Abbildung 36: Aufbau Feuchtedurchgang

Die unbeschichteten und mit DewA oder HFBI beschichteten Steinplättchen wurden auf einen wassergetränkten Schwamm gesetzt, der sich in einem zur Hälfte mit Wasser gefüllten Becher befand. Der Spalt zwischen Becher und Stein wurde mit Installationskitt wasserdicht verschlossen. Die Gewichtsabnahme der Prüfkörper, gleichzustellen mit der Menge an Wasser, die durch den Stein nach Außen verdunstet, wurde über fünf Tage an der Feinwaage dokumentiert.

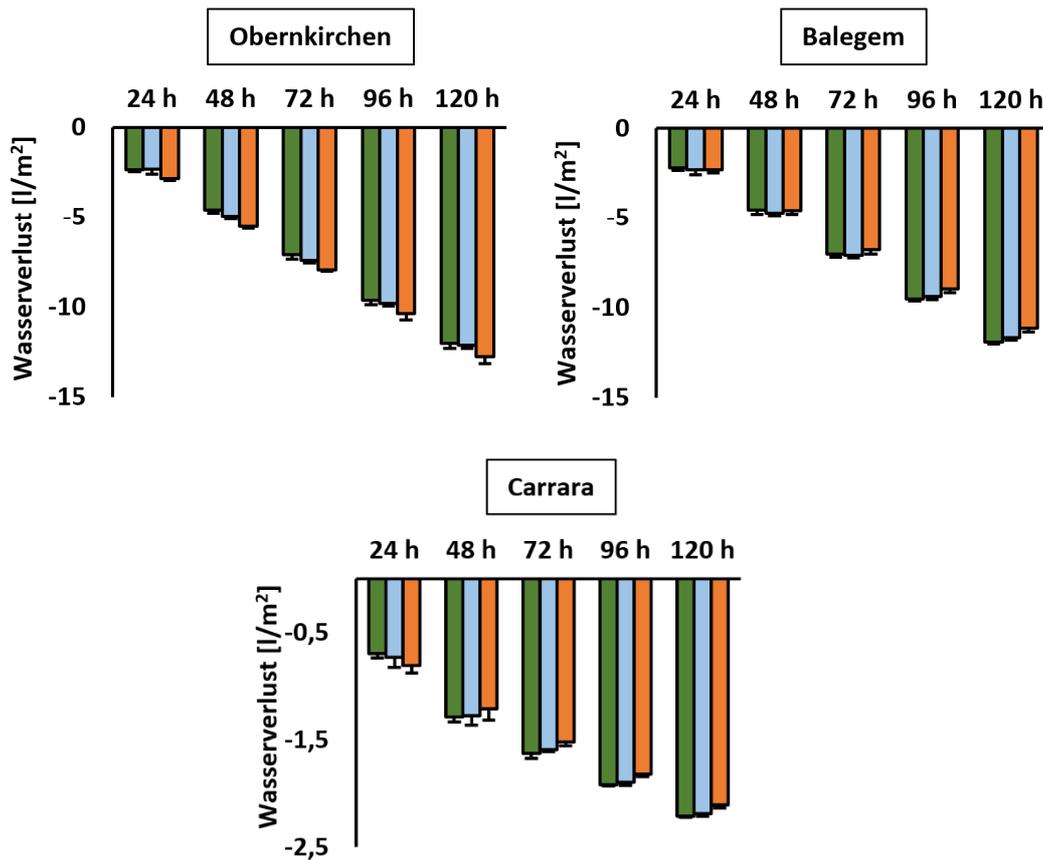


Abbildung 37: Ergebnisse des Feuchtedurchgangs

Dargestellt ist der Wasserverlust in l/m^2 über einen Zeitraum von 120 Stunden. Aufgetragen sind die Werte für die unbehandelten (Grün), mit DewA (Blau) und mit HFBI beschichteten (Orange) Steinproben. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 5$.

2.5 Stabilität der Beschichtung

Da sich DewA zuvor als das am stärksten wasserabweisende Hydrophobin herausgestellt hat, wurde die Stabilität der Hydrophobinbeschichtung auf Stein gegen Alkohol und Detergenzien getestet. Dazu wurden mit DewA beschichtete Steinproben für einen oder drei Tage in 70% EtOH und 1% SDS inkubiert, gespült und getrocknet. Anschließend wurde die Absorptionszeit von Wassertropfen gemessen. Das Experiment wurde für Obernkirchen Sandstein und Balegem Kalkstein durchgeführt, da der Absorptionstest mit dem Carrara Marmor nicht realisierbar war. Die Absorptionszeit betrug für Obernkirchen nach einem Tag in 70% EtOH $126,3 \pm 8,7$ s und nach drei Tagen $48,3 \pm 4,4$ s (Abb. 38A). Die Behandlung mit SDS reduzierte

die Absorptionszeit nach einem Tag auf $63,0 \pm 3,9$ s und nach drei Tagen auf $29,7 \pm 1,9$ s, was einer Reduzierung von 82,2% gegenüber des Ausgangswertes von $166,7 \pm 9,2$ s entspricht. Die Absorptionszeiten der Wassertropfen auf DewA beschichtetem Balegem betragen nach der Inkubation in 70% EtOH $113,7 \pm 7,6$ s nach einem Tag und $49,7 \pm 3,7$ s nach drei Tagen (Abb. 38B). Das Bad in 1% SDS reduzierte die Absorptionszeit nach einem Tag auf $93,3 \pm 5,7$ s und nach drei Tagen auf $19,3 \pm 2,4$ s. Ausgehend von einer Absorptionszeit von $312,3 \pm 14,3$ s bei frisch beschichtetem Balegem Kalkstein, ist dies eine Reduzierung des wasserabweisenden Charakters um 93,8%. Die Entfernung der Hydrophobinbeschichtung ist demnach sowohl mit Alkohol als auch mit Detergenzien möglich.

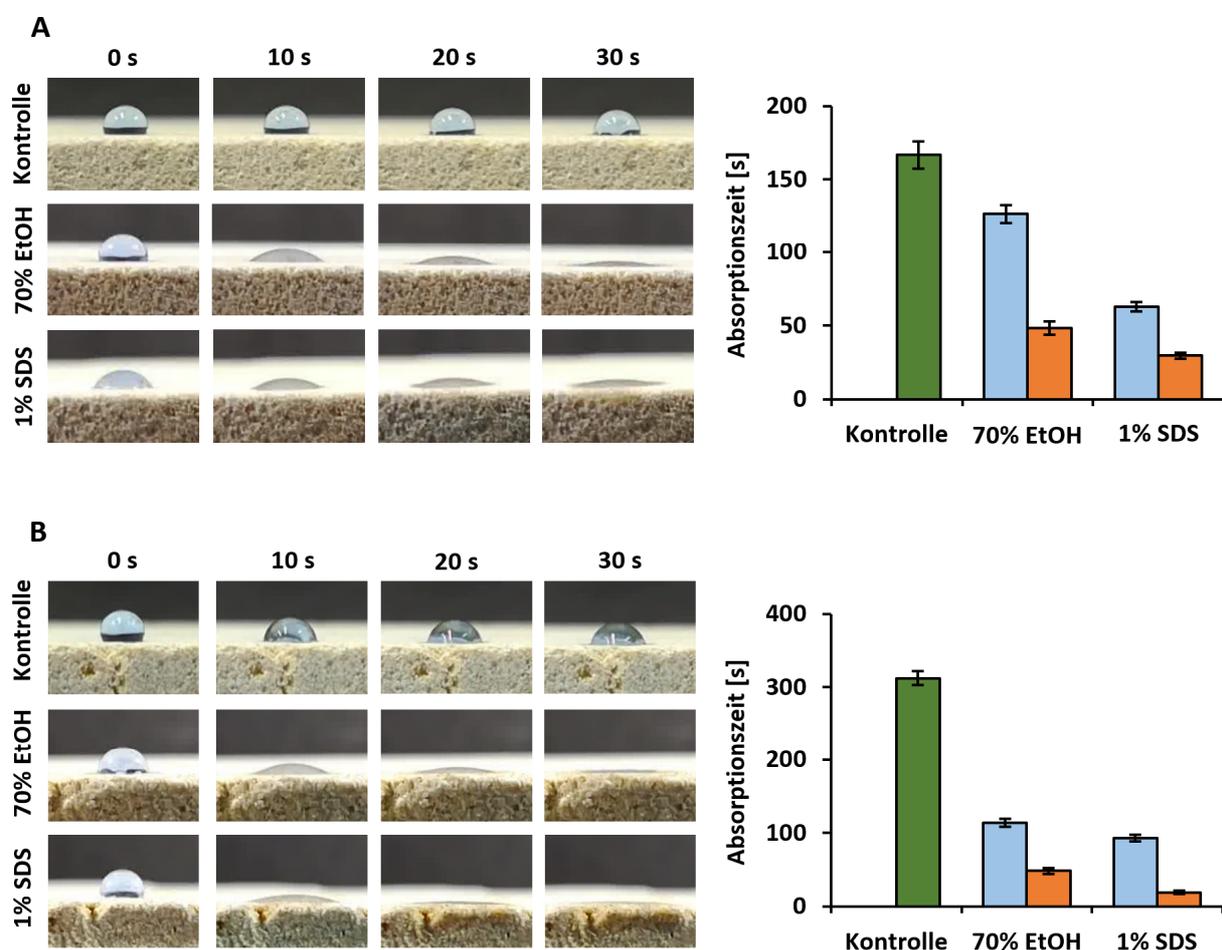


Abbildung 38: Stabilität der Hydrophobinbeschichtung auf Stein

Mit DewA beschichtete Steinplättchen von Obernkirchen Sandstein (**A**) und Balegem Kalkstein (**B**) wurden für einen oder drei Tage in 70% EtOH und 1% SDS inkubiert, gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die Wasserabsorption in den Stein gemessen. Dargestellt sind Einzelbilder der Videoaufnahmen (nach drei Tagen Inkubation) sowie die Absorptionszeiten der aufgetragenen Wassertropfen. In Grün ist die Absorptionszeit von frisch beschichtetem Stein gezeigt, in Blau die Werte nach einem Tag und in Orange nach drei Tagen in der entsprechenden Lösung. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 3$.

2.6 Langzeitstabilität

Die Bestimmung der Langzeitstabilität der Hydrophobinbeschichtung auf Stein unter realen Bedingungen fand mit DewA beschichteten Obernkirchen Sandsteinblöcken statt. Die Exponierung fand im Freien am Kölner Dom (Abb. 39A) und auf einer Garage im Kreis Karlsruhe (Abb. 39B) statt. Die durchschnittliche Absorptionszeit von Wassertropfen auf unbeschichteten Sandsteinwürfeln betrug $6,5 \pm 1,8$ s. Frisch mit DewA beschichtete Steinproben wiesen Absorptionszeiten von durchschnittlich $55,7 \pm 2,1$ s auf. Diese waren nach der Exponierung im Freien um 25,9% auf $41,3 \pm 2,8$ s reduziert (Abb. 39C).

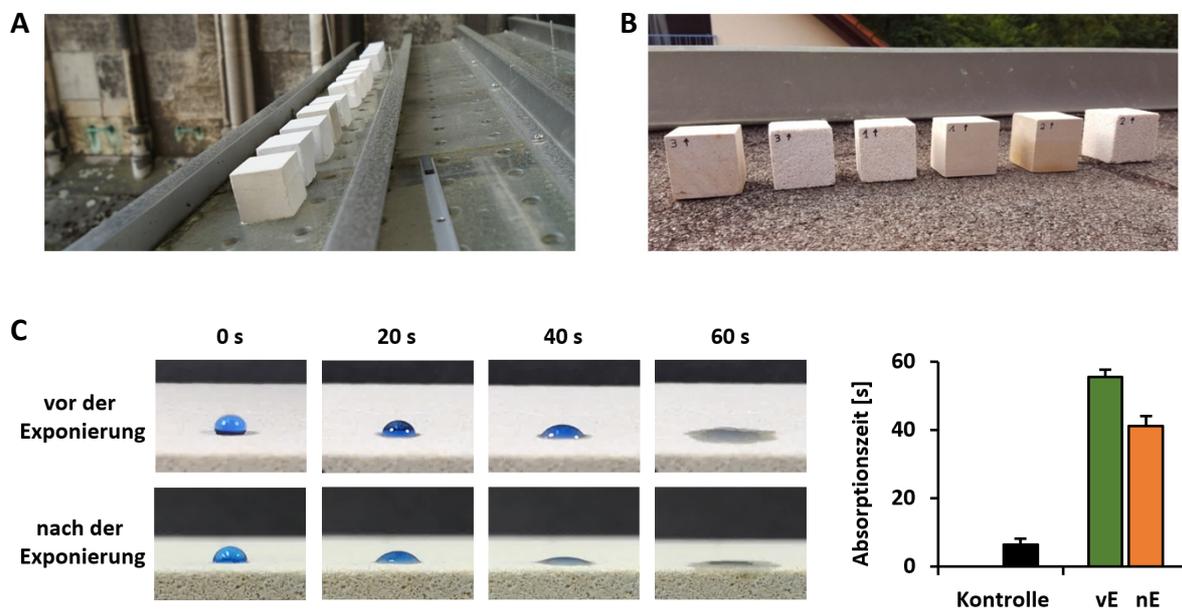


Abbildung 39: Langzeitstabilität der Hydrophobinbeschichtung

Mit DewA beschichtete Steinquader wurden am Kölner Dom (A) und in Grünwettersbach, Kreis Karlsruhe (B) für drei Monate im Freien exponiert. Anschließend wurde die Absorptionszeit von Wassertropfen in die Steinproben gemessen und die Werte mit denen vor der Exponierung verglichen (C). Gezeigt sind die Absorptionszeiten von unbehandeltem Sandstein (Schwarz) und von DewA beschichtetem Sandstein vor (Grün) und nach (Orange) der Exponierung im Freien. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 3$.

Kapitel 3: Fusion von antimikrobiellen Peptiden an Hydrophobine

3.1 Design der Fusionsproteine

Mit der Idee, antimikrobiell aktive Oberflächen herzustellen, wurden AMPs aus unterschiedlichen Organismen an Hydrophobine fusioniert. Die für die AMPs kodierenden Gensequenzen wurden aus zwei komplementären Oligonukleotiden durch *Primerligation* hergestellt und N-terminal über Restriktionsschnittstellen an DewA kloniert. Zwischen AMP und Hydrophobin war zuvor über Primer ein acht Aminosäuren großer flexibler *Linker* (GGGSGGGS) eingebracht worden, um die sterische Hinderung der Proteine zu vermindern. N-terminal an das AMP wurde eine Schutzkappe fusioniert um zu verhindern, dass das Fusionsprotein den Expressionsorganismus *E. coli* bei der Expression abtötet. Diese Schutzkappe bestand entweder aus dem Peptid YaaD und einem dreifachen HA-Tag (Abb. 40A) oder aus dem Signalpeptid PelB und ebenfalls dem dreifachen HA-Tag (Abb. 40B). Zwischen Schutzkappe und AMP war die Erkennungssequenz der Enterokinase (DDDDL) platziert, die die Entfernung der Schutzkappe von dem restlichen Protein ermöglichen und so das freie AMP-Hydrophobin (Abb. 40C) freigeben sollte.

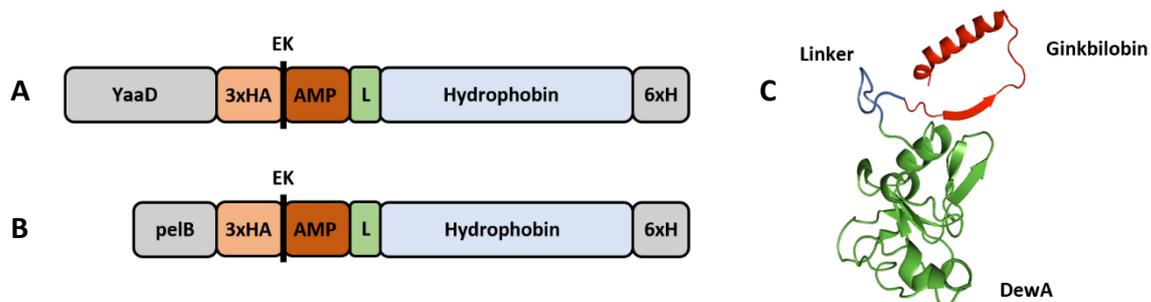


Abbildung 40: Expressionssystem der AMP-Hydrophobin Fusionsproteine

Schematische Darstellung der AMP-Hydrophobin Fusionsproteine mit den Schutzkappen bestehend aus einem dreifachen HA-Tag und entweder dem Peptid YaaD (**A**) oder dem Signalpeptid PelB (**B**). Die zwischen dem dreifachen HA-Tag und dem AMP platzierte Enterokinase Schnittstelle (EK) ermöglichte die enzymatische Abspaltung der Schutzkappe. **C**) 3D-Modell des freien Ginkbilobin_DewA Fusionsproteins mit dem Hydrophobin in Grün, dem AMP in Rot und dem Linker in Blau (3D-Proteinstruktur dargestellt mit *PyMol*).

3.2 Proteinaufreinigung aus *E. coli* und Test auf antimikrobielle Aktivität

Die Aufreinigung der Fusionsproteine aus *E. coli* fand wie vorher beschrieben statt (Kapitel 1, 1.2). Nach dem Auflösen der Einschlusskörperchen wurde das in Lösung befindliche Fusionsprotein einem enzymatischen Verdau unterzogen, um die Schutzkappe von dem AMP-Hydrophobin zu entfernen. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 500 μ l 0,5 mg Fusionsprotein mit 4 μ l Enterokinase (*New England Biolabs*, Frankfurt) und Puffer (Endkonzentration 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8) gemischt und für 16 Stunden bei 25 °C inkubiert. Die erfolgreiche Proteinaufreinigung und der gelungene Enterokinase-Verdau konnten per Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 41A). Die prominente Bande des Fusionsproteins (27,2 kDa) war nach dem enzymatischen Verdau (+EK) nahezu komplett verschwunden. Sichtbar war hauptsächlich die Bande auf Höhe des „freien“ AMP-Hydrophobins (18,9 kDa). Diese war auch schon vor der Behandlung mit Enterokinase (-EK) sichtbar. Die so gewonnenen Fusionsproteinen waren weiterhin in der Lage, harte Oberflächen wie Glas bei einer Proteinkonzentration von 100 μ g/ml relativ gleichmäßig zu beschichten (Abb. 41B). Insgesamt wurden 17 unterschiedliche antimikrobielle Peptide an DewA fusioniert und aufgereinigt (Tabelle 2).

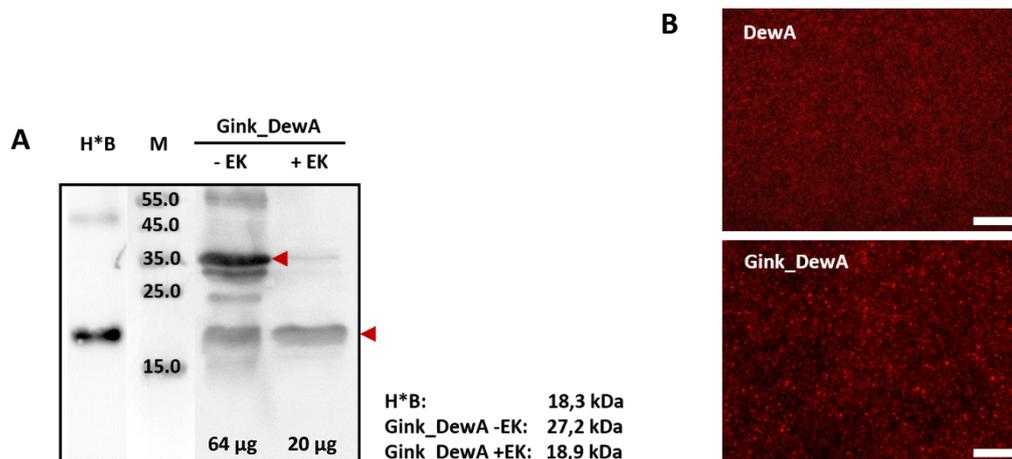


Abbildung 41: Nachweis des aufgereinigten Ginkbilobin_DewA Fusionsproteins

A) Das heterolog in *E. coli* exprimierte Fusionsprotein Ginkbilobin_DewA wurde nach der Aufreinigung über Nacht mit Enterokinase behandelt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot nachgewiesen. Aufgetragen sind das Fusionsprotein Ginkbilobin_DewA vor (-EK) und nach (+EK) der 16-stündigen Inkubation mit der Enterokinase. Geladen wurden unterschiedliche Mengen an Protein (64 μ g für -EK, 20 μ g für +EK). Als Kontrolle wurde das Protein H*B ebenfalls aufgetragen. **B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Beschichtung von Objektträgern mit DewA und Ginkbilobin_DewA, jeweils mit einer Proteinkonzentration von 100 μ g/ml. Der Nachweis am Fluoreszenzmikroskop erfolgte mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Tabelle 2: Liste der an DewA fusionierten antimikrobiellen Peptide

Name	Aminosäure Sequenz	Literatur
Ginkbilobin	ANTAFVSSAHNTQKIPAGAPFNRNLRAMLADLR QNAAFAG	Wang <i>et al.</i> , 2000
Bactenecin	RLCRIVVIRVCR	Romeo <i>et al.</i> , 1988
Tet021	KKWKIVVIKWKK	Hilpert <i>et al.</i> , 2009
Tet022	KKWKIVVIRWRR	"
Tet023	RRWKIVVIRWKK	"
Tet024	RRRWIVVIWRRR	"
Tet032	RRWRRWRRWRR	"
Tet033	RRRWWRRWRR	"
Tet091	FLPKKFRWWKYRK	"
Tet112	KWKWWKWKK	"
Tet127	KRWWKWWRR	"
Protonectin	ILGTILGLLKGL	Wang <i>et al.</i> , 2015
BMAP-28	GGLRSLGRKILRAWKKYGPIIVPIIRI	Scarsini <i>et al.</i> , 2015
Thanatin	GSKKPVIICYNRRTGKCQRM	Panteleev <i>et al.</i> , 2014
PA-1	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMA WATGGHQGNHCK	Nieto-Lozano <i>et al.</i> , 2006
AFP (antifungal peptide)	LSKYGGECSEVHNTCTYLKGGKDHIVSCPSAANLR CKTERHHCEYDEHHKTVDCQTPV	Hagen <i>et al.</i> , 2007
LK-reiches Peptid	LKLLKLLKLLKLL	Yazici <i>et al.</i> , 2016

Die hergestellten AMP-Hydrophobin Fusionsproteine wurden anschließend auf ihre antimikrobielle Wirkung hin untersucht. Dazu wurden in einem ersten Schritt Hemmhoftests mit den vier Bakterienstämmen *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens* (beide gramnegativ), *Staphylococcus epidermidis* und *Micrococcus luteus* (beide grampositiv) sowie dem Schimmelpilz *Aspergillus nidulans* durchgeführt. Dazu wurden aus beimpften LB-Platten Löcher mit 7-8 mm Durchmesser ausgestochen und diese mit AMP-Hydrophobin Lösung befüllt. Getestet wurden zwei verschiedene Proteinkonzentrationen (0,5 mg/ml und 1 mg/ml), als Negativkontrolle diente steriles Wasser (Abb. 42). Für den Test mit *A. nidulans* wurden die zu testenden Substanzen auf beimpfte MM-Platten aufgebracht und eintrocknen

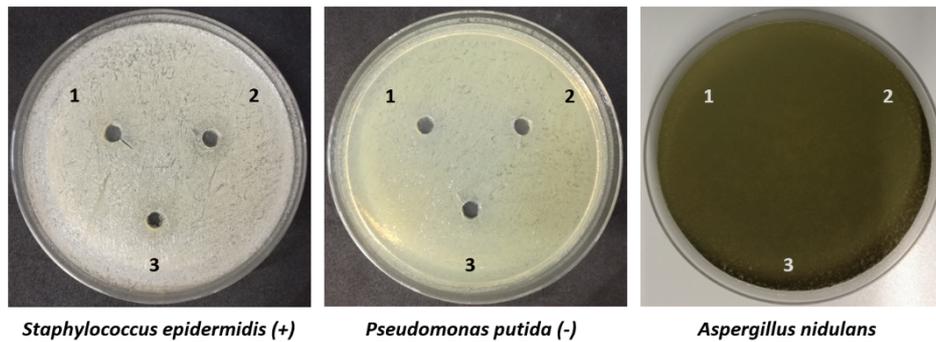


Abbildung 42: Hemmhoftest mit dem Fusionsprotein Ginkbilobin_DewA

100 μ l Ginkbilobin_DewA Lösung mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (1 mg/ml (**1**) und 0,5 mg/ml (**2**)) wurden in vorgestanzte Löcher von mit *S. epidermidis* (grammpositiv), *P. putida* (gramnegativ) und *A. nidulans* beimpften Testplatten gegeben. Als Negativkontrolle diente steriles Wasser (3). Keine Hemmung des Wachstums konnte festgestellt werden.

gelassen. Die Platten wurden anschließend inkubiert und ausgewertet. Weder für Ginkbilobin_DewA noch für eines der anderen getesteten Fusionsproteine konnte im Hemmhoftest eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden. In einem zweiten Schritt wurden mit AMP-Hydrophobin beschichtete Objektträger über Nacht in Bakterienkultur inkubiert und die anhaftenden Zellen per Lebend-Tot-Mikroskopie nachgewiesen. Doch auch hier konnte kein Unterschied zwischen unbeschichtetem, nur mit DewA oder mit AMP-Hydrophobin beschichtetem Glas nachgewiesen werden (Abb. 43).

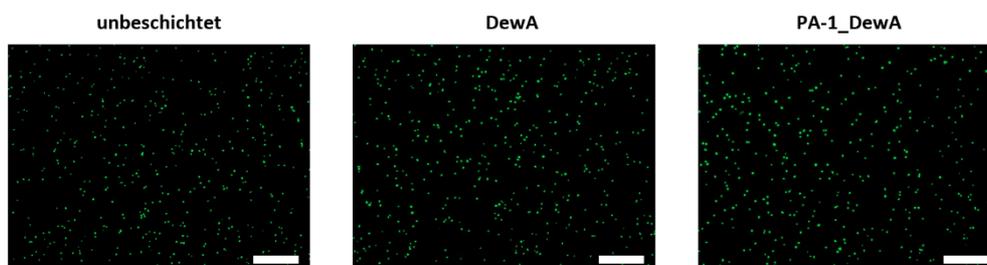


Abbildung 43: Biofilmbildung auf PA-1_DewA (aus *E. coli*) beschichtetem Glas

Unbeschichtete und mit DewA oder PA-1_DewA beschichtete *8-well* Objektträger wurden über Nacht in einer *S. epidermidis* Kultur inkubiert. Anschließend wurden lose Bakterien abgespült und die anhaftenden Zellen mit Propidiumiodid und SytoTM9 gefärbt. Dargestellt sind die Aufnahmen der SytoTM9 Färbung. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Um auszuschließen, dass die Aufreinigung aus den Einschlusskörperchen einen negativen Effekt auf die Wirksamkeit der antimikrobiellen Peptide hat, wurden die Fusionsproteine löslich im Cytoplasma von *E. coli* exprimiert. Dazu wurde das *pelB* in der Schutzkappe des PA-

1_DewA Proteins per PCR entfernt und durch das Start-Codon ATG ersetzt. Nach der Transformation des neu gewonnenen Plasmids in SHuffle® T7 *E. coli* wurden 50 ml Kulturen bei verschiedenen Bedingungen inkubiert, um die optimalen Voraussetzungen auszuloten, bei der die heterolog exprimierten Proteine gelöst im Cytoplasma vorliegen. Auch geringere Mengen an IPTG zur Induktion der Proteinexpression wurden getestet. Die Kulturen wurden anschließend geerntet, an der *French Press* aufgeschlossen und der Überstand per Western Blot überprüft. Dabei stellte sich eine Inkubation bei 16 °C über Nacht als am besten geeignet heraus (Abb. 44). Nach der Aufreinigung und dem Enterokinase-Verdau konnte jedoch auch für das cytoplasmatisch exprimierte PA-1_DewA Fusionsprotein keine antimikrobielle Wirkung im Hemmhoftest oder bei der Lebend-Tot-Mikroskopie festgestellt werden.

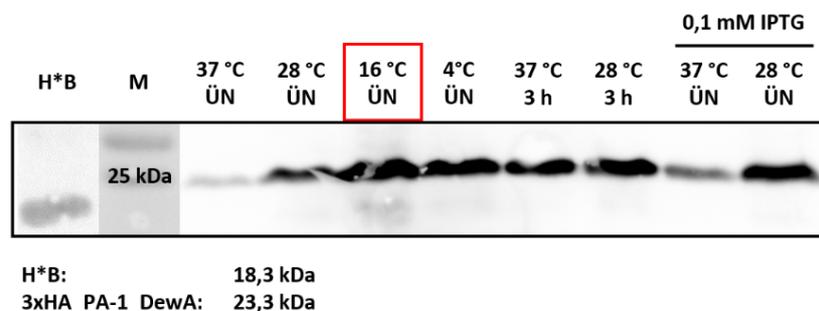


Abbildung 44: Native PA-1_DewA Aufreinigung aus *E. coli*

Um eine native Aufreinigung von PA-1_DewA aus dem Cytoplasma zu ermöglichen, wurde das *pelB* in der Schutzkappe des Fusionsproteins per PCR entfernt. Um die optimalen Bedingungen für die Produktion von löslichem Protein im Cytoplasma zu finden wurde PA-1_DewA unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen in *E. coli* exprimiert. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die löslichen Proteine des Cytoplasmas von den Zelltrümmern getrennt, per SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der aufgereinigten Cytoplasma-Fraktion. Der immunhistochemische Nachweis des PA-1_DewA erfolgte mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Am meisten Protein mit einer Inkubation bei 16 °C über Nacht und 0,5 mM IPTG erzielt (roter Kasten).

3.3 Proteinaufreinigung aus *S. cerevisiae* und Test auf antimikrobielle Aktivität

Als Alternative zu der Proteinaufreinigung aus den Einschlusskörperchen oder dem Cytoplasma von *E. coli* wurde das Fusionsprotein PA-1_DewA in *S. cerevisiae* exprimiert. Die zuvor in *E. coli* benutzte Schutzkappe wurde entfernt (Abb. 45A), da das AMP PA-1 nur gegen Bakterien wirksam ist (Wang *et al.*, 2017). Dazu wurde die für das Konstrukt kodierende

Gensequenz Codon-optimiert bestellt, per PCR amplifiziert und in den Vektor pSP-G1 kloniert. Die Proteinexpression wird von dem konstitutiv aktiven TEF1 Promotor gesteuert (Abb. 45B). Zusätzlich wurde ein Plasmid erstellt, in dem das DewA durch HGFI ersetzt wurde. Nach der erfolgreichen Transformation der zwei Plasmide in den *S. cerevisiae* Stamm BY4741 wurden jeweils zehn Einzelkolonien in einem Vorversuch auf ihre Proteinexpression getestet. Die Transformante mit der größten Menge produziertem Fusionsprotein wurde für die Proteinexpression im Halbliter-Maßstab verwendet. Bei dem direkten Vergleich der Produktionsraten beider Fusionsproteine stellte sich heraus, dass die Expression des Proteins PA-1_DewA um ein Vielfaches höher war als die des PA-1_HGFI (Abb. 45C), wodurch letzteres verworfen wurde. Nach dem Zellaufschluss an der *French Press* wurde der Überstand der PA-1_DewA Transformante direkt benutzt, um Glas zu beschichten.

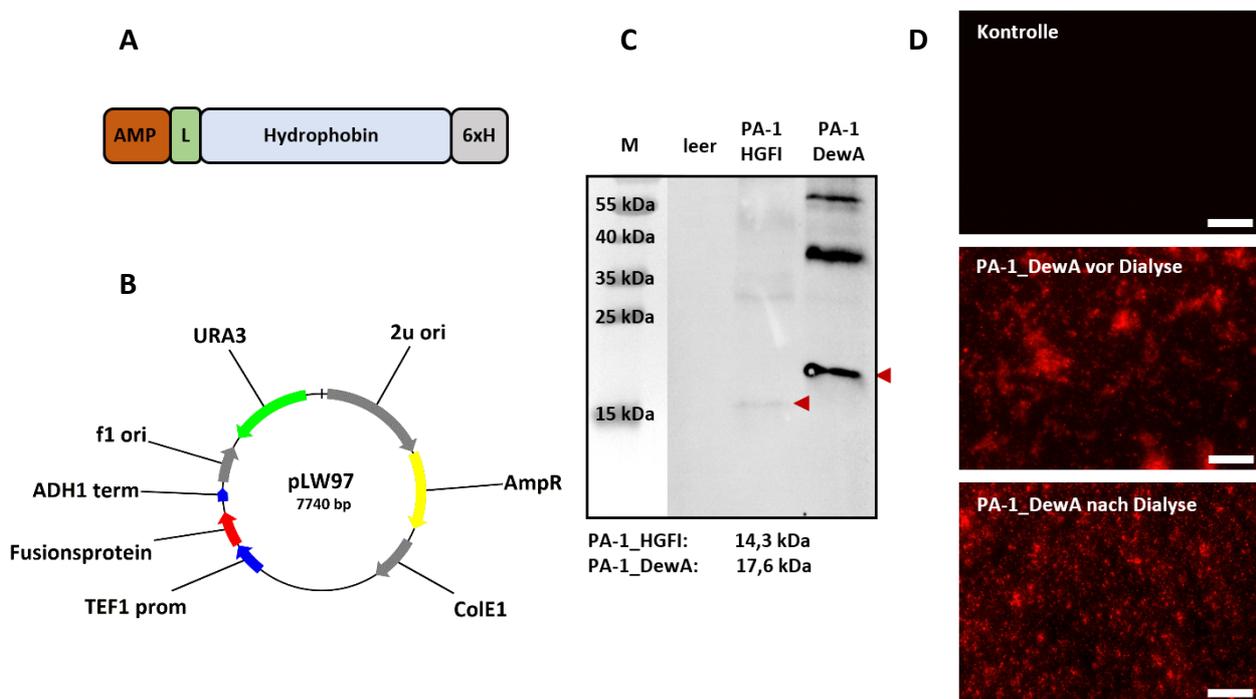


Abbildung 45: Expression der AMP-Hydrophobin Fusionsproteine in *S. cerevisiae*

A) Schematische Darstellung des Aufbaus der in *S. cerevisiae* exprimierten Fusionsproteine. **B)** Vektorkarte des Plasmids pLW97 zur Expression des Fusionsproteins PA-1_DewA in Hefe. **C)** Nachweis der aufgereinigten Proteine PA-1_HGFI und PA-1_DewA per Western Blot. Aufgetragen ist die gleiche Menge Gesamtprotein aus den jeweiligen meistproduzierenden Transformanten. Als Kontrolle ist das aufgereinigte Protein aus einer mit Leervektor transformierten Kolonie aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. **D)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Beschichtungen von Glas mit dem Überstand der Leerkontrolle sowie dem PA-1_DewA Protein vor und nach der Dialyse gegen Beschichtungspuffer. Der Nachweis des PA-1_DewA erfolgte mit einem Primärantikörper gegen den *6x-His Tag* und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten jedoch, dass so keine gleichmäßige Beschichtung erreicht werden konnte. Der Überstand wurde anschließend über Nacht gegen Beschichtungspuffer dialysiert und die Beschichtung erneut durchgeführt. Im Vergleich zu vorher war eine deutlich gleichmäßigere Verteilung des Fusionsproteins auf der Oberfläche zu erkennen (Abb. 45D). Mit dem dialysierten Überstand, der das PA-1_DewA Protein enthielt (1,7 mg/ml Gesamtproteinkonzentration), wurde der Hemmhoftest gegen die vier zuvor genannten Bakterienstämme durchgeführt. Eine Inhibierung des Bakterienwachstums um die ausgestanzten Locher oder die Stellen, an denen das Fusionsprotein eintrocknen gelassen wurde, konnte nicht erkannt werden (Abb. 46).

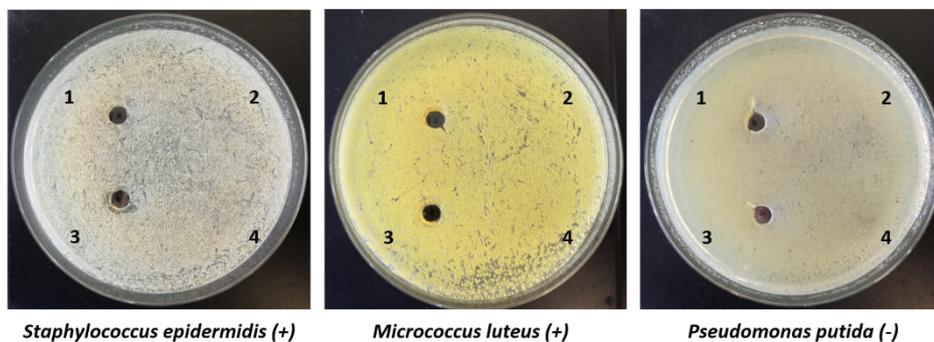


Abbildung 46: Hemmhoftest mit dem Fusionsprotein PA-1_DewA, gewonnen aus *S. cerevisiae*

100 μ l einer 1 mg/ml Lösung PA-1_DewA (1+2) und 100 μ l steriles Wasser (3+4) wurden in ein vorgestanztes Loch einer beimpften Testplatte gegeben (1+3) oder vor der Beimpfung der Platten eintrocknen gelassen (2+4). Gezeigt sind die Testplatten mit *S. epidermidis*, *M. luteus* (beide grampositiv) und *P. putida* (gramnegativ). Eine Hemmung des Wachstums konnte nicht festgestellt werden.

Für die Lebend-Tot-Färbung wurden Objektträger mit PA-1_DewA beschichtet und über Nacht in *S. epidermidis*, *M. luteus* und *P. putida* Kulturen bei 28 °C inkubiert. Als Kontrollen dienten unbeschichtete und mit DewA beschichtete Objektträger, die in den gleichen Kulturen inkubiert wurden. Am Folgetag wurden die Objektträger abgespült, die anhaftenden Zellen mit Propidiumiodid und Syto™9 angefärbt und die Proben bei 200-facher Vergrößerung mikroskopiert (Abb 47A). Anschließend wurden die Aufnahmen in *ImageJ* analysiert und die Anzahl der anhaftenden Zellen bestimmt. Die Gesamtzahl an *S. epidermidis* Zellen auf DewA beschichtetem Glas betrug $1021,3 \pm 37,5$ Zellen/mm² und unterschied sich nicht signifikant von unbeschichtetem Glas mit $1017,3 \pm 27,1$ Zellen/mm² (Abb 47B). Auf PA-1_DewA beschichtetem Glas waren nur $723,6 \pm 31,4$ Zellen/mm² vorzufinden. Betrachtet man nur die mit Syto™9 angefärbten, lebenden Zellen betragen die Werte für unbeschichtetes Glas $511,3 \pm 33,1$ Zellen/mm², für DewA beschichtetes Glas $507,6$

$\pm 32,8$ Zellen/mm² und für das PA-1_DewA beschichtete Glas $195,3 \pm 37,0$ Zellen/mm². Dies entspricht einer Reduzierung der Anzahl an lebenden Zellen um 61,8 % verglichen mit den zwei anderen Oberflächen. Die Ergebnisse für den Test mit *M. luteus* waren vergleichbar, die Anzahl an lebenden Zellen auf PA-1_DewA beschichtetem Glas war verglichen mit DewA beschichtetem Glas jedoch nur um 26,1 % reduziert. Bei dem gramnegativen *P. putida* wurde keine Wachstumsreduzierung festgestellt.

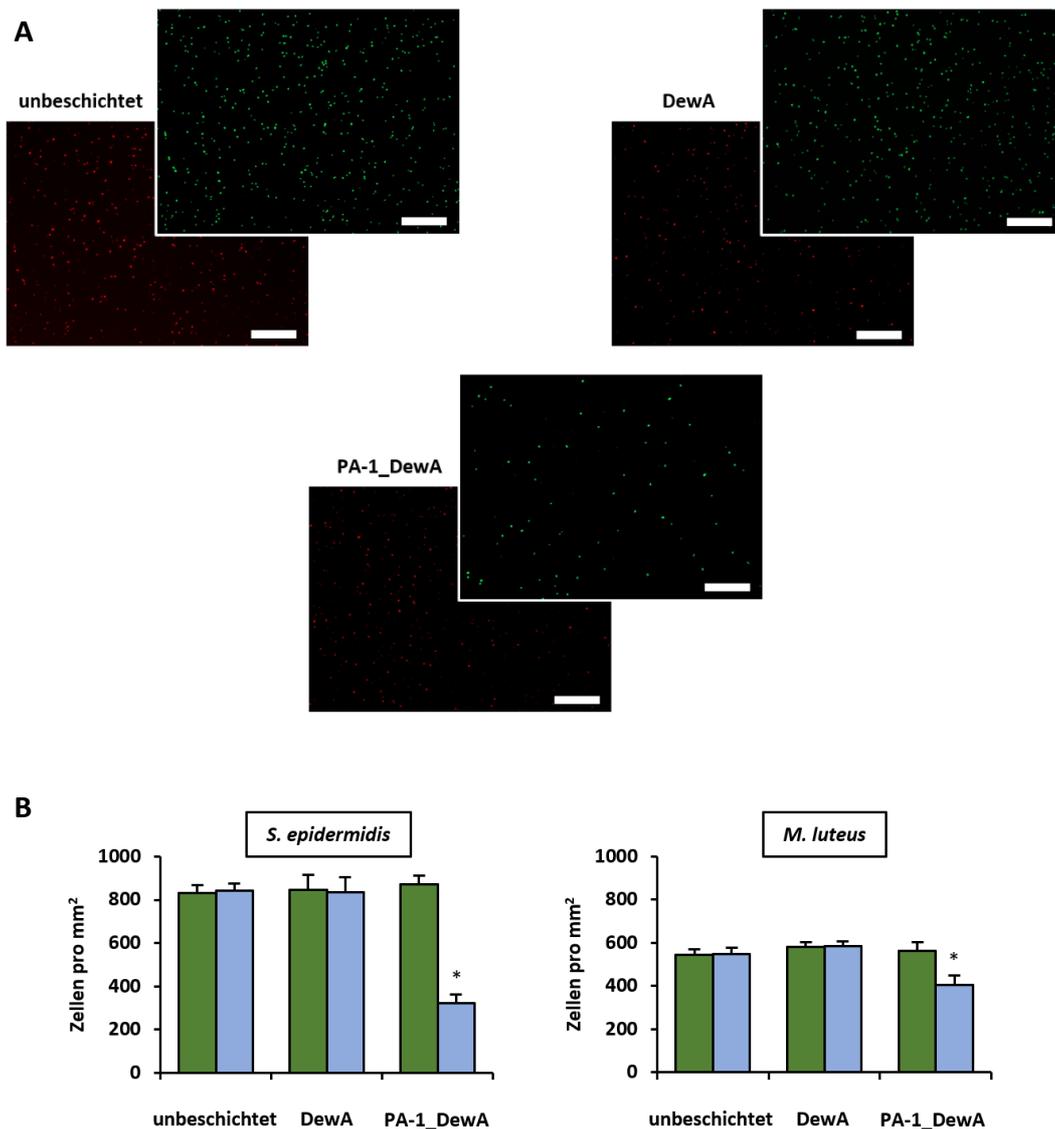


Abbildung 47: Biofilmbildung auf PA-1_DewA (aus *S. cerevisiae*) beschichtetem Glas

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lebend-Tot-Färbung mit unbeschichtetem, DewA und PA-1_DewA beschichtetem Glas nach der Inkubation in einer *S. epidermidis* Kultur. Nach dem Abspülen der losen Bakterien wurden die anhaftenden Zellen mit Propidiumiodid und Syto™9 gefärbt. Die toten Zellen sind in Rot, die lebenden in Grün dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. **B)** Ergebnis der Lebend-Tot-Färbung als Zellen pro mm². In Grün die Anzahl der Propidiumiodid angefärbten Zellen, in Blau die Anzahl der Syto™9 angefärbten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung mit $n = 3$ (* $p < 0,05$).

IV Diskussion

Kapitel 1: Heterologe Expression und Charakterisierung pilzlicher Hydrophobine

1.1 Aufreinigung der Hydrophobine aus *E. coli*

Hydrophobine haben seit ihrer Entdeckung 1990 das Interesse der Forschung und der Industrie geweckt (Schuren & Wessels, 1990). Die amphiphilen Proteine sind in der Lage, an diverse Oberflächen zu binden und die Polarität der Grenzflächen zu verändern. Besonders die Klasse I Hydrophobine zeichnen sich durch sehr stabile Beschichtungen aus, die nur durch starke Säuren gelöst werden können (de Vries *et al.*, 1993; Linder *et al.*, 2005). Lange Zeit war es jedoch ausschließlich möglich, Hydrophobine mit aufwendigen Prozessen aus ihren Ursprungsorganismen zu isolieren, was zu sehr geringen Proteinausbeuten führte (Scholtmeijer *et al.*, 2001). Die heterologe Expression eines Hydrophobins gelang erstmals 2006 mit dem in *E. coli* exprimierten Klasse I Hydrophobin EAS aus *N. crassa* (Kwan *et al.*, 2006). Die Aufreinigung gelang durch eine N-terminale Fusion des menschlichen Ubiquitins an EAS und anschließender Aufreinigung aus Einschlusskörperchen. Es folgte die Expression von Hyd2 aus *Beauveria bassiana* und DewA aus *A. nidulans*, ebenfalls in *E. coli* (Kirkland & Keyhani, 2010; Wohlleben *et al.*, 2010). Auch hier war dies nur durch eine Fusion der Hydrophobine an die Chitinbindedomäne aus *Bacillus circulans*, beziehungsweise die YaaD Synthase aus *B. subtilis* möglich. Zeitgleich gelang auch die heterologe Expression des *A. nidulans* Hydrophobins DewA in *Hypocrea jecorina* (im sexuellen Entwicklungsstadium befindliche Form von *T. reesei*) ohne einen Fusionspartner (Schmoll *et al.*, 2010). Die Ausbeute war jedoch geringer als in *E. coli*.

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um Hydrophobine aus verschiedenen Organismen und Klassen ohne die Hilfe eines permanenten N-terminalen Fusionspartners in *E. coli* zu exprimieren (Winandy *et al.*, 2018). Dazu wurden die Gene der *A. nidulans* Hydrophobine DewA, DewC, DewD und DewE sowie von HFBI aus *T. reesei* C-terminal an das Signalpeptid PelB aus *P. carotovorum* kloniert. Dieses bewirkt die Sekretion der heterologen Proteine in das Periplasma, was mehrere Vorteile darstellt. Die Translokation der

heterologen Proteine vom Cytoplasma in das Periplasma geschieht durch die Sec-abhängige Transportmaschinerie (Sokolosky & Szoka, 2013), infolgedessen das Signalpeptid PelB von der Signalpeptidase I abgespalten wird (Pugsley, 1993; Pratap & Dikshit, 1998). Der freie N-Terminus ermöglicht eine bessere Charakterisierung der Proteine, da das abgespaltene PelB im Gegensatz zum YaaD keinen Einfluss auf etwaige, biochemische Interaktionen der Hydrophobine mit der Umgebung hat. Zusätzlich garantieren die im Periplasma vorherrschenden, oxidativen Bedingungen sowie die vorhandenen Disulfid-Isomerasen und -Oxidasen die fehlerfreie Bildung der vier intramolekularen Disulfidbrücken (Bardwell *et al.*, 1991; Missiakas *et al.*, 1994; Bessette *et al.*, 1999). Die korrekte Faltung und Wirksamkeit von periplasmatisch aufgereinigten Proteinen konnte am Beispiel vom HIV-Protein Vpu gezeigt werden (Deb *et al.*, 2017). Es ist also davon auszugehen, dass die aus dem Periplasma aufgereinigten Klasse I und Klasse II Hydrophobine in ihrer natürlichen Aminosäuresequenz vorliegen, korrekt gefaltet sind und die charakteristischen vier Disulfidbrücken aufweisen. Die im Western Blot auftretenden Dimer- und Multimerbanden sind ein Hydrophobintypisches Phänomen, welches auch bei der Aufreinigung von Hydrophobinen aus dem natürlichen Organismus zu beobachten ist (Wang *et al.*, 2004; Linder *et al.*, 2005).

1.2 Charakterisierung der aufgereinigten Hydrophobine

Die gewonnenen Hydrophobine konnten ohne weitere zeitaufwendige und teure Aufreinigungsschritte, wie für andere Expressionssysteme beschrieben (Boeuf *et al.*, 2012; Przylucka *et al.*, 2017), zur Oberflächenbeschichtung benutzt werden. Alle fünf aufgereinigten Hydrophobine waren in der Lage, Oberflächen zu beschichten und dabei die Hydrophobizität von Glas zu erhöhen. Dabei bildeten alle getesteten Hydrophobine, bis auf DewE, eine gleichmäßige Beschichtung. Bei DewE waren größere Aggregate sowohl im Fluoreszenz- als auch im Rasterkraftmikroskop zu beobachten. Die Tatsache, dass diese Proteinaggregate nicht durch geringere oder höhere Hydrophobinkonzentrationen vermieden werden konnten, deutet darauf hin, dass sie durch die biochemischen Eigenschaften von DewE verursacht sind.

Die Untersuchung der Beschichtungen am AFM zeigten auch, dass die Hydrophobine die harte Glasoberfläche nicht in eine weiche, klebrige Oberfläche verwandeln, was das

Vorhandensein einer sehr dünnen Proteinschicht verspricht. Außerdem konnte bei den AFM-Aufnahmen beobachtet werden, dass keines der Klasse I Hydrophobine *Rodlet*-artige Strukturen auf dem Glas bildet. Dass das heterolog exprimierte DewA dazu in der Lage ist, wurde bereits mehrfach gezeigt (Morris *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2013). Die Assemblierung zu *Rodlets* fand dabei immer an der Luft-Wasser-Grenzphase statt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Hydrophobinlösung, die luftdicht mit Folie abgeschlossen ist, keine *Rodlets* bildet. Erst das Einführen einer Luftblase führte zur Assemblierung dieser an der neu geschaffenen Gas-Wasser Grenzphase (Lo *et al.*, 2014). Die erstellten AFM Aufnahmen der Beschichtungen von Glas mit den *A. nidulans* Hydrophobinen ähneln denen, die auch mit dem Klasse I Hydrophobin Hyd2 erstellt wurden (Kirkland & Keyhani, 2010). Der negative Einfluss einer zu hohen oder niedrigen Proteinkonzentration ist ebenfalls auszuschließen, da die Beschichtungen mit 100 µg/ml Hydrophobin durchgeführt wurden. Dies entspricht der Proteinkonzentration, die auch bei der erfolgreichen Selbstassemblierung von SC3 zu *Rodlets* genutzt wurde (Scholtmeijer *et al.*, 2009).

Die Klasse I Hydrophobine DewA und DewE konnten dem eigentlich hydrophilen Glas den wasserabweisendsten Charakter verleihen, was zumindest für DewA den Erwartungen entspricht. Die Deletion von *dewA* in *A. nidulans* führt von allen Hydrophobin-Deletionen zu dem stärksten Verlust an Hydrophobizität (Grünbacher *et al.*, 2014). Selbst die $\Delta rodA$ -Mutante, hauptverantwortlich für die *Rodlet*-Bildung, besitzt stärker wasserabweisende Sporen als der $\Delta dewA$ -Stamm. Die Deletion von *dewE* hat jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Hydrophobizität. Der stark wasserabweisende Charakter der DewE-Beschichtung kann möglicherweise durch ein Zusammenspiel des hydrophoben Charakters des Proteins und der geformten Proteinaggregate erklärt werden. Diese rauhen die Oberfläche wie SiO₂/TiO₂-Nanopartikel an und verringern so die Kontaktfläche des Wassers zu der Oberfläche (Manoudis *et al.*, 2009).

Obwohl alle Hydrophobine außer HFBI aus einem Organismus stammen, zeigten die Beschichtungen sehr unterschiedliche Ergebnisse, was ihre Stabilität gegenüber EtOH, SDS, UV-Licht und Hitze betrifft. Nur DewA und HFBI zeigten die klassische Stabilität eines Klasse I, beziehungsweise Klasse II Hydrophobins. Während die Beschichtung mit DewA nur sehr schwer zu dissoziieren war (Wessels *et al.*, 1991; Linder *et al.*, 2005), konnte das HFBI mit EtOH und SDS vom Glas entfernt werden (Wösten & de Vocht, 2000; Ritva *et al.*, 2003). Die Beschichtung mit DewC war weniger stabil als die mit DewA, was vielleicht durch die für

Klasse I Hydrophobine sehr lange L3-Schleife (zwischen Cys7 und Cys8) mit 35 Aminosäuren erklärbar ist. Normal wären sechs bis 18 Aminosäuren (Littlejohn *et al.*, 2012). Dieser zusätzliche Bereich in der L3-Schleife besteht fast nur aus hydrophoben Aminosäuren (4x Valin, 3x Alanin, 2x Leucin) und interferiert möglicherweise mit der klassischen Struktur und der Beschichtungsstabilität, wie sie ein Klasse I Hydrophobin wie DewA vorweist. Die Hydrophobine DewD und DewE bildeten noch weniger stabile Beschichtungen als das Klasse II Hydrophobin HFBI. Erklärt werden kann dies möglicherweise durch zwei hydrophobe, ungeordnete Schleifen, die im Gegensatz zu DewA oder DewC fehlen (DewD) oder stark verschoben sind (DewE) (Grünbacher *et al.*, 2014). Die einzelnen Schleifen haben einen großen Einfluss auf die Bindeeigenschaften der Hydrophobine. Das Austauschen einer solchen Schleife im Klasse I Hydrophobin HGFI aus *Grifola frondosa* durch eine Schleife aus dem Klasse II Hydrophobin HFBI führte zu einem stark veränderten Beschichtungsverhalten und dem Verlust der Fähigkeit, *Rodlets* zu bilden (Niu *et al.*, 2014). Zusätzlich besitzt DewD noch ein Aminosäurenmuster (C-X₁₃-CC-X₁₇-C-X₁₂-C-X₇-CC-X₈-C), das sich weder den Klasse I noch den Klasse II Hydrophobinen zuordnen lässt (Grünbacher *et al.*, 2014).

Im Emulsionstest waren alle Hydrophobine in der Lage, die Phasentrennung des Wasser-Öl Gemisches zu verlangsamen. Dabei zeigte vor allem DewD die besten emulgatorischen Fähigkeiten, was auch im Langzeitexperiment bestätigt wurde. Dort zeigte sich auch, dass das N-terminal an DewA fusionierte Peptid YaaD im H*B Fusionsprotein der BASF SE einen negativen Einfluss auf die emulgatorischen Fähigkeiten von DewA hat. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass das zusätzliche Peptid keinen Einfluss auf die hydrophobierenden Eigenschaften von DewA hat (Schmoll *et al.*, 2010; Rieder, 2012).

Fähigkeit der Hydrophobine, sich selbstständig an hydrophil-hydrophoben Grenzschichten zu einem *Monolayer* zu assemblieren, wurde in den Jahren nach der Entdeckung der Proteine eingehend untersucht. Dies geschah aber meist nur an einzelnen Klasse I oder II Hydrophobinen, obwohl Pilze meist mehrere, unterschiedliche Hydrophobine besitzen (Linder *et al.*, 2005). Dabei wurde gezeigt, dass sowohl die Struktur der einzelnen Proteine als auch die Natur der Oberfläche, mit welcher sie interagieren, Einfluss auf ihre biochemischen Fähigkeiten und die Ausbildung von *Rodlets* haben (Morris *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2013, Lo *et al.*, 2014). Selbst der Produktionsorganismus von heterolog exprimierten Hydrophobinen verändert ihre Eigenschaften (Przylucka *et al.*, 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Aussagen und bekräftigen die Hypothese, dass verschiedene Hydrophobine aus einem Organismus unterschiedliche Funktionen erfüllen. Obwohl DewA, DewC, DewD und DewE alle aus *A. nidulans* stammen, besitzen sie doch sehr unterschiedliche biochemische Eigenschaften. Dies passt zu der zeitlich unabhängigen Expression der Hydrophobine sowie der Lokalisation an verschiedenen Pilzstrukturen (Wessels *et al.*, 1991; Lacroix & Spanu, 2009; Grünbacher *et al.*, 2014).

Die Unterteilung der Hydrophobine in zwei Klassen wurde in den letzten Jahren immer mehr in Frage gestellt und das Einführen einer neuen, dritten Klasse vorgeschlagen (Jensen *et al.*, 2010; Littlejohn *et al.*, 2012). Die experimentellen Daten dieser Arbeit unterstützen diese theoretischen Untersuchungen, die die Einteilung der Hydrophobine nicht nur anhand ihrer Aminosäuresequenz, sondern nach ihren biochemischen Eigenschaften fordern. Obwohl Hydrophobine wie DewA und HFBI mit typischen Klasse I oder II Eigenschaften in verschiedenen Pilzen gefunden werden können, passt eine Vielzahl der Proteine wie DewC, DewD oder DewE in keine der zwei Klassen. Durch weitere Untersuchungen dieser untypischen Hydrophobine können der Einfluss einzelner Strukturelemente auf die biochemischen Eigenschaften, das Verhalten an hydrophil-hydrophoben Grenzphasen und die verschiedenen Funktionen im Pilz möglicherweise aufgeklärt werden. Während sich typische Klasse I Hydrophobine wie das DewA für stabile Beschichtungen von Oberflächen eignen, ist der Einsatz von den nicht in eine Klasse zuordbaren DewD und DewE als Schaum- oder Emulsionsstabilisatoren in der Nahrungsmittelindustrie denkbar.

Kapitel 2: Hydrophobine als wasserabweisende Beschichtung zum Schutz steinerer Monumente

Der Schutz vor Umwelteinflüssen und allen voran der Schutz vor Wasser ist die größte Herausforderung in der Konservierung von steinernen Gebäuden (Poli *et al.*, 2004). Eine besondere Herausforderung ist dann gegeben, wenn zwar Wasser von außen abgehalten werden, aber Wasserdampf aus dem Inneren der Gebäude abgeführt werden soll. Dieser Wasserdampf ist in großen historischen Gebäuden mit unzulänglicher Lüftungstechnik ein großes Problem. Letztlich muss es hier das Ziel sein, eine Beschichtung zu finden, die die Steine von außen hydrophobisiert, aber die Durchlässigkeit für Wasserdampf erhält. In der Bekleidungsindustrie gibt es ähnliche Anforderungen an Schuhe, Jacken und andere Bekleidungsstücke. Hier wurde ein Durchbruch durch die Einführung von GoreTex® erreicht, und im Falle von Steinen wäre ein solcher Effekt wünschenswert. Pilzliche Hydrophobine könnten der Schlüssel für die Entwicklung solcher innovativer Beschichtungsverfahren sein.

Mit den Hydrophobinen DewA und HFBI als typische Vertreter der Klasse I und Klasse II Hydrophobine war es möglich, drei unterschiedliche Lithotypen, die sich in Zusammensetzung, Porengröße und Porosität unterscheiden, erfolgreich zu beschichten. Moderne Polymer-Schutzmittel sind oft aufgrund der chemischen Kompatibilität zwischen Produkt und Stein in der Lage, nur einen speziellen Lithotypen zu beschichten und sind so begrenzt einsetzbar (Esposito Corcione *et al.*, 2016). Die Wasseraufnahme in den Stein wurde mit der Hydrophobinbeschichtung deutlich verlangsamt, wobei die Beschichtung mit DewA durchschnittlich um 10% - 15% besser funktionierte als die mit HFBI. Im Vergleich mit den kommerziell erhältlichen Produkten ist die Wirksamkeit der Hydrophobinbeschichtung jedoch eher mäßig. Das Produkt Silres® BS29A (Wacker Chemie AG, München), eine Mischung aus Silanen und Siloxanen, ist das in Europa am meisten verwendete Schutzmittel und erreicht auf Marmor Kontaktwinkel von 140° (Aslanidou *et al.*, 2018), während das DewA auf dem gleichen Lithotyp 79° erreicht und damit nicht an die von der Literatur geforderten Mindestwerte von 90° heran kommt (Della Volpe *et al.*, 2000). Ein Vergleich der Wasserabsorptionsraten mit Literaturwerten ist nicht möglich, da diese in der Regel an größeren Blöcken, meist *in situ*, bestimmt werden. Man kann jedoch davon ausgehen, dass hohe Kontaktwinkel durch die verkleinerte Kontaktfläche zwischen Wassertropfen und

Oberfläche geringere Absorptionswerte nach sich ziehen (Barthlott & Nienhuis, 1997; Zorba *et al.*, 2008).

Nach dem Brechen der Steine konnten sowohl für das DewA als auch für das HFBI Penetrationstiefen in Sand- und Kalkstein von bis zu 2 cm festgestellt werden. Im Vergleich mit den Schutzmitteln auf dem Markt ist das sehr weit, da diese nur direkt an der Oberfläche des Steines binden (D'Arienzo *et al.*, 2008). Selbst bei der Konsolidierung liegt die Eindringtiefe der Produkte bei durchschnittlich 5 mm für klassische Polymer-basierte Produkte (Delgado Rodrigues, 2001; Slavíková *et al.*, 2012) und bei 5 - 10 mm bei Nanopartikel-basierten Produkten, die beispielsweise Calciumoxid- oder Bariumhydroxidpartikel enthalten (Sassoni *et al.*, 2013; Delgado Rodrigues *et al.*, 2018). Ein Grund für die tiefe Penetration der Hydrophobine könnte ihre Fähigkeit sein, die Polaritäten an der Steinoberfläche zu verändern und die Oberflächenspannung des Wassers, in dem sie gelöst sind, zu verringern. Sowohl die Polarität als auch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit sind Schlüsselemente für die Ausbildung starker Kapillarkräfte (Richards, 1931). Dieses Phänomen ist auch in der modernen Konsolidierung von brüchigem Steingut anzutreffen, denn in Ethanol gelöste Nanopartikel und Silane dringen tiefer in den Stein ein als die gleichen, in Wasser gelösten Wirkstoffe (Roveri *et al.*, 2018). Der Grund hierfür sind die unterschiedlichen Oberflächenspannungen von Wasser (72,75 mN/m) und Ethanol (22,55 mN/m). Die geringere Oberflächenspannung erlaubt es dem Alkohol, tiefer in poröses Material vorzudringen.

Eine Behandlung, die die Steinoberfläche wasserabweisend macht, darf gleichzeitig die Fähigkeit des Steines zu „schwitzen“, also Feuchtigkeit nach Außen abzuleiten, nicht negativ beeinflussen. Um das zu testen, wurde der Feuchtedurchgang von unbeschichteten Steinproben mit dem von DewA- und HFBI-beschichteten Steinen verglichen. Dabei lagen die Ergebnisse der unbehandelten Steine im Rahmen der Literaturwerte, was einen einwandfreien Versuchsaufbau bestätigt (Li *et al.*, 2013; Gherardi *et al.*, 2018). Die Werte für den Feuchtedurchgang der beschichteten Steine unterschied sich nicht signifikant von den Werten der naturbelassenen Steinproben. Eine luft- und wasserdampfdichte Beschichtung der Steinblöcke könnte an den Gebäuden zu einer Ansammlung von Feuchtigkeit unterhalb der behandelten Steinschicht führen und damit zu weiteren Schäden am Baumaterial. Eine solche Einschränkung des Feuchtedurchgangs ist bei den früher und aktuell verwendeten

Schutzmitteln weit verbreitet und reicht von 10% - 12% bei Rhodorsil (Siloxane in Testbenzin) (Manoudis *et al.*, 2009) bis hin zu 95% für Acrylharze (Vicini *et al.*, 2005).

Eine weitere Anforderung an die Schutzmittel ist die Möglichkeit, sie wieder restlos von der behandelten Fläche entfernen zu können, wie es in der Charta der Steinrestauratoren niedergeschrieben wurde (Ministero della Pubblica Istruzione, 1972; De Naeyer *et al.*, 2000). Da es sich bei den Hydrophobinen um Proteine natürlicher Herkunft handelt, wurde deren Stabilität gegenüber Detergenzien (SDS) und Alkohol (EtOH) überprüft, den Bestandteilen klassischer Reinigungsmittel. Die Beschichtungen mit DewA und HFBI konnten mit SDS und, nach längerer Inkubation, auch mit EtOH von den behandelten Steinen entfernt werden. Schlussendlich wurde auch die Langzeitstabilität der Hydrophobinbeschichtung unter natürlichen Bedingungen untersucht. Die frisch mit DewA beschichteten Steinproben wurden am Kölner Dom und in Grünwettersbach für drei Monate exponiert und verloren in dieser Zeit rund 26% ihrer Hydrophobizität.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass Hydrophobine in der Lage sind, an unterschiedlichen Lithotypen zu binden und tiefer in Sand- und Kalkstein einzudringen, als die auf dem Markt befindlichen Produkte zum Schutz und zur Konsolidierung von steinernen Gebäuden. Auch wenn Hydrophobine aufgrund ihrer nicht ausreichenden Hydrophobierung und Langlebigkeit als alleiniges Schutzmittel für Steine eher nicht in Frage kommen, ist ihr Einsatz in der Denkmalpflege dennoch denkbar. Ein mögliches Szenario ist der Einsatz der Hydrophobine zusammen mit einem Konsolidierungsmittel oder als Vorbehandlung für die in einem zweiten Schritt folgende Konsolidierung, um die Eindringtiefe des Verfestigungsmittels zu erhöhen. Außerdem ist die zusätzliche Funktionalisierung der Hydrophobine durch die Fusion von Peptiden möglich. Denkbar wäre zum Beispiel eine Gruppe von kleinen Peptiden, die das Auspolymerisieren von Diammonium-hydrogenphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) bei Vorhandensein von Calcium zu Hydroxyapatit verbessern (Melcher *et al.*, 2016). $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ wird als wässrige Lösung auf beschädigte Steine gegeben und reagiert mit dem vorhandenen Calcit zu Hydroxyapatit, was der Verfestigung der Bausubstanz dient (Naidu *et al.*, 2011; Sassoni *et al.*, 2011; Sassoni *et al.*, 2013). Auch die Fusion von antimikrobiellen Peptiden an die Hydrophobine wäre denkbar, um das Wachstum von Mikroorganismen auf der Steinoberfläche zu verringern. Ein gegen grampositive Bakterien wirksames AMP-Hydrophobin Fusionsprotein konnte bereits hergestellt werden (Wang *et al.*, 2017).

Kapitel 3: Fusion von antimikrobiellen Peptiden an Hydrophobine

Der Bewuchs durch Mikroorganismen und die Entstehung von Biofilmen ist nicht nur im Denkmalschutz, sondern auch in der Industrie und der Medizin ein Problem. Die angelagerten Mikroorganismen greifen die Oberflächen an, verstopfen Rohrsysteme und können schädlich für die Gesundheit sein (Characklis & Marshall, 1990; Herrera *et al.*, 2004; Nuhoglu *et al.*, 2006; Le Bret *et al.*, 2009). Die effektivste Strategie, um Biofilme zu vermeiden, ist es, die initiale, reversible Ansiedlung der Bakterien zu verhindern (Sauer *et al.*, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Ausgebildete Biofilme zeigen eine starke Resistenz gegen UV-Strahlung, Schwermetalle, Säuren und Antibiotika (Espeland & Wetzels, 2001; Mah & O'Toole, 2001; Stewart & Costerton, 2001; Gilbert *et al.*, 2002). Um die initiale Anheftung von Bakterien zu verhindern, gerieten Hydrophobine in den Fokus der Forschung. Sie sind in der Lage, hydrophile Oberflächen in wasserabweisende zu verwandeln und erschweren so möglicherweise die Anlagerung von Bakterien. Die Beschichtung von Glas mit den DewA-Fusionsproteinen H*A und H*B der BASF SE hatte jedoch keinen Einfluss auf die bakterielle Besiedlung der Oberflächen (Rieder *et al.*, 2011; Rieder 2012). Um Hydrophobinen einen antimikrobiellen Charakter zu verschaffen, wurde die Fusion von AMPs an die amphiphilen Proteine untersucht.

Die Expression der AMP-Hydrophobin Fusionsproteine fand in *E. coli* statt. Da sich in vorherigen Studien herausgestellt hatte, dass die Expression von AMPs zum Absterben von *E. coli* führt (Gutt, 2013), wurde N-terminal an das AMP eine Schutzkappe fusioniert, um die antimikrobielle Funktion der AMPs zu maskieren. Nach der Aufreinigung der Fusionsproteine aus den Einschlusskörperchen konnte die Schutzkappe erfolgreich mit einem Enterokinase-Verdau entfernt werden. Die 17 hergestellten AMP-Hydrophobin Fusionsproteine zeigten im Hemmhoftest jedoch keine antibakterielle oder fungizide Wirkung. Auch den Glasoberflächen, die mit den Proteinen beschichtet wurden, konnte keine bakterizide Wirkung nachgewiesen werden. Die Gründe hierfür könnten nicht korrekt gefaltete Proteine nach der Aufreinigung aus den Einschlusskörperchen (Quaas *et al.*, 2018), unvorteilhafte Aminosäurereste nach der Behandlung mit der Enterokinase (Shahravan *et al.*, 2008) oder die sterische Behinderung der AMPs durch das fusionierte Hydrophobin sein. Trotz ihrer Nachteile ist die Bildung von Einschlusskörperchen und die anschließende Proteinaufreinigung die präferierte Methode zur heterologen Herstellung von für den

Expressionsorganismus toxischen Proteinen (Rudolph & Lilie, 1996). Nach der Aufreinigung sind jedoch oft renaturierende Schritte notwendig, um bioaktive Proteine zu gewinnen (Singh & Panda, 2005; Rosano & Ceccarelli, 2014). Doch auch das cytoplasmatisch in *E. coli* exprimierte und nativ aufgereinigte Fusionsprotein PA-1_DewA besaß keine hemmende Wirkung auf das Bakterienwachstum, weder im Hemmhoftest noch bei der Lebend-Tot-Mikroskopie. Ein negativer Einfluss des Hydrophobins auf die antibakterielle Wirkung des AMPs ist jedoch zumindest für das PA-1 auszuschließen, da es bereits eine antibakterielle Wirkung als Fusionsprotein mit HGFI zeigte (Wang *et al.*, 2017). Nach der Expression und Aufreinigung von PA-1_DewA aus *S. cerevisiae* konnte eine Hemmung des Bakterienwachstums in der Lebend-Tot-Mikroskopie, nicht aber im Hemmhoftest, beobachtet werden. Dies ist vermutlich durch eine zu geringe PA-1_DewA Konzentration in der im Hemmhoftest eingesetzten Proteinlösung zu erklären. Diese spielt bei der Beschichtung von Oberflächen nur eine geringe Rolle, da bereits geringe Hydrophobinmengen (50 – 100 µg/ml) eine flächendeckende Beschichtung ermöglichen. Das Fusionsprotein zeigte nur eine Wirkung gegen die grampositiven Bakterien *S. epidermidis* und *M. luteus*, nicht aber gegen gramnegative Bakterien. Dies entspricht den Ergebnissen vorheriger Studien mit dem AMP PA-1 (Le Blay *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). Warum das in Hefe exprimierte Fusionsprotein, im Gegensatz zu dem bakteriell exprimierten Protein, eine antibakterielle Wirkung hatte, könnte verschiedene Ursachen haben. Das AMP PA-1 besitzt N-terminal zwei antiparallele β -Faltblätter und C-terminal eine α -Helix, die in Hefe möglicherweise besser ausgebildet werden können als in *E. coli* (Bédard *et al.*, 2018). Zusätzlich bietet die heterologe Proteinexpression in Hefe den Vorteil der post-translationalen Modifikation, welche für viele bioaktive Proteine wie auch PA-1 notwendig ist (Mesa-Pereira *et al.*, 2017). Dass der Expressionsorganismus auch bei nicht-modifizierten Proteinen einen Einfluss auf die biochemischen Eigenschaften hat, wurde für die Hydrophobine HFB4 und HFB7 gezeigt (Przylucka *et al.*, 2017). Diese zeigten je nach Organismus, aus dem sie aufgereinigt wurden, unterschiedliche Oberflächenbindungseigenschaften. Eine ebenfalls positive Auswirkung auf die antibakterielle Wirkung von PA-1_DewA könnte der Wegfall der Schutzkappe und der damit nicht mehr notwendige Enterokinase-Verdau sein. Das Weglassen der Kappe ist jedoch nur praktikierbar, wenn das exprimierte AMP keine tödliche Wirkung auf den Expressionsorganismus hat. Wird eine Schutzkappe gebraucht, wäre eine Alternative zu der

Enterokinase-basierten Abspaltung dieser die Verwendung der zuverlässigeren TEV-Protease (Terpe, 2003) oder der Einsatz selbstabspaltender Peptide wie die N^{Pro} Variante EDDIE. Das Peptid spaltet sich nach der korrekten Faltung selbstständig ab und hinterlässt im Gegensatz zu den enzymatischen Abspaltungen authentische N-Termini ohne störende Aminosäurenreste (Achmüller *et al.*, 2007).

Weiterführende Studien sind notwendig, um, ausgehend von den ersten wirksamen AMP-Hydrophobin Fusionsproteinen, eine breite Palette an antibakteriellen oder fungiziden Oberflächen zu schaffen. Dabei kann man aus einer riesigen Auswahl an unterschiedlichen AMPs schöpfen, doch die richtige Kombination aus antimikrobiellem Peptid, Hydrophobin, dem Expressionsorganismus und der Aufreinigung der Proteine ist entscheidend. Die Möglichkeit der heterologen Expression in *E. coli*, mit Zuhilfenahme der Schutzkappe, oder in *S. cerevisiae* ermöglicht jedoch die günstige Herstellung unterschiedlichster Fusionsproteine, die anschließend auf ihre antimikrobielle Wirkung hin untersucht werden können.

V Material und Methoden

1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, stammen die verwendeten Chemikalien und Kits von den Firmen *AppliChem* (Darmstadt), *Invitrogen* (Karlsruhe), *Macherey-Nagel* (Düren), *Nippon Genetics - Europe* (Düren), *Roth* (Karlsruhe) und *Sigma-Aldrich* (Hamburg).

Restriktionsenzyme stammen von *New England Biolabs* (Frankfurt).

2 Verwendete Lithotypen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Lithotypen verwendet: Obernkirchen Sandstein, Balegem Kalkstein und Carrara Marmor. Der Obernkirchen ist ein feinkörniger, kleinporiger Sandstein aus Niedersachsen und setzt sich hauptsächlich aus Quarz (SiO_2 ; 94%), Kaolinit und Feldspat zusammen. Die durchschnittliche Porengröße beträgt $0,8 \mu\text{m}$ bei einer offenen Porosität von 24,1%. Der Balegem Kalkstein stammt aus der Region um Gent (Belgien) und ist ein sehr kompakter Stein mit einigen mehrere Millimeter großen Hohlräumen. Hauptsächlich besteht er aus klastischem Arenit (43,3% SiO_2 ; 1,4% Al_2O_3 und 0,9% FeO_2) in einem Zement aus Sparit (Ca-/MgCO_3 ; 53,3%). Trotz der häufig auftretenden, größeren Hohlräume besitzt der Stein eine offene Porosität von 9,9% und eine mittlere Porengröße von $0,28 \mu\text{m}$. Der Carrara Marmor stammt aus der Gegend um Carrara in der Toskana (Italien) und besteht zu 99,6% aus CaCO_3 . Er ist ein strukturell sehr kompakter Stein mit einem Porendurchmesser von $0,08 \mu\text{m}$ und einer Porosität von nur 0,7% (Roveri *et al.*, 2018). Die Steinproben wurden von der Dombauhütte Köln (Obernkirchen Sandstein), vom Architektenbüro Bressers aus Gent (Balegem Kalkstein) und der *Opera della Primaziale Pisana OPÆ* (Carrara Marmor) bezogen. Durchgeführt wurden die Experimente, wenn nicht anders angegeben, mit Steinplättchen der Größe $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ (Abb. 47).



Abbildung 48: Verwendete Lithotypen

Aufnahmen der 5 cm x 5 cm x 1 cm Steinplättchen der Lithotypen Obernkirchen Sandstein (links), Balegem Kalkstein (Mitte) und Carrara Marmor (rechts).

3 Verwendete Organismen

In dieser Arbeit wurden folgende bakterielle und pilzliche Stämme verwendet.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Organismus	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>		
Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galk</i> , <i>rpsL(Str^R)</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Shuffle [®] T7	F', <i>lac</i> , <i>pro</i> , <i>lacI^q</i> / $\Delta(ara-leu)7697$, <i>araD139</i> , <i>fhuA2</i> , <i>lacZ::T7 gene1</i> $\Delta(phoA)Pvull$, <i>phoR</i> , <i>ahpC*</i> , <i>galE (or U)</i> , <i>galk</i> , $\lambda att::pNEB3-r1-cDsbC$ (Spec ^R , <i>lacI^q</i>), $\Delta trxB$, <i>rpsL150(Str^R)</i> , Δgor , $\Delta(malF)3$	New England Biolabs (Frankfurt)
<i>Serratia marcescens</i>		
DSM-30121	Wildtyp	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Pseudomonas putida</i>		
DSM-12735	Wildtyp	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Micrococcus luteus</i>		
DSM-20030	Wildtyp	Leibniz-Institut DSMZ

<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
DSM-20044	Wildtyp	Leibniz-Institut DSMZ
<i>Aspergillus nidulans</i>		
FGSC A4	Glasgow wildtype, <i>veA+</i>	Fungal Genetics Stock Center
GR5	<i>pyrG89, wA3; pyroA4; veA1</i>	Waring <i>et al.</i> , 1989
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
BY4741	MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0	Brachmann <i>et al.</i> , 1998

4 Kultivierung der Organismen

Die verwendeten Medien wurden für 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,45 μ m Porengröße). Glaswaren wurden bei 180 °C für drei Stunden im Hitzesterilisator gebacken.

4.1 Kultivierung der Bakterienstämme

Für Klonierungen und das Anlegen von Glycerinstocks wurde der Stamm *E. coli* TOP10 verwendet. Dieser wurde in LB-Medium (Bertani, 1951) mit entsprechenden Antibiotika aerob bei 37 °C kultiviert. Die Proteinexpression erfolgte in SHuffle® T7 *E. coli* in EC3 Medium bei 37 °C. *S. marcescens*, *P. putida*, *M. luteus* und *S. epidermidis* wurden in TSB-YE bei 28 °C inkubiert. Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte im Schüttelinkubator bei 180 rpm. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Medium eingewogen.

Tabelle 4: Nährmedien zur Kultivierung der Bakterienstämme

Medium	Zusammensetzung (1 L)
Lysogeny Broth (LB)	20 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 10 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 Trypton; 15 g Hefeextrakt; 30 g Glycerin; 2 g KH_2PO_4 ; 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 1 ml SL4 Spurenelemente; pH 7,0
Tryptic Soy Broth - YE (TSB-YE)	17 g Trypton; 3 g Phyton (Soja-Pepton); 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 2,5 g K_2HPO_4 ; 2,5 g Glukose pH 7,5
SL4 Spurenelemente (1000x)	500 mg $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ (EDTA); 200 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 10 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 3 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$; 30 mg H_3BO_3 , 20 mg $\text{CoCl} \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{CuCl} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 2 mg $\text{NiCl} \times 6 \text{ H}_2\text{O}$; 3 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Kanamycin	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

4.2 Kultivierung von *A. nidulans*

Die Kultivierung von *A. nidulans* erfolgte auf oder in Minimalmedium (MM). Das Medium wurde mit entsprechenden Auxotrophiemarkern versetzt. Für Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter Medium eingewogen. Flüssigkulturen wurden für zwei Tage bei 37 °C und 180 rpm angezogen.

Tabelle 6: Medien für *A. nidulans*

Medium	Zusammensetzung (1 L)
Minimalmedium (MM)	50 ml Salz-Stammlösung; 1 ml Spurenelementlösung; 2% Glukose; pH 6,5
Spurenelementlösung (1000x)	22 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 11 g H_3BO_3 ; 5 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$; 5 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 1,6 g $\text{CoCl}_2 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$; 1,6 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$; 1,1 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$; 50 g Na_4EDTA ; pH 6,5 (mit KOH einstellen)
Salz-Stammlösung	120 g NaNO_3 ; 10,4 g KCl; 10,4 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 30,4 g KH_2PO_4

Tabelle 7: Auxotrophiemarker für *A. nidulans*

Auxotrophiemarker	Menge pro 1 l Medium
Uracil	1 g
Uridin	1 g
Pyridoxin	1 mg

4.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung der transformierten *S. cerevisiae* Stämme erfolgte aerob bei 30 °C auf oder in synthetischem Komplexmedium, welchem die Nukleinbase Uracil fehlt (SC-ura). Der Ursprungsstamm BY4741 wurde auf YPD-Komplettmedium kultiviert. Für Festmedien wurden 20 g Agar pro Liter Medium eingewogen.

Tabelle 8: Medien für *S. cerevisiae*

Medium	Zusammensetzung (1 L)
SC-ura	20 g Glukose; 34 g <i>Yeast Nitrogen Base</i> (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren); 2 g <i>Yeast Synthetic Drop-Out</i> ohne Uracil; pH 6,5
YPD	10 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 20 g Glukose; pH 6,5

5 Molekularbiologische Methoden

5.1 Präparation von *A. nidulans* RNA und cDNA

Für die Isolation der RNA aus *A. nidulans* wurde der Stamm GR5 in 10 ml Minimalmedium angeimpft und bei 37 °C stehend für 24 h inkubiert. Die entstandene Kahmhaut wurde abgenommen, zwischen sterilem *Mira cloth* (*Calbiochem*; Heidelberg) und Papiertüchern trocken gepresst und in flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Das so gewonnene Pilzmaterial wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die RNA wurde mit dem *E.Z.N.A. Fungal RNA Mini Kit* (*OMEGA bio tec*; Norcross, Georgia, USA) nach leicht verändertem Protokoll gewonnen. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Maximal 100 mg gemörsertes Myzel wurde mit 500 µl *RB Buffer* gevortext und für drei

Minuten bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde auf die im Kit beiliegende, grüne Homogenisierungssäule gegeben und anschließend fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand des Durchflusses wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl 100% EtOH gemischt. Diese Suspension wurde auf eine beiliegende, orangene Bindsäule gegeben und 30 Sekunden bei 13.000 zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend einmal mit 500 µl *RNA Wash Buffer I* und zweimal mit 700 µl *RNA Wash Buffer II* gewaschen (30 Sekunden bei 13.000 rpm). Anschließend wurde die Säule eine Minute leer zentrifugiert, um restliche Minimalmengen an Puffer zu entfernen. Die Säule wurde auf ein DNase- und RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die RNA mit 50 µl DEPC Wasser bei 13.000 rpm eluiert und bei -80 °C gelagert. Bevor cDNA aus der RNA gewonnen werden konnte, wurde diese einem DNA-Verdau mit Hilfe des *Ambion TURBO DNA-free™* Kits (*Life Technologies GmbH*; Darmstadt) unterzogen. Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *SuperScript® III First-Strand Synthesis System* (*Life Technologies GmbH*; Darmstadt). Die so gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.2 Klonierung von PCR-Produkten und *Site-directed Mutagenesis*

Die PCRs wurden mit der Polymerase Q5 (*New England Biolabs*, Frankfurt) in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, wobei die dNTP-Endkonzentration bei 200 µM und die Primer-Endkonzentration bei 0,4 pM lag. Die benutzten PCR-Programme richteten sich nach der jeweiligen Größe des zu amplifizierenden PCR-Produkts und der *Annealing temperature* der Primer (55 °C - 65 °C). Die DNA-Probe wurde bei 98 °C denaturiert, die Elongation erfolgte bei 72 °C für 30 sek/kb. Die PCR-Produkte wurden, je nach Größe, auf ein 1%- oder 2%-iges Agarosegel aufgetragen und in 0,5x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1mM EDTA) durch Elektrophorese aufgetrennt. Durch den dem Agarosegel zugefügten Farbstoff *Midori Green Advance* (*Nippon Genetics*, Düren) wurde die DNA unter blaugrünem Licht sichtbar. Als DNA-Größenstandarts dienten hierbei die 100 bp oder die 1 kb DNA-Ladder (*New England Biolabs*, Frankfurt). Die gewünschten PCR-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und die DNA mit dem *FastGene Gel Extraction Kit* (*Nippon Genetics*, Düren) aufgereinigt. Die anschließenden Restriktionen wurden in einem Volumen von 25 µl und bei 37 °C durchgeführt. Die Ansätze entsprachen in ihrer Zusammensetzung den Angaben des Herstellers. Grundsätzlich wurden pro Ansatz 0,25 µl -

0,5 µl je Restriktionsenzym eingesetzt. Die geschnittenen PCR-Produkte und Zielvektoren wurden in einem 20 µl Ansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C mit der T4-Ligase (*New England Biolabs*, Frankfurt) ligiert.

Um kleine Veränderungen an der DNA-Sequenz in bereits hergestellten Plasmiden zu erzeugen, wurde eine an das *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* von *Agilent* (Santa Clara, USA) angelehnte Methode benutzt (Abb. 48). Es wurden 30 bp große Primer erstellt, die in der Mitte die gewünschte Mutation enthielten. Mit der *Phusion® High Fidelity* DNA Polymerase (*New England Biolabs*, Frankfurt) wurde eine PCR auf das zu verändernde Plasmid durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend einer Restriktion mit *DpnI* unterzogen, wodurch die methylierte Ursprungs-DNA geschnitten wurde und das neu synthetisierte Plasmid, welches die gewollte Mutation trug, übrigblieb. Der Ansatz wurde anschließend in *E. coli* transformiert, das Plasmid aufgereinigt und zum Sequenzieren an die Firma *Eurofins Genomics* (Ebersberg) geschickt, um die eingefügte Mutation zu bestätigen.

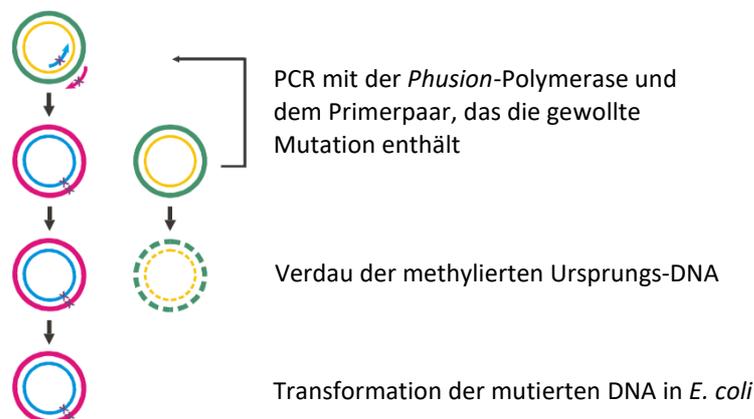


Abbildung 49: Schematische Darstellung der *Site-Directed Mutagenesis*

Durch spezielle Primer, welche die gewünschte Mutation in ihrer Mitte enthalten, werden per PCR die Veränderungen in die neu synthetisierte Plasmid-DNA eingebracht. Durch eine *DpnI*-Restriktion wird die methylierte Ursprungs-DNA geschnitten und das mutierte Plasmid wird in *E. coli* transformiert (verändert nach: Instruction Manual *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis KIT*, *Agilent*, Santa Clara, USA).

Tabelle 9: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, der C-terminale 6-fach His-Tag an den Hydrophobinen ist kursiv geschrieben.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
DewA fw	ATGCATGCGCTTCATCGTCTC
DewA re	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCCTCAGCCTTGGTACCAG
DewC fw	ATGCATGCAATTCACAATCGC
DewC re	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCGAGAACCTGGACAGGA AC
DewD fw	ATGCATGCATCTTTCCACCTCC
DewD re	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCCTTGTCAACGCCATCAC
DewE fw	ATGCATGCTTATGAAGGTCGCCACTGC
DewE re	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCGTGGCCGTGCTCCAG
HFBI fw	ATGCATGCAGCCGTTAGAAGATC
HFBI re	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCTGCGCCACGGC
pelB fw Duplex	AACCATGGATGAAATCGTTCATCGCGCCGATCGCTGCGGGCCTGCTGCTG GCCCTGTCTCAGCCGCTGCTGGCTGGCATGCAA
pelB re Duplex	TTGCATGCCAGCCAGCAGCGGCTGAGACAGGGCCAGCAGCAGGCCCGC AGCGATCGGCGCGATGAACGATTTTCATCCATGGTT
pelB Test fw	CGTTCATCGCGCCGATCGC
pET28a ΔNcol QC1	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGAAATCGTTCATCGCGCC
pET28a ΔNcol QC2	GGCGCGATGAACGATTTTCATGGTATATCTCCTTCTTAAAG
pBASf2 Seq fw	GCCACGATGCGTCCGGC
pBASf2 Seq re	CTGGATCTATCAACAGGAGTC
pET28a Seq fw	GGAATTGTGAGCGGATAAC
pET28 Seq re	GCAGCCAACCTCAGCTTC
Tet021 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAAAAGAAATGGAAGATCGTAGTCATCAA GTGGAAGAAGGGCGGGGGATCCAT
Tet021 re	ATGGATCCCCCGCCCTTCTCCACTTGATGACTACGATCTCCATTTCTTTT TATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Tet022 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAAAAGAAAGTGAAGATCGTTGTGATTCG GTGGAGACGTGGCGGGGGATCCAT

Tet022 re	ATGGATCCCCGCCACGTCTCCACCGAATCACAACGATCTTCCACTTCTTT TTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Tet023 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAAAGACGGTGGAAAGATTGTGGTTATTCG CTGGAAAAGGGCGGGGGATCCAT
Tet023 re	ATGGATCCCCCGCCCTTTTCCAGCGAATAACCACAATCTTCCACCGTCTT TTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Tet024 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAACGTCGCAGATGGATCGTGGTAATATG GCGTCGGCGCGGGCGGGGATCCAT
Tet024 re	ATGGATCCCCCGCCGCGCCGACGCCATATTACCACGATCCATCTGCGACG TTTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Tet032 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAACGGAGATGGAGACGGTGGTGGCGTA GATGGCGCAGAGGGCGGGGATCCAT
Tet032 re	ATGGATCCCCCGCCTCTGCGCCATCTACGCCACCACCGTCTCCATCTCCGT TTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Tet033 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAACGGCGGAGATGGTGGTGGCGTCGCT GGTGGAGACGGGGCGGGGATCCAT
Tet033 re	ATGGATCCCCCGCCCGTCTCCACCAGCGACGCCACCACCATCTCCGCCG TTTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Tet091 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAATTCCTGCCTAAAAAATTCGCTGGTGG AAGTATAGAAAGGGCGGGGATCCAT
Tet091 re	ATGGATCCCCCGCCCTTCTATACTTCCACCAGCGAAATTTTTAGGCAGG AATTTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Tet112 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAAAAGTGGAAAGTGGTGGAAATGGAAGA AGGGCGGGGGATCCAT
Tet112 re	ATGGATCCCCCGCCCTTCTCCATTTCCACCACTTCCACTTTTTATCGTCAT CGTCCTGCAGAT
Tet127 fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAAAAACGCTGGTGGAAAGTGGTGGCGTC GGGGCGGGGGATCCAT
Tet127 re	ATGGATCCCCCGCCCGACGCCACCACTTCCACCAGCGTTTTTTATCGTCA TCGTCTGCAGAT
Protonectin fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAAATTCCTGGGCACGATCCTTGGTTTATTA AAAGGGTTAGGGCGGGGATCCAT

Protonectin re	ATGGATCCCCCGCCTAACCCCTTTTAATAAACCAAGGATCGTGCCCAGAAT TTTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Bactenectin fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAACGTCTGTGCCGTATTGTTGTTATCCGC GTCTGTCGTGGCGGGGGATCCAT
Bactenectin re	ATGGATCCCCCGCCACGACAGACGCGGATAACAACAATACGGCACAGAC GTTTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
Thanatin fw	ATCTGCAGGACGATGACGATAAAGGGAGCAAAAAGCCGGTTCGATCAT CTACTGCAATCGCCGTACAGGCAAATGCCAACGTATGGGCGGGGGATCC AT
Thanatin re	ATGGATCCCCCGCCCATACGTTGGCATTTCCTGTACGGCGATTGCAGTA GATGATCGGAACCGGCTTTTTGCTCCCTTATCGTCATCGTCCTGCAGAT
PA-1_DewA pSP-G1 f	TAGCGGCCGCATGAAATATTATGGAAACGGAG
PA-1_DewA pSP-G1 r	GATTAATTAACCTTAATGGTGATGATGATGG
PA-1_HGFI pSP-G1 fw	TAGCGGCCGCATGAAGTATTACGGCAACGG
PA-1_HGFI pSP-G1 re	GATTAATTAACCTTAGTGATGGTGGTGGTG

5.3 Insertion von Peptiden via *Primerligation*

Die für die antimikrobiellen Peptide (AMPs) sowie für die *pelB-leader sequence* kodierenden DNA-Fragmente wurden per *Primerligation* hergestellt. Hierzu wurden zwei *Primer* entworfen, welche komplementär zueinander waren und sowohl die DNA-Sequenz des zu klonierenden Peptids als auch Restriktionsschnittstellen an den Enden tragen. Die Oligonukleotide wurden in *Duplex*-Puffer (10 mM Tris-HCl; 100 mM KH₂PO₄; pH 7,5) gelöst und äquimolar gemischt. Das *Primer*-Gemisch wurde im Heizblock für zwei Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend das Gerät ausgeschaltet, sodass sich das Gemisch langsam auf Raumtemperatur abkühlen und sich die einzelsträngigen Oligonukleotide zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment anlagern konnten. Die so gewonnene DNA wurde per Restriktion in die entsprechenden Vektoren kloniert oder bei -20 °C gelagert.

DNA-Sequenzen von Peptiden, welche zu groß für die *Primerligation* waren (>30 bp), wurden als *Geneblock* bei *Integrated DNA Technologies* (Leuven, Belgien) bestellt und in den pJET1.2 Vektor (*Thermo Fischer Scientific*, Waltham, USA) zwischenkloniert.

5.4 Transformation und Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Ligationsprodukte sowie durch *site-directed Mutagenesis* gewonnene Plasmide wurden zur Vervielfältigung und anschließender Aufreinigung in *E. coli* (*TOP10*) transformiert. Hierzu wurden 50 µl chemisch kompetenter *TOP10* mit der Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 60 Sekunden. Dieser Ansatz wurde mit 250 µl SOC versetzt und eine Stunde bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Der Ansatz wurde auf Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 2 ml der Kultur wurden in einem Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet in 200 µl Zell-Suspensionspuffer gelöst. Anschließend wurden 200 µl Zell-Lysepuffer zugegeben und das Gemisch invertiert. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Proteinfällung durch die Zugabe von 200 µl Kalium-Acetat Lösung und einer Lagerung von zehn Minuten auf Eis. Nach einem Zentrifugationsschritt von fünf Minuten bei 13.000 rpm wurde der klare Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 600 µl 100% Isopropanol vorlagen. Das Gemisch wurde für zehn Minuten auf Eis gelagert und die Plasmid-DNA anschließend für zehn Minuten bei 13.000 rpm in einer vorgekühlten Zentrifuge pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl kaltem 70% Ethanol überschichtet und erneut zentrifugiert. Nach dem Trocknen bei 68 °C wurde die Plasmid-DNA in 50 µl TE resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 10: Lösungen zur Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Lösung	Zusammensetzung
Zell-Suspension	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,01% RNase
Zell-Lyse	0,2 M NaOH; 1% SDS
Kalium-Acetat	1,5 M KAc pH 4,8
TE	10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0

Tabelle 11: Liste der verwendeten Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
pBASF2	YaaD_DewA_6xHis unter T5/lacO	Wohlleben <i>et al.</i> , 2010
pET28a	Vektor zur Proteinexpression in <i>E. coli</i> unter T7/lacO	Novagen, Darmstadt
pSP-G1	Vektor zur Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>	Partow <i>et al.</i> , 2010
pLW31	YaaD_DewC_6xHis in pBASF2	diese Arbeit
pLW32	YaaD_DewD_6xHis in pBASF2	diese Arbeit
pLW33	YaaD_DewE_6xHis in pBASF2	diese Arbeit
pLW34	YaaD_HFBI_6xHis in pBASF2	diese Arbeit
pLW36	YaaD_EK_Ginkbilobin_DewA_6xHis in pBASF2	diese Arbeit
pLW37	YaaD_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW38	YaaD_DewC_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW39	YaaD_DewD_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW40	YaaD_DewE_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW41	YaaD_HFBI_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW43	YaaD_EK_Ginkbilobin_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW58	pelB_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW59	pelB_DewC_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW60	pelB_DewD_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW61	pelB_DewE_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW62	pelB_HFBI_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW63	pelB_3xHA_Gink_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW64	Δ NcoI vor pelB in pLW58	diese Arbeit
pLW65	Δ NcoI vor pelB in pLW59	diese Arbeit
pLW66	Δ NcoI vor pelB in pLW60	diese Arbeit
pLW67	Δ NcoI vor pelB in pLW61	diese Arbeit
pLW68	Δ NcoI vor pelB in pLW62	diese Arbeit
pLW72	YaaD_EK_Tet21_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit

pLW73	YaaD_EK_Tet22_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW74	YaaD_EK_Tet23_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW75	YaaD_EK_Tet24_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW76	YaaD_EK_Tet32_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW77	YaaD_EK_Tet33_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW78	YaaD_EK_Tet91_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW79	YaaD_EK_Tet112_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW80	YaaD_EK_Tet127_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW81	pelB_3xHA_BMAP28_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW82	pelB_3xHA_Protonectin_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW83	pelB_3xHA_Bactenectin_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW84	pelB_3xHA_Thanatin_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW85	pelB_3xHA_AFP_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW86	pelB_3xHA_PA-1_DewA_6xHis in pET28a	diese Arbeit
pLW87	Δ pelB_3xHA in pLW86	diese Arbeit
pLW97	PA-1_DewA_6xHis in pSP-G1	diese Arbeit
pLW98	PA-1_HGFI_6xHis in pSP-G1	diese Arbeit

5.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* (BY4741) erfolge per Hitzeschock. Dazu wurden 50 ml YPD mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und für vier Stunden bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde bei 5.000 rpm geerntet, in 1 ml dH₂O resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde anschließend weitere zweimal mit dH₂O und dreimal mit 0,1 mM LiAc gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen auf drei Reaktionsgefäße verteilt und mit 240 µl 50% PEG 3500, 36 µl 1 M LiAc, 20 µl Lachs-Sperma DNA (10 mg/ml) und 1 µg Plasmid gemischt. Das Gemisch wurde für 30

Sekunden gevortext und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 20 Minuten, wobei der Ansatz zwischenzeitlich mehrere Male gevortext wurde. Danach wurden die Zellen einmal mit 1 ml dH₂O gewaschen, in 300 µl dH₂O resuspendiert und auf drei SC-ura Platten ausplattiert. Nach drei Tagen konnten einzelne Kolonien auf neue SC-ura Platten gepickt werden.

6 Biochemische Methoden

6.1 Aufreinigung der Hydrophobine aus *E. coli*

Für die Expression der rekombinanten Hydrophobine wurden chemisch kompetente SHuffle® T7 *E. coli* frisch mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. 50 ml LB wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurden 500 ml EC3 in einem 2l-Schikanekolben auf eine optische Dichte von 0,05 (OD₆₀₀) mit dieser Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 wachsen gelassen. Die Proteinexpression unter dem T7 Promotor erfolgt durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid). Die induzierte Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde für zehn Minuten bei 5.000 rpm geerntet und das Pellet in 25 ml 20 mM Natrium-Phosphat Puffer pH 7,5 resuspendiert. Die Proteinaufreinigung erfolgte durch Abtrennen und Auflösen der Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies; IB*), welche die Hydrophobine enthalten. Dazu erfolgte der Zellaufschluss an der *French Pressure Cell Press* (AMINCO, Maryland, USA) bei einem Druck von 1.500 psi (*pound-force per square inch* = Pfund pro Quadratzoll), was ungefähr 103 bar entspricht. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 5.000 rpm und 4 °C für 30 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet ein weiteres Mal in Natrium-Phosphat Puffer und anschließend zweimal in ddH₂O gewaschen, um die IBs von einem Großteil der Zelltrümmer und von löslichen Proteinen zu trennen. Das übrig gebliebene Pellet wurde in 10 ml ddH₂O gelöst und die Einschlusskörperchen durch die Zugabe von 25% NaOH bis zu einer Endkonzentration von 100 mM gelöst. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei 4 °C, welche rollend erfolgte, wurde 20% H₃PO₄ zugegeben, bis ein pH-Wert von 8,0 - 8,5 erreicht war. Die so aus den Einschlusskörperchen gelösten Hydrophobine wurden in einem letzten Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für zehn Minuten von den unlöslichen Fragmenten

getrennt. Der das Hydrophobin enthaltende Überstand wurde entweder sofort zur Oberflächenbeschichtung benutzt, für kurze Zeit bei -20 °C gelagert oder bei -40 °C und 0,120 mbar für 48 Stunden gefriergetrocknet.

6.2 Aufreinigung der Hydrophobine aus *S. cerevisiae*

Für die Aufreinigung der Hydrophobin-Fusionsproteine aus Hefe wurden positiv transformierte BY4741 Einzelkolonien in 250 ml SC-ura angeimpft und für drei Tage bei 30 °C und 180 rpm im 1l-Schikanekolben inkubiert. Die Kultur wurde bei 5.000 rpm für zehn Minuten geerntet und einmal mit dH₂O gewaschen, bevor es in B+ Aufschlusspuffer resuspendiert wurde. Der Zellaufschluss erfolgte an der *French Pressure Cell Press* (AMINCO, Maryland, USA) bei einem Druck von 1.500 psi, wobei die Zellen den Prozess fünfmal durchlaufen mussten. Die Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm für 30 Minuten von der flüssigen Phase, in der sich die heterolog exprimierten Fusionsproteine befinden, getrennt. Der Überstand wurde in einen zuvor in Wasser eingeweichten Dialysierschlauch überführt (ZelluTrans Dialysiermembran T2, Roth, Karlsruhe) und über Nacht bei 4 °C gegen Hydrophobinbeschichtungspuffer dialysiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung *S. cerevisiae* Aufschlusspuffer

Lösung	Zusammensetzung
B+ Aufschlusspuffer	300 mM NaCl; 100 mM Tris; 1 mM EDTA; 10% Glycerol; 0,1% NP-40; pH 7,5

6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle Lösungen und verwendete Puffer für die SDS-PAGE, welche nicht in Tabelle 13 angegeben sind, wurden wie in *Molecular Cloning*, Appendix 8 (Sambrook & Russell, 2001) beschrieben hergestellt. Zum Anfertigen der SDS-Polyacrylamidgele und zur Gelelektrophorese wurde das *Mini PROTEAN* System von *Bio-Rad* (München) verwendet. Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proteine wurden anschließend ihrer Größe entsprechend in einem Gel mit einem 15%-igem Anteil an Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)) aufgetrennt. Als

Größenstandards dienten die *PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 to 180 kDa* und die *Pierce™ Unstained Protein MW Ladder (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)*. Die Gele wurden entweder für den Western Blot weiterverwendet oder die aufgetrennten Proteine mit der *Roti®-Blue quick Lösung (Roth, Karlsruhe)* im Gel sichtbar gemacht.

Tabelle 13: Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung	Zusammensetzung
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS
4x SDS-Ladepuffer	40% Glycerol; 8% SDS; 0,4% Bromophenolblau; 400 mM DTT; 200 mM Tris-HCl, pH 6,8

6.4 Western Blot

Die Western Blots wurden im *Wet Blot* Verfahren in der *Mini Trans Blot Cell* von *Bio-Rad* (München) durchgeführt. Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine PVDF-Membran (A. Hartenstein) oder auf eine Nitrocellulosemembran (*Amersham™ Protran® Western blotting membran 0,2 µm poresize, GE Healthcare, Little Chalfont, UK*) für zwei Stunden bei 40 V. Der erfolgreiche Proteintransfer wurde mit *Ponceau S* überprüft. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran anschließend für 30 Minuten bei 4 °C mit *Blocking-Lösung* inkubiert. Die Hybridisierung mit dem Primärantikörper (*6x-His Tag Monoclonal Antibody from mouse, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA*) erfolgte in 1% Magermilch in TBS-T über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dreimal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (*Anti-mouse IgG (Fab specific)-Peroxidase antibody, Sigma-Aldrich, Hamburg*) in 1% Magermilch in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-T für zehn Minuten fand die Immundetektion am *Chemi-Smart 5.000 (Pqlab, Erlangen)* Chemilumineszenz-detektor statt, nachdem die Membran mit der *WesternBright ECL HRP Lösung (Advansta, Menlo Park, USA)* befeuchtet wurde.

Tabelle 14: Lösungen für den Western Blot

Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	20 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,1% SDS, 20% Methanol
Ponceau S-Lösung	0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure
TBS-T	20 mM Tris-HCL; 150 mM NaCL; 0,05% Tween 20; pH 7,5
Blocking-Lösung	10% Magermilch in TBS-T

6.5 Oberflächenbeschichtung mit Hydrophobinen

Die Beschichtung von harten Oberflächen mit Hydrophobinen fand angelehnt an Rieder *et al.*, 2011 statt. Gläserne Objektträger wurden vor dem Beschichten mit 100% Isopropanol gereinigt und an der Luft trocknen gelassen. Die 5 cm x 5 cm x 1 cm großen Steinproben wurden zum Entsalzen zweimal für eine Stunde in ddH₂O gewaschen und über Nacht bei 50 °C im Hybridisierungssofen getrocknet. Das Hydrophobin wurde in Beschichtungspuffer (50 mM Tris-HCl; 5 mM CaCl₂; pH 8,0) resuspendiert, die Objektträger mit dieser Lösung überschichtet und in einer luftdichten Feuchtekammer für zwei Stunden bei 60 °C inkubiert. Die Beschichtung der Steinproben fand ebenfalls bei 60 °C im Hybridisierungssofen statt. Diese wurden 5 mm tief in Hydrophobin enthaltenden Beschichtungspuffer gelegt und ebenfalls für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden alle Proben dreimal für 15 Minuten in ddH₂O gewaschen und bei Raumtemperatur über Nacht trocknen gelassen.

6.6 Test auf Beschichtungsstabilität

Um die Stabilität der unterschiedlichen Hydrophobinbeschichtungen zu testen, wurden die Vertiefungen von Epoxy beschichteten *8-well* Objektträgern (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) mit Hydrophobin beschichtet und zur Hälfte in ddH₂O, 70% Ethanol oder 1% SDS getaucht. Nach einem, drei und sieben Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger dreimal kurz mit ddH₂O gewaschen und die Hydrophobinbeschichtung per Immunfluoreszenz am Mikroskop analysiert (siehe 7.1). Die Stabilität gegenüber UV wurde in einem UV-Crosslinker BLX-E254 (*Vilber Lourmat*, Marne-la-Vallée, Frankreich) getestet, welcher UV-C mit einer Wellenlänge von 254 nm abstrahlt. Zum Testen der Temperaturstabilität wurden beschichtete Objektträger für zwei Stunden bei 80 °C trocken

gebacken. Die Bestimmung der Stabilität der Hydrophobinbeschichtung erfolgte ausgehend von der Fluoreszenzintensität der mikroskopischen Aufnahmen. Insgesamt wurden pro Zeitpunkt und getesteter Kondition jeweils drei Regionen von sechs Bildern mit *ImageJ* ausgewertet ($n = 18$). Diese Werte wurden mit den Werten verglichen, die von den nicht eingetauchten Vertiefungen auf dem gleichen Objektträger erhalten und als 100% Intensität festgesetzt wurden. Die Daten wurden mit dem *Anderson-Darling Test* auf Normalverteilung geprüft bevor sie mit dem zweiseitigen *Students T-Test* bei gleicher Varianz und einem alpha Level von 0,01 auf Signifikanz getestet wurden.

Die Stabilität der Hydrophobinbeschichtung auf Stein wurde durch eine Inkubation von frisch beschichteten 5 cm x 5 cm x 1 cm großen Proben für drei Tage in 70% EtOH und 1% SDS untersucht. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Steinplättchen aus der Lösung entfernt, fünfmal für zehn Minuten mit ddH₂O gewaschen und bei 60 °C für 30 Minuten im Ofen getrocknet. Nach dem Abkühlen wurde ein 8 µl Tropfen Wasser auf die Steinoberfläche gegeben und die Absorptionsgeschwindigkeit mit einer Kamera dokumentiert. Das Wasser war zuvor mit 25 µg/ml Remazol Brilliant Blue R (*Sigma-Aldrich*, Hamburg) eingefärbt worden, um den Tropfen besser sichtbar zu machen.

Die Bestimmung der Langzeitstabilität der Hydrophobinbeschichtung wurde auf quadratischen Steinblöcken (Obernkirchen Sandstein) mit 5 cm Seitenlänge durchgeführt. Nach der Beschichtung der Blöcke mit DewA wurde die Wasseraufnahme der Steine bestimmt und die Proben anschließend für drei Monate im Freien exponiert. Dies geschah zum einen auf dem Dach der südlich gelegenen Chorkapellen der *Hohen Domkirche Sankt Petrus* (Kölner Dom) in Köln und zum anderen auf dem Dach einer Garage in Grünwettersbach nahe Karlsruhe. Nach der Exponierung wurden die Steine für 30 Minuten bei 60 °C getrocknet, abkühlen gelassen und die Wasseraufnahme mit dem Tropfenabsorptionstest erneut bestimmt.

6.7 Test auf Emulsion Stabilisierung

Die Fähigkeit der Hydrophobine, als Emulgator zu dienen, wurde in einem einfachen Emulsionstest untersucht. Hierzu wurden die Hydrophobine in ddH₂O gelöst, welches mit 25 µg/ml Remazol Brilliant Blue R (*Sigma-Aldrich*, Hamburg) eingefärbt war. Die Farbe diente der besseren Visualisierung der wässrigen Phase. 2 ml Rapsöl wurden mit 2 ml

Hydrophobinlösung für 30 Sekunden auf dem Vortexmischer gemischt und die Phasentrennung mit einer Videokamera dokumentiert. Für die Langzeitstudie wurden 3 ml Rapsöl mit 1 ml Hydrophobinlösung gemischt und über eine Woche unberührt stehen gelassen. Die Phasentrennung wurde bildlich dokumentiert

7 Mikroskopie

7.1 Lichtmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem AxioImagerZ.1 und einer AxioCam MRm Kamera mit der Software Zen Pro 2012 durchgeführt (*Carl Zeiss AG, Oberkochen*).

Die Hydrophobinbeschichtung auf den Glasoberflächen wurde per Immunfluoreszenz nachgewiesen. Beschichtete Objektträger wurden für 30 Minuten mit *Blocking*-Lösung (siehe Tabelle 14) abgesättigt, bevor sie für eine Stunde bei Raumtemperatur (alternativ bei 4 °C über Nacht) mit dem Primärantikörper (α -His) inkubiert wurden. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit TBS wurde der Sekundärantikörper (*Anti-mouse IgG Cy3-labelled antibody, Dianova GmbH, Hamburg*) für eine Stunde im Dunkeln aufgetragen. Nach erneutem Waschen mit TBS und ddH₂O wurden die Proben bei einer Anregungswellenlänge von 552 nm und einer Emissionswellenlänge von 565 nm bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert.

Die Lebend-Tot-Mikroskopie von Bakterien wurde mit den zwei DNA-interkalierenden Farbstoffen Propidiumiodid (PI) (*Sigma-Aldrich, Hamburg*) und Syto™ 9 (*Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA*) durchgeführt. Während das PI nur perforierte Zellmembranen passieren kann und so der Markierung von toten Bakterien dient, passiert das Syto™ 9 auch die intakte Zellmembran und färbt so lebende Zellen. PI besitzt eine Anregungs-/Emissionswellenlänge von 488/590 nm und Syto™ 9 von 485/498 nm. Zur Lebend-Tot Färbung wurden mit Fusionsprotein beschichtete Objektträger über Nacht in einer Bakterienkultur inkubiert, dreimal mit steriler Saline (0,9% NaCl) gewaschen und für zehn Minuten in der Färbelösung (2,5 μ M Syto™ 9 und 15 μ M PI in TBS) inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit ddH₂O wurden die Objektträger bei 200-facher Vergrößerung mikroskopiert und die Anzahl der Zellen mit *ImageJ* bestimmt.

7.2 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (englisch: *atomic force microscopy*) diente der präzisen Darstellung der Oberflächenstruktur hydrophobinbeschichteter Glasobjektträger. Durchgeführt wurde sie an einem MFP-3D AFM (*Asylum Research*, Santa Barbara, USA) mit der Software Igor Pro 6.35A5 (*WaveMetrics*, Portland, USA). Die Silizium *Cantilever* (*BudgetSensors*, Sofia, Bulgarien) mit einer Federkonstante von 3 N/m wurden mit einer Resonanzfrequenz von 65 kHz bis 75 kHz im Nicht-Kontakt-Modus benutzt. Für die Adhäsionskraft-Messungen wurde der Cantilever auf die Oberfläche gedrückt, wieder abgezogen und die Auslenkung der Cantilever-Spitze dokumentiert.

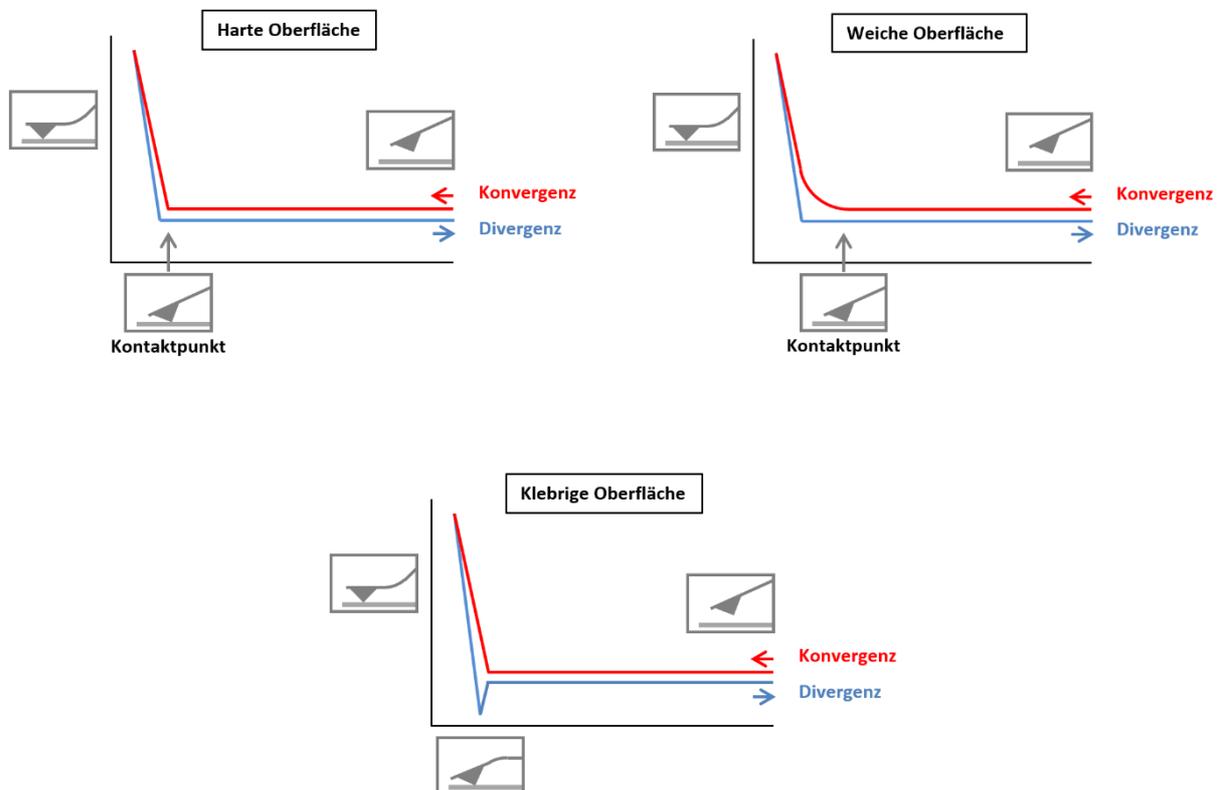


Abbildung 50: Schematische Darstellungen möglicher Ergebnisse der Adhäsionskraft-Messungen

In den *Force-Plots* ist auf der X-Achse die relative Distanz des *Cantilevers* zur Oberfläche und auf der Y-Achse die Auslenkung des *Cantilevers* relativ zur aufgebrachten Kraft aufgetragen. In Rot ist die Konvergenz des *Cantilevers* zur Oberfläche hin und in Blau die Divergenz von der Oberfläche weg dargestellt.

8 Weitere Methoden

8.1 Feuchtedurchgang

Der Feuchtedurchgang beschreibt die Menge an Wasser, die ein poröses Material in einer definierten Zeit passieren kann. Um den Feuchtedurchgang der Steinproben zu ermitteln wurde zuerst ein wassergetränkter Schwamm in einen quadratischen Plastikbehälter gelegt, dessen Öffnung nur minimal größer war als die Steinplättchen (Abb. 50A). Der Behälter wurde anschließend zu Dreiviertel mit ddH₂O gefüllt und das Steinplättchen auf den Schwamm aufgesetzt, sodass diese großflächig in direktem Kontakt waren (Abb. 50B). Abschließend wurde der freie Spalt zwischen Stein und Becherwand hermetisch mit *plasticfermit* Installationskitt (*Fermit GmbH, Vettelschoß*) verschlossen (Abb. 50C). Die Gewichtsabnahme, die gleichstehend mit der Menge an verdunstetem Wasser durch den porösen Stein war, wurde auf der Feinwaage alle 24 Stunden über einen Zeitraum von einer Woche dokumentiert.

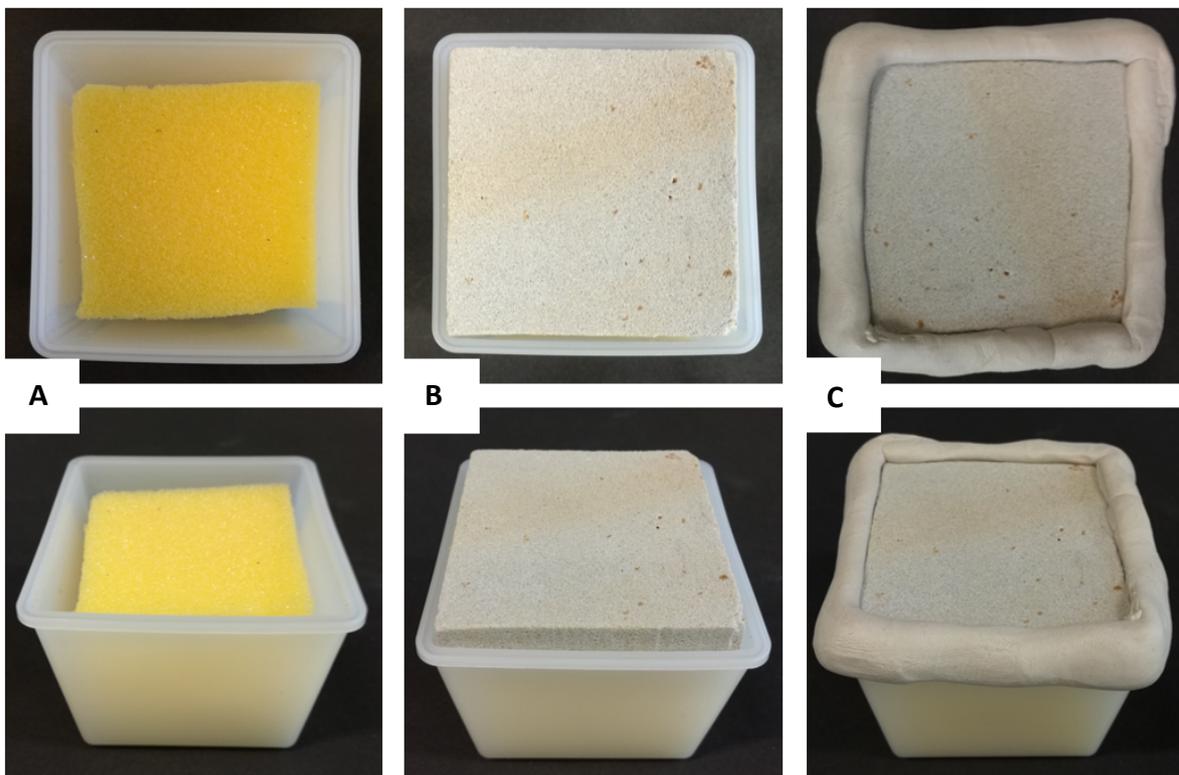


Abbildung 51: Aufbau zur Bestimmung des Feuchtedurchgangs

In einen Plastikbecher wurde ein wassergetränkter Schwamm eingelegt (A). Anschließend wurde der Becher zu Dreiviertel mit Wasser gefüllt und das Steinplättchen auf den Schwamm aufgelegt (B). Abschließend wurde der Spalt zwischen Stein und Becherwand hermetisch mit Installationskitt verschlossen (C) und die Gewichtsabnahme an der Feinwaage dokumentiert.

8.2 Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessungen wurden an einem OCA20 mit der Software SCA 202 v3.12.11 (*DataPhysics Instruments GmbH*, Filderstadt) durchgeführt. Mit einer Nadel wurde ein 4 μl Tropfen ddH₂O auf die Oberfläche platziert und mit einer CCD Kamera (768 x 576 Pixel Auflösung) abgebildet. An der Kontaktstelle von Tropfen und Oberfläche wurde eine Basislinie platziert, die Tropfenform mit einer elliptischen Annäherung festgelegt und beidseitige Kontaktwinkel gemessen.

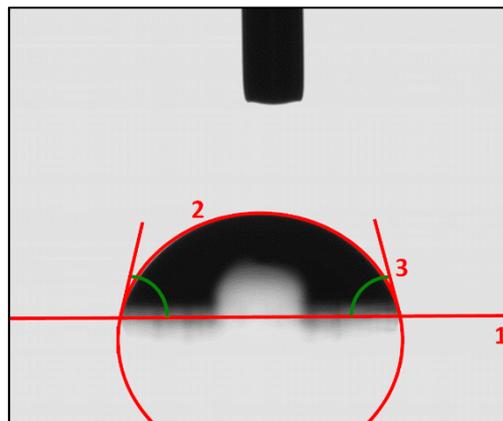


Abbildung 52: Darstellung der Kontaktwinkelmessung

Nach dem Platzieren der Basislinie (1) an der Kontaktstelle von Tropfen und Oberfläche wurde eine elliptische Annäherung der Tropfenform (2) angewendet. Ausgehend von dieser wurden die von Basislinie und Tropfen gebildeten Tangenten (3) berechnet und die Kontaktwinkel (Grün) bestimmt.

VI Literaturverzeichnis

Achmüller, C., Kaar, W., Ahrer, K., Wechner, P., Hahn, R., Werther, F., Schmidinger, H., Cserjan-Puschmann, M., Clementschitsch, F., Striedner, G., Bayer, K., Jungbauer, A., Auer, B. (2007). N(pro) fusion technology to produce proteins with authentic N termini in *E. coli*. *Nat Methods* **4**(12):1037-1043

Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2011). The antifungal plant defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Front Microbiol* **2**:47

Ageitos, J.M., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., Villa, T.G. (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol* **133**:117-138

Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Kniemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S.R., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A.A., Kaveri, S.V., Romani, L., Latgé, J.P. (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **460**(7259):1117-1121

Akanbi, M.H.J., Post, E., Meter-Arkema, A., Rink, R., Robillard, G.T., Wang, X., Wösten, H.A.B., Scholtmeijer, K. (2010). Use of hydrophobins in formulation of water insoluble drugs for oral administration. *Colloids Surf B Biointerfaces* **75**(2):526-531

Alessandrini, G., Aglietto, M., Castelvetro, V., Ciardelli, F., Peruzzi, R., Toniolo, L. (2000). Comparative evaluation of fluorinated and unfluorinated acrylic copolymers as water-repellent coating materials for stone. *J Appl Polym Sci* **76**:962–977

Andreotti, S., Franzoni, E., Degli Esposti, M., Fabbri, P. (2018). Poly(hydroxyalkanoate)s-based hydrophobic coatings for the protection of stone in cultural heritage. *Materials* **11**(1):165

Andreu, D., Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* **47**(6):415-33

Aslanidou, D., Karapanagiotis, I., Lampakis, D. (2018). Waterborne superhydrophobic and superoleophobic coatings for the protection of marble and sandstone. *Materials* **11**(4):585-598

Bardwell, J.C., McGovern, K., Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**(3):581-589

Barthlott, W., Neinhuis, C. (1997). Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **202**(1):1-8

Basheva, E.S., Kralchevsky, P.A., Danov, K.D., Stoyanov, S.D., Blijdenstein, T.B., Pelan, E.G., Lips, A. (2011). Self-assembled bilayers from the protein HFBII hydrophobin: nature of the adhesion energy. *Langmuir* **27**(8):4481-4488

Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J.I., Sunde, M., Latgé, J.P. (2012). Hydrophobins-unique fungal proteins. *PLoS Pathog* **8**(5):e1002700

Bechinger, B. (1999). The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2):157-83

Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., Biron, E. (2018). Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Sci Rep* **8**(1):9029

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **62**:293-300

Bessette, P.H., Cotto, J.J., Gilbert, H.F., Georgiou, G. (1999). In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem* **274**(12):7784-7792

Bloch, K.E. (1983). Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* **14**(1):47-92

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**(3):1037-1047

Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **13**:61-92

Boman, H.G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* **254**(3):197-215

- Borsoi, G., Lubellia, B., van Hees, R., Veiga, R., Santos Silva, A. (2016).** Understanding the transport of nanolime consolidants within Maastricht limestone. *J Cult Herit* **18**:242-249
- Bowman, S.M., Free S.J. (2006).** The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **28**(8):799-808
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D. (1998).** Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**(2):115-132
- Brogden, K.A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**(3):238-250
- Brogden, N.K., Brogden, K.A. (2011).** Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int J Antimicrob Agents* **38**(3):217-225
- Brown, N.A., Ries, L.N., Reis, T.F., Rajendran, R., Corrêa Dos Santos, R.A., Ramage, G., Riaño-Pachón, D.M., Goldman, G.H. (2016).** RNAseq reveals hydrophobins that are involved in the adaptation of *Aspergillus nidulans* to lignocellulose. *Biotechnol Biofuels* **9**:145
- Cardell, C., Delalieux, F., Roumpopoulos, K., Moropoulou, A., Auger, F., Van Grieken, R. (2003).** Salt-induced decay in calcareous stone monuments and buildings in a marine environment in SW France. *Constr Build Mater* **17**(3):165-179
- Characklis, W.G., Marshall, K.C. (1990).** Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. *Biofilms* Characklis W.G., Marshall K.C. (eds), John Wiley & Sons, New York, USA
- Chau, T.T., Bruckard, W.J., Koh, P.T.L., Nguyen, A.V. (2009).** A review of factors that affect contact angle and implications for flotation practice. *Adv Colloid Interface Sci* **150**(2):106-115
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F.G., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A. (2003).** A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev* **17**(14):1714-1726
- Clifton, J.R., Frohnsdorff, J.C. (1980).** Stone-consolidating materials: A status report. *Conservation of Historic Stone Buildings and Monuments* The National Academies Press, Washington DC, USA

Colangiuli, D., Calia, A., Bianco, N. (2015). Novel multifunctional coatings with photocatalytic and hydrophobic properties for the preservation of the stone building heritage. *Constr Build Mater* **93**:189-196

Coltelli, M.B., Paolucci, D., Castelvetro, V., Bianche, S., Mascha, E., Panariello, L., Pesce, C., Weber, J., Lazzeri, A. (2018). Preparation of water suspensions of nanocalcite for cultural heritage applications. *Nanomaterials* **8**(4):254-273

Coulson, S.R., Woodward, I., Badyal, J.P.S., Brewer, S.A., Willis, C. (2000). Super-repellent composite fluoropolymer surfaces. *J Phys Chem B* **104**:8836-8840

Cowland, J.B., Johnsen, A.H., Borregaard, N. (1995). hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* **368**(1):173-176

Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V.A., Foster, S., Gilmore, B.F., Hancock, R.E., Harper, D., Henderson, I.R., Hilpert, K., Jones, B.V., Kadioglu, A., Knowles, D., Ólafsdóttir, S., Payne, D., Projan, S., Shaunak, S., Silverman, J., Thomas, C.M., Trust, T.J., Warn, P., Rex, J.H. (2016). Alternatives to antibiotics - a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis* **16**(2):239-251

D'Arienzo, L., Scarfato, P., Incarnato, L. (2008). New polymeric nanocomposites for improving the protective and consolidating efficiency of tuff stone. *J Cult Herit* **9**(3):253-260

Deb, A., Johnson, W.A., Kline, A.P., Scott, B.J., Meador, L.R., Srinivas, D., Martin-Garcia, J.M., Dörner, K., Borges, C.R., Misra, R., Hogue, B.G., Fromme, P., Mor, T.S. (2017). Bacterial expression, correct membrane targeting and functional folding of the HIV-1 membrane protein Vpu using a periplasmic signal peptide. *PLoS One* **12**:e0172529.

de Coninck, B., Cammue, B.P.A., Thevissen, K. (2013). Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biol Rev* **26**(4):109-120

de Groot, P.W., Brandt, B.W., Horiuchi, H., Ram, A.F., de Koster, C.G., Klis, F.M. (2009). Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46**(1):S72-S81

de Naeyer, A., Arroyo, S.P., Blanco, J.R. (2000). Krakow Charter 2000: Principles for conservation and restoration of built heritage. *Bureau Krakow* Krakau, Polen, 2000

de Vries, O.M.H., Fekkes, M.P., Wösten H.A.B., Wessels, J.G.H. (1993). Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch Microbiol* **159**(4):330-335

- Delgado Rodrigues, J. (2001).** Consolidation of decayed stones: a delicate problem with few practical solutions. *Historical Constructions* Lourenço, P.B., Roca, P. (eds), Universidade do Minho, Guimarães, Portugal
- Delgado Rodrigues, J., Ferreira Pinto, A.P., Nogueira, R., Gomes, A. (2018).** Consolidation of lime mortars with ethyl silicate, nanolime and barium hydroxide. Effectiveness assessment with microdrilling data. *J Cult Herit* **29**:43-53
- Della Volpe, C., Penati, A., Peruzzi, R., Siboni, S., Toniolo, L., Colombo, C. (2000).** The combined effect of roughness and heterogeneity on contact angles: The case of polymer coating for stone protection. *J Adhes Sci Technol* **14**:273-299
- Duggar, B.M. (1948).** Aureomycin, a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann N Y Acad Sci* **51**(2):177-181
- Ensikat, H.J., Ditsche-Kuru, P., Neinhuis, C., Barthlott, W. (2011).** Superhydrophobicity in perfection: the outstanding properties of the lotus leaf. *Beilstein J Nanotechnol* **2**:152-161
- Espeland, E.M., Wetzel, R.G., (2001).** Effects of photosynthesis on bacterial phosphatase production in biofilms. *Microb Ecol* **42**(3):328-337
- Esposito Corcione, C., Manno, R., Frigione, M. (2016).** Sunlight curable boehmite/siloxane-modified methacrylic nano-composites: An innovative solution for the protection of carbonate stones. *Prog Org Coat* **97**:222-232
- Ferreira Pinto, A.P., Delgado Rodrigues, J. (2008).** Stone consolidation: The role of treatment procedures. *J Cult Herit* **9**(1):38-53
- Fleming, A. (1929).** On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **10**(3):226-236
- Fokina, O., Fenchel, A., Winandy, L., Fischer, R. (2016).** Immobilization of LccC laccase from *Aspergillus nidulans* on hard surfaces via fungal hydrophobins. *Appl Environ Microbiol* **82**(21):6395-6402
- Gennaro, R., Zanetti, M. (2000).** Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**(1):31-49
- Gherardi, F., Roveri, M., Goidanich, S., Toniolo, L. (2018).** Photocatalytic nanocomposites for the protection of european architectural heritage. *Materials* **11**(1):65-79

Ghosh, C., Halder, J. (2015). Membrane-active small molecules: Designs inspired by antimicrobial peptides. *ChemMedChem* **10**(10):1606-1624

Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Symp Ser Soc Appl Microbiol* **31**:S98-S110

Giorgi, R., Ambrosi, M., Toccafondi, N., Baglioni, P. (2010). Nanoparticles for cultural heritage conservation: Calcium and barium hydroxide nanoparticles for wall painting consolidation. *Chem Eur J* **16**:9374-9382

Graziani, G., Sassoni, E., Franzoni, E., Scherer, G.W. (2016). Hydroxyapatite coatings for marble protection: Optimization of calcite covering and acid resistance. *Appl Surf Sci* **368**:241-257

Grünbacher, A., Throm, T., Seidel, C., Gutt, B., Röhrig, J., Strunk, T., Vincze, P., Walheim, S., Schimmel, T., Wenzel, W., Fischer, R. (2014). Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS One* **9**(4):e94546

Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, Lda. S., Silva-Pereira, I., Kyaw, C.M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* **4**:353

Gutt, B. (2013). Anwendung von *Aspergillus nidulans* Hydrophobinen zur Funktionalisierung von Oberflächen mit antimikrobiellen Peptiden und Enzymen. PhD, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland

Hagen, S., Marx, F., Ram, A.F., Meyer, V. (2007). The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl Environ Microbiol* **73**(7):2128-34

Hakanpää, J., Parkkinen, T., Hakulinen, N., Linder, M.B., Rouvinen, J. (2004). Crystallization and preliminary X-ray characterization of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBII. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(1):163-165

Hakanpää, J., Linder, M.B., Popov, A., Schmidt, A., Rouvinen, J. (2006). Hydrophobin HFBII in detail: ultrahigh-resolution structure at 0.75 Å. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(4):356-367

Hakanpää, J., Szilvay, G.R., Kaljunen, H., Maksimainen, M., Linder, M.B., Rouvinen, J. (2006). Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI - the structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Sci* **15**(9):2129-2140

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**:95-108
- Hancock, R.E.W. (1997).** Peptide antibiotics. *Lancet* **349**(9049):418-422
- Hancock, R.E.W., Lehrer, R. (1998).** Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* **16**(2):82-88
- Hancock, R.E.W., Chapple, D.S. (1999).** Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(6):1317-1323
- Hancock, R.E.W. (2001).** Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* **1**(3):156-164
- Hancock, R.E.W., Brown, K.L., Mookherjee, N. (2006).** Host defence peptides from invertebrates - emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* **211**(4):315-322
- Hegedüs, N., Marx, F. (2013).** Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biol Rev* **26**(4):132-145
- Hektor, H.J., Scholtmeijer, K. (2005).** Hydrophobins: proteins with potential. *Curr Opin Biotechnol* **16**(4):434-439
- Herrera, L.K., Arroyave, C., Guiamet, P., Gomes de Saravia, S., Videla, H. (2004).** Biodeterioration of peridotite and other constructional materials in a building of the Colombian cultural heritage. *Int Biodeterior Biodegradation* **54**(2-3):135-141
- Hilpert, K., Volkmer-Engert, R., Walter, T., Hancock, R.E.W. (2005).** High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity. *Nat Biotechnol* **23**(8):1008-1012
- 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.W. (2009).** Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity. *Chem Biol* **16**(1):58-69
- Hwang, P.M., Zhou, N., Shan, X., Arrowsmith, C.H., Vogel, H.J. (1998).** Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry* **37**(12):4288-4298

- Jensen, B.G., Andersen, M.R., Pedersen, M.H., Frisvad, J.C., Søndergaard, I. (2010).** Hydrophobins from *Aspergillus* species cannot be clearly divided into two classes. *BMC Res Notes* **3**:344
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W. (2006).** Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **19**(3):491-511
- Joensuu, J.J., Conley, A.J., Lienemann, M., Brandle, J.E., Linder, M.B., Menassa, R. (2010).** Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* **152**(2):622-633
- Kang, J.H., Shin, S.Y., Jang, S.Y., Lee, M.K., Hahm, K.S. (1998).** Release of aqueous contents from phospholipid vesicles induced by cecropin A (1-8)-magainin 2 (1-12) hybrid and its analogues. *J Pept Res* **52**(1):45-50
- Kalfa, V.C., Jia, H.P., Kunkle, R.A., McCray, P.B. Jr., Tack, B.F., Brogden, K.A. (2001).** Congeners of SMAP29 kill ovine pathogens and induce ultrastructural damage in bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(11):3256-3261
- Kantlehner, M., Finsinger, D., Meyer, J., Schaffner, P., Jonczyk, A., Diefenbach, B., Nies, B., Kessler, H. (1999).** Selective RGD-Mediated Adhesion of Osteoblasts at Surfaces of Implants. *Angew Chem Int Ed Engl* **38**(4):560-562
- Kapridaki, C., Maravelaki-Kalaitzaki, P. (2013).** TiO₂-SiO₂-PDMS nano-composite hydrophobic coating with self-cleaning properties for marble protection. *Prog Org Coat* **76**(2-3):400-410
- Kershaw, M.J., Wakley, G., Talbot, N.J. (1998).** Complementation of the *mpg1* mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *EMBO J* **17**(14):3838-3849
- Kirkland, B.H., Keyhani, N.O. (2010).** Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E. coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**(2):327-335
- Kiss, G., Michl, H. (1962).** Über das Giftsekret der Gelbbauchunke, *Bombina variegata*. *Toxicon* **1**(1):33-34
- Klingspore, M., Kwiatowski, D. (1992).** Protection of dense limestone and marble with microcrystalline waxes. *Proc of the 7th Intl Cong on Deterioration and Conservation of Stone* **3**:1157-1165

Kodani, S., Lodato, M.A., Durrant, M.C., Picart, F., Willey, J.M. (2005). SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the *streptomycetes*. *Mol Microbiol* **58**(5):1368-80

Kourkoulis, S.K., Prassianakis, I., Agioutantis, Z., Exadaktylos, G.E. (2006). Reliability assessment of the NDT results for the internal damage of marble specimens. *Int J Mater Prod Technol* **2**:35-56

Kwan, A.H., Winefield, R.D., Sunde, M., Matthews, J.M., Haverkamp, R.G., Templeton, M.D., Mackay, J.P. (2006). Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(10):3621-3626

Kwan, A.H., Macindoe, I., Vukasin, P.V., Morris, V.K., Kass, I., Gupte, R., Mark, A.E., Templeton, M.D., Mackay, J.P., Sunde, M. (2008). The Cys3-Cys4 loop of the hydrophobin EAS is not required for rodlet formation and surface activity. *J Mol Biol* **382**(3):708-720

Lacroix, H., Spanu, P.D. (2009). Silencing of six hydrophobins in *Cladosporium fulvum*: complexities of simultaneously targeting multiple genes. *Appl Environ Microbiol* **75**(2):542-546

Ladokhin, A.S., White, S.H. (2001). 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim Biophys Acta* **1514**(2):253-260

Lahtinen, T., Linder, M.B., Nakari-Setälä, T., Oker-Blom, C. (2008). Hydrophobin (HFBI): A potential fusion partner for one-step purification of recombinant proteins from insect cells. *Protein Expr Purif* **59**(1):18-24

Lanterna, G., Mairani, A., Matteini, M., Rizzi, M., Scuto, S. (2000). Mineral inorganic treatments for the conservation of calcareous artefacts. *Proc of the 9th Intl Cong on Deterioration and Conservation of Stone* **2**:387-394

Larrick, J.W., Hirata, M., Zhong, J., Wright, S.C. (1995). Anti-microbial activity of human CAP18 peptides. *Immunotechnology* **1**(1):65-72

Le Blay, G., Hammami, R., Lacroix, C., Fliss, I. (2012). Stability and Inhibitory activity of pediocin PA-1 against *Listeria sp.* in simulated physiological conditions of the human terminal ileum. *Probiotics Antimicrob Proteins* **4**(4):250-258

Lebret, K., Thabard, M., Hellio, C. (2009). Algae as marine fouling organisms: adhesion damage and prevention. *Advances in marine antifouling coatings and technologies* Hellio, C., Yebra, D. (eds), CRC Press, Boca Rotan, USA

- Lee, S., Røn, T., Pakkanen, K.I., Linder, M.B. (2015).** Hydrophobins as aqueous lubricant additive for a soft sliding contact. *Colloids Surf B Biointerfaces* **125**:264-269
- Lehrer, R.I., Ganz, T. (1999).** Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* **11**(1):23-27
- Lehrer, R.I. (2007).** Multispecific myeloid defensins. *Curr Opin Hematol* **14**(1):16-21
- Leippe, M., Bruhn, H., Hecht, O., Grötzinger, J. (2005).** Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends Parasitol* **21**(1):5-7
- Li, D., Xu, F., Liu, Z., Zhu, J., Zhang, Q., Shao, L. (2013).** The effect of adding PDMS-OH and silica nanoparticles on sol-gel properties and effectiveness in stone protection. *Appl Surf Sci* **266**:368-374
- Linder, M.B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M.E. (2005).** Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* **5**:877-896
- Littlejohn, K.A., Hooley, P., Cox, P.W. (2012).** Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocoll* **27**(2):503-516
- Lo, V.C., Ren, Q., Pham, C.L., Morris, V.K., Kwan, A.H., Sunde, M. (2014).** Fungal Hydrophobin Proteins Produce Self-Assembling Protein Films with Diverse Structure and Chemical Stability. *Nanomaterials* **4**(3):827-843
- Lu, Y., Sathasivam, S., Song, J., Crick, C.R., Carmalt, C.J., Parkin, I.P. (2015).** Robust self-cleaning surfaces that function when exposed to either air or oil. *Science* **347**(6226):1132-1135
- Lugones, L.G., Wösten, H.A., Birkenkamp, K.U., Sjollema, K.A., Zagers, J., Wessels, J.G. (1999).** Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*. *Mycol Res* **103**(5):635-640
- Mackay, J.P., Matthews, J.M., Winefield, R.D., Mackay, L.G., Haverkamp, R.G., Templeton, M.D. (2001).** The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures. *Structure* **9**(2):83-91
- Mader, J.S., Hoskin, D.W. (2006).** Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* **15**(8):933-946

Mader, J.S., Richardson, A., Salsman, J., Top, D., de Antueno, R., Duncan, R., Hoskin, D.W. (2007). Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria. *Exp Cell Res* **313**(12):2634-2650

Mah, T.F., O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**(1):34-39

Manoudis, P.N., Karapanagiotis, I., Tsakalof, A., Zuburtikudis, I., Panayiotou, C. (2008). Superhydrophobic composite films produced on various substrates. *Langmuir* **4**(19):11225-11232

Manoudis, P.N., Karapanagiotis, I., Tsakalof, A., Zuburtikudis, I., Kolinkeová, B., Panayiotou, C., (2009). Superhydrophobic films for the protection of outdoor cultural heritage assets. *Appl Phys A Mater Sci Process* **97**(2):351-360

Manoudis, P.N., Karapanagiotis, I. (2014). Modification of the wettability of polymer surfaces using nanoparticles. *Prog Org Coat* **77**(2): 331-338

Martin, E., Ganz, T., Lehrer, R.I. (1995). Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol* **58**(2):128-136

Martin, F., Laurent, P., de Carvalho, D., Voiblet, C., Balestrini, R., Bonfante, P., Tagu, D. (1999). Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genet Biol* **27**(2-3):161-174

Marx, F., Binder, U., Leiter, E., Pócsi, I. (2008). The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell Mol Life Sci* **65**(3):445-454

Matsuzaki, K., Murase, O., Miyajima, K. (1995). Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. *Biochemistry* **34**(39):12553-12559

Matsuzaki, K., Nakamura, A., Murase, O., Sugishita, K., Fujii, N., Miyajima, K. (1997). Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry* **36**(8):2104-2111

Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2):1-10

- Matteini, M. (2008).** Inorganic treatments for the consolidation and protection of stone artefacts. *Conserv Sci Cult Herit* **8**:13-27
- McNamara, C.J., Mitchell, R. (2005).** Microbial deterioration of historic stone. *Front Ecol Environ* **3**(8):445-451
- Melcher, M., Facey, S.J., Henkes, T.M., Subkowski, T., Hauer, B. (2016).** Accelerated nucleation of hydroxyapatite using an engineered hydrophobin fusion protein. *Biomacromolecules* **17**(5):1716-1726
- Mesa-Pereira, B., O'Connor, P.M., Rea, M.C., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2017).** Controlled functional expression of the bacteriocins pediocin PA-1 and bactofencin A in *Escherichia coli*. *Sci Rep* **7**(1):3069
- Milchin, M., Weber, J., Krist, G., Ghaffari, E., Karacsonyi, S. (2016).** Ethyl-silicate consolidation for porous limestone coated with oil paint - A comparison of application methods. *Proc of the 13th Intl Cong on Deterioration and Conservation of Stone* **2**:889-896
- Miller, K.P., Wang, L., Benicewicz, B.C., Decho, A.W. (2015).** Inorganic nanoparticles engineered to attack bacteria. *Chem Soc Rev* **44**:7787-7807
- Ministero della Pubblica Istruzione (1972).** Carta Italiana del Restauro. *Circolare No. 117*
Rom, Italien
- Missiakas, D., Georgopoulos, C., Raina, S. (1994).** The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J* **13**(8):2013-2020
- Morris, V.K., Ren, Q., Macindoe, I., Kwan, A.H., Byrne, N., Sunde, M. (2011).** Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. *J Biol Chem* **286**(18):15955-15963
- Morris, V.K., Kwan, A.H., Sunde, M. (2013).** Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. *J Mol Biol* **425**(2):244-256
- Munafò, P., Goffredo, G.B., Quagliarini, E. (2015).** TiO₂-based nanocoatings for preserving architectural stone surfaces: An overview. *Constr Build Mater* **84**:201-218
- Murray, B.S. (2007).** Stabilization of bubbles and foam. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **12**(4-5):232-241

- Naidu, S., Sassoni, E., Scherer, G.W. (2011).** New treatment for corrosion-resistant coatings for marble and consolidation of limestone. *Proc of Jardins de Pierres - Conservation of Stone in Parks, Gardens and Cemeteries* **1**:289-294
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Peláez-Martínez, M.C., de la Torre H.A. (2006).** Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on spanish raw meat. *Meat Sci* **72**(1):57-61
- Niu, B., Gong, Y., Gao, X., Xu, H., Qiao, M., Li, W. (2014).** The functional role of Cys3-Cys4 loop in hydrophobin HGFI. *Amino Acids* **46**(11):2615-2625
- Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I., Hasenekoglu, I. (2006).** The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. *Sci Total Environ* **364**:272-283
- Oppenheim, J.J., Biragyn, A., Kwak, L.W., Yang, D. (2003).** Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* **62**(2):17-21
- Onardien, S., Drijfhout, J.W., Vaz, F.M., Wenzel, M., Hamoen, L.W., Zaat, S.A.J., Brul, S. (2018).** Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* in press
- Paananen, A., Vuorimaa, E., Torkkeli, M., Penttilä, M., Kauranen, M., Ikkala, O., Lemmetyinen, H., Serimaa, R., Linder, M.B. (2003).** Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry* **42**(18):5253-5258
- Panteleev, P.V., Bolosov, I.A., Balandin, S.V., Ovchinnikova, T.V. (2015).** Design of antimicrobial peptide arenicin analogs with improved therapeutic indices. *J Pept Sci* **21**(2):105-13
- Park, C.B., Yi, K.S., Matsuzaki, K., Kim, M.S., 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(15):8245-8250
- Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., Hancock, R.E.W. (2002).** Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(3):605-614

- Partow, S., Siewers, V., Bjorn, S., Nielsen, J., Maury, J. (2010).** Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **27**(11):955-64
- Pille, A., Kwan, A.H., Cheung, I., Hampsey, M., Amanianda, V., Delepierre, M., Latgé, J.P., Sunde, M., Guijarro, J.I. (2015).** ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the RodA hydrophobin from the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Biomol NMR Assign* **9**(1):113-118
- Poli, T., Toniolo, L., Chiantor, O. (2004).** The protection of different Italian marbles with two partially flourinated acrylic copolymers. *Appl Phys A Mater Sci Process* **79**(2):347–351
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., Shai, Y. (1992).** Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **31**(49):12416-12423
- Pratap, J., Dikshit, K.L. (1998).** Effect of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase from *Escherichia coli*: requirement for secondary structure at the cleavage junction. *Mol Gen Genet* **258**(4):326-333
- Price, C.A., Ross, K., White, G. (1988).** A further appraisal of the “lime technique” for limestone consolidation, using a radioactive tracer. *Stud Conserv* **33**:178-186
- Przylucka, A., Akcapinar, G.B., Bonazza, K., Mello-de-Sousa, T.M., Mach-Aigner, A.R., Lobanov, V., Grothe, H., Kubicek, C.P., Reimhult, E., Druzhinina, I.S. (2017).** Comparative physiochemical analysis of hydrophobins produced in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **159**:913-923
- Pugsley, A.P. (1993).** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**(1):50-108
- Quaas, B., Burmeister, L., Li, Z., Nimtz, M., Hoffmann, A., Rinas, U. (2018).** Properties of dimeric, disulfide-linked rhBMP-2 recovered from *E. coli* derived inclusion bodies by mild extraction or chaotropic solubilization and subsequent refolding. *Process Biochem* **67**:80-87
- Quagliarini, E., Graziani, L., Diso, D., Licciulli, A., D’Orazio, M. (2018).** Is nano-TiO₂ alone an effective strategy for the maintenance of stones in Cultural Heritage? *J Cult Herit* **30**:81-91
- Raimondo, D., Andreotti, G., Saint, N., Amodeo, P., Renzone, G., Sanseverino, M., Zocchi, I., Molle, G., Motta, A., Scaloni, A. (2005).** A folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance to degradation unveiled by solution structure of distinctin. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(18):6309-6314

- Ren, Q., Kwan, A.H., Sunde, M. (2014).** Solution structure and interface-driven self-assembly of NC2, a new member of the Class II hydrophobin proteins. *Proteins* **82**(6):990-1003
- Renz, C. (1921).** Lichtreaktionen der Oxyde des Titans, Cers und der Erdsäuren. *Helvetica* **4**(1):961-968
- Rey, A.A., Hocher, A., Kwan, A.H., Sunde, M. (2013).** Backbone and sidechain (1)H, (13)C and (15)N chemical shift assignments of the hydrophobin MPG1 from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Biomol NMR Assign* **7**(1):109-112
- Ribitsch, D., Herrero Acero, E., Przylucka, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Gamerith, C., Tscheließnig, R., Jungbauer, A., Rennhofer, H., Lichtenegger, H., Amenitsch, H., Bonazza, K., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S., Guebitz, G.M. (2015).** Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. *Appl Environ Microbiol* **81**(11):3586-3592
- Richards, L.A. (1931).** Capillary conduction of liquids through porous mediums. *Physics* **1**:318-333
- Rieder, A., Ladnorg, T., Wöll, C., Obst, U., Fischer, R., Schwartz, T. (2011).** The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on *E. coli* and natural mixed culture biofilm formation. *Biofouling* **27**:1073-1085
- Rieder, A. (2012).** Biomimetische Oberflächenmodifikation mit rekombinanten pilzlichen Hydrophobinen und ihr Einfluss auf die bakterielle Biofilmbildung. PhD, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe
- Ritva, S., Torkkeli, M., Paananen, A., Linder, M., Kisko, K., Knaapila, M., Ikkala, O., Vuorimaa, E., Lemmetyinen, H., Seeck, O. (2003).** Self-assembled structures of hydrophobins HFBI and HFBII. *J Appl Cryst* **36**(3):499-502
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M., Gennaro, R. (1988).** Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem* **263**(20):9573-9575
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., (2014).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* **5**:172
- Rose, A.S., Hildebrand P.W. (2015).** NGL Viewer: a web application for molecular visualization. *Nucleic Acids Res* **43**(1):576-579

- Roveri, M., Gherardi, F., Goidanich, S., Gulotta, D., Castelvetro, V., Fischer, R., Winandy, L., Weber, J., Toniolo, L. (2018).** Self-cleaning and antifouling nanocomposites for stone protection: properties and performances of stonenanomaterial systems. *IOP Conf Series: Mater Sci Eng* **364**: 012070
- Roveri, M., Raneri, S., Bianchi, S., Gherardi, F., Castelvetro, V., Toniolo, L. (2018).** Electrokinetic characterization of nanocomposites applied on natural stones by streaming current measurements. *Preprints* 2018050127
- Rozek, A., Friedrich, C.L., Hancock, R.E.W. (2000).** Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* **39**(51):15765-15774
- Rudolph, R., Lillie, H., (1996).** In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J* **10**(1):49-56
- Sansom, M.S. (1993).** Structure and function of channel-forming peptaibols. *Q Rev Biophys* **26**(4):365-421
- Sassoni, E., Naidu, S., Scherer, G.W. (2011).** The use of hydroxyapatite as a new inorganic consolidant for damaged carbonate stones. *J Cult Herit* **12**(4):346-355
- Sassoni, E., Franzoni, E., Pigino, B., Scherer, G.W., Naidu, S. (2013).** Consolidation of calcareous and siliceous sandstones by hydroxyapatite: Comparison with a TEOS-based consolidant. *J Cult Herit* **14**(3):103-108
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**:1140-1154
- Scarsini, M., Tomasinsig, L., Arzese, A., D'Este, F., Oro, D., Skerlavaj, B. (2015).** Antifungal activity of cathelicidin peptides against planktonic and biofilm cultures of *Candida* species isolated from vaginal infections. *Peptides* **71**:211-221
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S. (1944).** Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med* **55**:66-69
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C. (2009).** Microbial deterioration of stone monuments-An updated overview. *Adv Appl Microbio* **66**:97-139

- Schmoll, M., Seibel, C., Kotlowski, C., Wöllert Genannt Vendt, F., Liebmann, B., Kubicek, C.P. (2010).** Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (DewA) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**(1):95-103
- Schnabel, L. (1992).** Evaluation of the barium hydroxide-urea consolidation method. *Proc of the 7th Intl Cong on Deterioration and Conservation of Stone* **3**:1063-1072
- Schoffelmeer, E.A., Klis, F.M., Sietsma, J.H., Cornelissen, B.J. (1999).** The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* **27**(2-3):275-282
- Scholtmeijer, K., Wessels, J.G.H., Wösten, H.A.B. (2001).** Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**(1-2):1-8
- Scholtmeijer, K., de Vocht, M.L., Rink, R., Robillard, G.T., Wösten, H.A. (2009).** Assembly of the fungal SC3 hydrophobin into functional amyloid fibrils depends on its concentration and is promoted by cell wall polysaccharides. *J Biol Chem* **284**(39):26309-26314
- Schuren, F.H., 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**(2):199-205
- Selwitz, C. (1992).** Epoxy resins in stone conservation. *Research in Conservation* The Getty Conservation Institute, Los Angeles, USA
- Shah, A.T., Din, M.I., Bashir, S., Qadir, M.A., Rashid, F. (2015).** Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Ferocactus echidne* extract as a reducing agent. *Anal Lett* **48**(7):1180-1189
- Shahravan, S.H., Qu, X., Chan, I.S., Shin, J.A. (2008).** Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Protein Expr Purif* **59**(2):314-319
- Shai, Y. (1999).** Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2):55-70
- Shokribousjein, Z., Deckers, S.M., Gebruers, K., Lorgouilloux, Y., Baggerman, G., Verachtert, H., Delcour, J.A., Etienne, P., Rock, J.M., Michiels, C., Derdelinckx, G. (2011).** Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia* **35**(4):85-101

- Sierra-Fernandez, A., De la Rosa-García, S.C., Gomez-Villalba, L.S., Gómez-Cornelio, S., Rabanal, M.E., Fort, R., Quintana, P. (2017).** Synthesis, photocatalytic, and antifungal properties of MgO, ZnO and Zn/Mg oxide nanoparticles for the protection of calcareous stone heritage. *ACS Appl Mater Interfaces* **9**(29):24873-24886
- Sierra-Fernandez, A., Gomez-Villalba, L.S., de la Rosa-García, S.C., Gomez-Cornelio, S., Quintana, P., Rabanal, M.E., Fort, R. (2018).** Inorganic nanomaterials for the consolidation and antifungal protection of stone heritage. *Advanced Materials for the Conservation of Stone* Hosseini, M., Karapanagiotis, I. (eds), Springer, Cham, Schweiz
- Singh, S.M., Panda, A.K. (2005).** Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* **99**(4):303-310
- Slavíková, M., Krejčí, F., Žemlička, J., Pech, M., Kotlík, P., Jakůbek, J. (2012).** X-ray radiography and tomography for monitoring the penetration depth of consolidants in Opuka - the building stone of Prague monuments. *J Cult Herit* **13**(4):357-364
- Sockolosky, J.T. & Scoka, F.C (2013).** Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expr Purif* **87**(2):129-135
- Song, D.F., Li, X., Zhang, Y.H., Zhu, M.Y., Gu, Q. (2014).** Mutational analysis of positively charged residues in the N-terminal region of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1. *Lett Appl Microbiol* **58**(4):356-361
- Steiger, M., Charola, A.E., Sterflinger, K. (2011).** Weathering and deterioration. *Stone in Architecture* Siegesmund, S., Snethlage, R. (eds), Springer, Heidelberg, Deutschland
- Stewart, P.S., Costerton, J.W. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**(9276):135-138
- Stringer, M.A., Dean, R.A., Sewall, T.C., Timberlake, W.E. (1991).** Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes & Dev* **5**:1161-1171
- Stringer, M.A., Timberlake, W.E. (1995).** *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol Microbiol* **16**(1):33-44
- Tagu, D., Kottke, I., Martin, F. (1998).** Hydrophobins in ectomycorrhizal symbiosis: hypothesis. *Symbiosis* **25**:5-18

- Tagu, D., Marmeisse, R., Baillet, Y., Rivière, S., Palin, B., Bernardini, F., Méreau, A., Gay, G., Balestrini, R., Bonfante, P., Martin, F. (2002).** Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus* HydPt-1 gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporum*. *Eur J Histochem* **46**(1):23-29
- Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Hamer, J.E. (1993).** Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**(11):1575-1590
- Talbot, N.J., Kershaw, M.J., Wakley, G.E., De Vries, O.M.H., Wessels, J.G.H., Hamer, J.E. (1996).** MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**(6):985-999
- Teertstra, W.R., Deelstra, H.J., Vranes, M., Bohlmann, R., Kahmann, R., Kämper, J., Wösten, H.A. (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**(12):3607-3612
- Terpe, K. (2003).** Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(5):523-533
- Theis, T., Stahl, U. (2004).** Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol Life Sci* **61**(4):437-455
- Throm, T. (2011).** Charakterisierung der Hydrophobine in *Aspergillus nidulans* und deren Anwendung zur Oberflächenbeschichtung und -funktionalisierung. PhD, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland
- Toniolo, L., Poli, T., Castelvetro, V., Manariti, A., Chiantore, O., Lazzari, M. (2002).** Tailoring new fluorinated acrylic copolymers as protective coatings for marble. *J Cult Herit* **3**(4):309-316
- Tserepi, A.D., Vlachopoulou, M.E., Gogolides, E. (2006).** Nanotexturing of poly(dimethylsiloxane) in plasmas for creating robust super-hydrophobic surfaces. *Nanotechnology* **17**:3977-3983
- Valo, H.K., Laaksonen, P.H., Peltonen, L.J., Linder, M.B., Hirvonen, J.T., Laaksonen, T.J. (2010).** Multifunctional hydrophobin: toward functional coatings for drug nanoparticles. *ACS Nano* **4**(3):1750-1758
- van der Weerden, N.L., Bleackley, M.R., Anderson, M.A. (2013).** Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell Mol Life Sci* **70**(19):3545-3570

van Hees, R.P.J., Koek, J.A.G., De Clercq, H., De Witte, E., Binda, L., Ferrieri, E.D., Carraro, E. (1997). The assessment of the performance of surface treatments in the field: Results of 60 case studies confronted with lab results. *Proc. of 4th Int. Symp. on Conservation of Monuments in the Mediterranean* **3**:395-413

Vicini, S., Mariani, A., Princi, E., Bidali, S., Pincin, S., Fiori, S., Pedemonte, E., Brunetti, A. (2005). Frontal polymerization of acrylic monomers for the consolidation of stone. *Polym Adv Technol* **16**:293-298

Vüllers, F., Gomard, G., Preinfalk, J.B., Klampaftis, E., Worgull, M., Richards, B., Hölscher, H., Kavalenka, M.N. (2016). Bioinspired superhydrophobic highly transmissive films for optical applications. *Small* **12**(44):6144-6152

Wang, G., Li, X., Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* **37**:D933-D937

Wang, G., Li, X., Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* **44**:D1087-D1093

Wang, H., Ng, T.B. (2000). Ginkbilobin, a novel antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds with sequence similarity to embryo-abundant protein. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(2):407-411

Wang, K., Dang, W., Xie, J., Zhu, R., Sun, M., Jia, F., Zhao, Y., An, X., Qiu, S., Li, X., Ma, Z., Yan, W., Wang, R. (2015). Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* **1848**(10):2365-2373

Wang, X., Graveland-Bikker, J.F., de Kruif, C.G., Robillard, G.T. (2004). Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: from soluble state to self-assembly. *Protein Sci* **13**(3):810-821

Wang, X., Mao, J., Chen, Y., Song, D., Gao, Z., Zhang, X., Bai, Y., Saris, P.E.J., Feng, H., Xu, H., Qiao, M. (2017). Design of antibacterial biointerfaces by surface modification of poly (ϵ -caprolactone) with fusion protein containing hydrophobin and PA-1. *Colloids Surf B Biointerfaces* **151**:255-263

Wang, Z., Wang, G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res* **1**(32):D590-D592

Waring, R.B., May, G.S., Morris, N.R. (1989). Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**:119-130

- Warscheid, T., Braams, J. (2000).** Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodeterior Biodegradation* **46**(4):343-368
- Wei, G., de Leeuw, E., Pazgier, M., Yuan, W., Zou, G., Wang, J., Ericksen, B., Lu, W.Y., Lehrer, R.I., Lu, W. (2009).** Through the looking glass, mechanistic insights from enantiomeric human defensins. *J Biol Chem* **284**(42):29180-29192
- Weiss, N., Slavid, I., Wheeler, G. (2000).** Development and assessment of a conversion treatment for calcareous stone. *Proc of the 9th Intl Cong on Deterioration and Conservation of Stone* **2**:533-540
- Wessels, J.G.H. (1994).** Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu Rev Phytopathol* **32**:413-437
- Wessels, J.G.H., de Vries, O.M.H., Ásgeirsdóttir, S.A., Schuren, F.H.J. (1991).** Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* **3**:793-799
- Wessels, J.G.H., Schuren, F.H.J. (1990).** Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene* **90**(2):199-205
- Wheeler, G., Mendes-Vivar, J., Goins, E.S., Brinker, C.J. (2000).** Evaluation of alkoxy silane coupling agents in the consolidation of limestone. *Proc of the 9th Intl Cong on Deterioration and Conservation of Stone* **2**:541-545
- Wheeler, G. (2005).** Alkoxy silanes and the consolidation of stone. *Research in Conservation*, The Getty Conservation Institute, Los Angeles, USA
- Whiteford, J.R., Spanu, P.D. (2001).** The Hydrophobin Hcf-1 of *Cladosporium fulvum* is required for efficient water-mediated dispersal of conidia. *Fungal Genet Biol* **32**(3):159-168
- Winandy, L., Hilpert, F., Schlebusch, O., Fischer, R. (2018).** Comparative analysis of surface coating properties of five hydrophobins from *Aspergillus nidulans* and *Trichoderma reesei*. *Sci Rep* **8**(1):12033
- Wohlleben, W., Subkowski, T., Bollschweiler, C., von Vacano, B., Liu, Y., Schrepp, W., Baus, U. (2010).** Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *Eur Biophys J* **39**(3):457-468
- Wösten H.A.B., Wessels, J.G.H. (1997).** Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience* **38**(3):363-374

- Wösten, H.A.B., Richter, M., Willey, J.M. (1999).** Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. *Fungal Genet Biol* **27**(2-3):153-160
- Wösten H.A.B., de Vocht, M.L. (2000).** Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta* **1469**(2):79-86
- Wösten, H.A.B., Scholtmeijer, K. (2015).** Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**(4):1587-1597
- Wu, M., Hancock, R.E.W. (1999).** Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5):1274-1276
- Wu, J.M., Jan, P.S., Yu, H.C., Haung, H.Y., Fang, H.J., Chang, Y.I., Cheng, J.W., Chen, H.M. (2009).** Structure and function of a custom anticancer peptide, CB1a. *Peptides* **30**(5):839-848
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W. (2001).** Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* **81**(3):1475-1485
- Yazici, H., O'Neill, M.B., Kacar, T., Wilson, B.R., Oren, E.E., Sarikaya, M., Tamerler, C. (2016).** Engineered chimeric peptides as antimicrobial surface coating agents toward infection-free implants. *ACS Appl Mater Interfaces*. **8**(8):5070-5081
- Yoon, S.H., Kim, S.K., Kim, J.F (2010).** Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent Pat Biotechnol* **4**:23-29
- Zarzuela, R., Carbú, M., Gil, M.L.A., Cantoral, J.M., Mosquera, M.J. (2017).** CuO/SiO₂ nanocomposites: A multifunctional coating for application on building stone. *Mater Des* **114**:364-372
- Zasloff, M. (1987).** Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(15):5449-5453
- Zhao, C., Nguyen, T., Boo, L.M., Hong, T., Espiritu, C., Orlov, D., Wang, W., Waring, A., Lehrer, R.I. (2001).** RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(10):2695-2702
- Zhao, L., Xu, H., Li, Y., Song, D., Wang, X., Qiao, M., Gong, M. (2016).** Novel application of hydrophobin in medical science: a drug carrier for improving serum stability. *Sci Rep* **6**:26461

Zhao, Z.X., Wang, H.C., Qin, X., Wang, X.S., Qiao, M.Q., Anzai, J., Chen, Q. (2009). Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing. *Colloids Surf B Biointerfaces* **71**(1):102-106

Zhu, S. (2007). Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS α defensins. *Mol Immunol* **45**(3):828-838

Ziegenbalg, G. (2008). Colloidal calcium hydroxide - a new material for consolidation and conservation of carbonatic stones. *Proc of the 11th Intl Cong on Deterioration and Conservation of Stone* **3**:1109-1115

Zorba, V., Stratakis, E., Barberoglou, M., Spanakis, E., Tzanetakis, P., Anastasiadis, S.H., Fotakis, C. (2008). Biomimetic artificial surfaces quantitatively reproduce the water repellency of a lotus leaf. *Adv Mater* **20**(21):4049-4054

Bildquellen :

Kölner Dom

https://www.dbu.de/123artikel30448_2442.html, 28.08.2018 13:29

Sint-Baafs Kathedrale

<https://www.sintbaafskathedraal.be/en/visit.html>, 28.08.2018 13:34

Publikationsliste

Winandy, L., Hilpert, F., Schlebusch, O., Fischer, R. (2018). Comparative analysis of surface coating properties of five hydrophobins from *Aspergillus nidulans* and *Trichoderma reesei*. *Sci Rep* **8**(1):12033

Roveri, M., Gherardi, F., Goidanich, S., Gulotta, D., Castelvetro, V., Fischer, R., Winandy, L., Weber, J., Toniolo, L. (2018). Self-cleaning and antifouling nanocomposites for stone protection: properties and performances of stonenanomaterial systems. *IOP Conf Series: Mater Sci Eng* **364**:012070

Fokina, O., Fenchel, A., Winandy, L., Fischer, R. (2016). Immobilization of LccC laccase from *Aspergillus nidulans* on hard surfaces via fungal hydrophobins. *Appl Environ Microbiol* **82**(21):6395-6402

Fokina, O., Eipper, J., Winandy, L., Kerzenmacher, S., Fischer, R. (2014). Improving the performance of a biofuel cell cathode with laccase-containing culture supernatant from *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour Technol* **175**:445-453

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bei meinem Betreuer Prof. Dr. Reinhard Fischer für die Möglichkeit bedanken, meine Promotion auf einem so interessanten Forschungsgebiet durchgeführt haben zu dürfen. Vielen Dank auch für die gute Betreuung, die vielen Ratschläge und deine Hilfestellung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Jörg Kämper, der sich dazu bereit erklärt hat das Korreferat zu übernehmen.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt dir Alex. Du hattest die ganzen Jahre immer ein offenes Ohr für mich und standst mir mit Rat und Tat zur Seite.

Einem großen Danke bin ich auch dem Keller verpflichtet. Danke Max, Benni, Christoph und Elke für das super Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, die Freizeitbeschäftigungen und die Freundschaft an sich.

Danke auch an den Rest der Mikrobiologie-Gruppe, an die Requenas und an die Kämpers, sowie an alle Mitarbeiter des Instituts, die immer eine Antwort auf meine Fragen hatten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir mein Studium in dieser Form ermöglicht haben und meine Entscheidungen immer unterstützt und respektiert haben.

Als letztes möchte ich mich bei meiner Freundin Freddy bedanken. Vielen, vielen Dank für deine unermüdliche Unterstützung, deine Liebe und die Kraft, die du mir gibst.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Comparative analysis of surface coating properties of five hydrophobins from *Aspergillus nidulans* and *Trichoderma reesei*

Lex Winandy¹, Felix Hilpert², Oleksandra Schlebusch¹ & Reinhard Fischer¹

Fungal hydrophobins are small amphiphilic proteins that self-assemble into monolayers on hydrophobic:hydrophilic interfaces and can be used for surface coatings. Because e.g. *Aspergillus nidulans* contains six different hydrophobins, it is likely that they have different properties and are used for different “applications” in the fungus. We established a method for recombinant production of different class hydrophobins in *Escherichia coli*. We produced DewA, DewC, DewD, DewE from *A. nidulans* and HFBI from *Trichoderma reesei* and compared surface coating properties of these hydrophobins. All tested proteins formed coatings on glass, strongly increasing the hydrophobicity of the surface, and showed emulsion-stabilizing properties. But whereas the typical class I hydrophobin DewA formed the most stable coating on glass, the intermediate class hydrophobins DewE and DewD were more effective in stabilization of oil:water emulsions. This work gives insights into correlations between structural characteristics of hydrophobins and their behaviour as surface binding agents. It could help with the clarification of their biological functions and lead to novel biotechnological applications.

Hydrophobins are small amphiphilic proteins that self-assemble into monolayers on hydrophilic and hydrophobic surfaces and change their properties^{1–3}. Fungi secrete these proteins to reduce surface tension and support hyphae growth or to increase the hydrophobicity of conidiospores, aerial hyphae and fruiting bodies^{2,4,5}.

Hydrophobins are cysteine rich proteins that are characterized by four intramolecular disulfide bridges⁶. Depending on their structural features, like for example the lengths of the loop between the cysteine residues, hydrophobins are divided into two classes⁶. However, several hydrophobins have been identified that do not fit into either of the two classes, like for example the protein DewD from *A. nidulans*^{4,7,8}. Generally, class I hydrophobins form highly stable layers that can withstand detergents and high temperatures. Their formation involves conformational changes of the protein molecules upon interaction with one another and formation of amyloid fibrillar structures^{9,10}. These layers on conidiospore surface are highly structured and shaped into so called rodlets, approximately 10 nm in height. The layers formed by the class II hydrophobins are less stable and can be dissolved by ethanol, detergents or pressure^{11–13}.

Various applications, that have been investigated for hydrophobins, include coating and modification of solid surfaces, emulsion and foam stabilization, increasing enzyme activity or antifouling^{14–18}. However, the preparation of hydrophobins from wild type strains is complex and results mostly in milligram amounts of purified protein, due to the low natural production levels or strong binding of the proteins to the fungal cell wall^{13,19}. Heterologous production of hydrophobins was first attempted in *Escherichia coli* with the *Neurospora crassa* class I hydrophobin EAS²⁰. Recently a method of industrial-scale production in *E. coli* has been developed with modified DewA hydrophobin from *A. nidulans*²¹. Time-consuming and expensive downstream purification steps prior to hydrophobin usage have been reported for HGFI²² and CMiI1, CMiI2 and CMiI3, all produced in *P. pastoris*²³. It has also been reported for two Class II hydrophobins HFB4 and HFB7 from *T. virens* that the production host,

¹Department of Microbiology, Institute for Applied Biosciences, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany. ²Institute of Chemical Process Engineering, Mannheim University of Applied Sciences, Mannheim, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.S. (email: oleksandra.schlebusch@kit.edu)

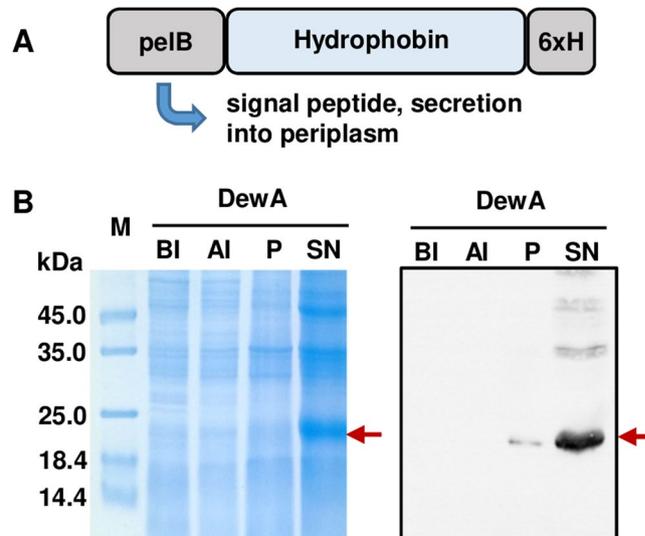


Figure 1. Recombinant hydrophobin production. (A) Design outline of the expressed hydrophobins with N-terminal *pelB* leader sequence and C-terminal 6xHis tag for detection. (B) Detection of the hydrophobin DewA during purification by Coomassie stained 15% SDS-polyacrylamide gel and protein immunoblot detection (15 sec exposure). BI - before induction, AI - after induction, P - pellet after inclusion body purification, SN - soluble protein in supernatant after purification. Arrow indicates the DewA protein monomer. Full-length gel and blot are presented in Supplementary Figure S1.

E. coli or *P. pastoris*, influences the surface binding properties of produced proteins²⁴. No production method for hydrophobins has been universally established so far.

A. nidulans possesses six hydrophobins that are present on the conidiospore surface⁴. Most of these hydrophobins belong to class I can potentially be used for highly stable surface functionalization. DewA contributes to the spore hydrophobicity and has been so far established as the first-choice hydrophobin from *A. nidulans* for biosynthetic surface modification^{14,15,25,26}. Hydrophobins RodA and DewB both possess a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor for immobilization on the spore surface and both contribute to the hydrophobicity of the conidiospore surface of *A. nidulans*⁴. Due to the anchor they are less suitable for application in soluble form. The deletion of the anchor, as shown for the DewB protein, results in almost complete loss of surface binding properties for this protein¹⁴. The function and surface binding properties of other hydrophobins from *A. nidulans* are less studied. They are all present on the spore surface, with DewD and DewE also expressed in hyphae⁴. Several of them (DewA, DewB, RodA and DewC) are induced in the presence of lignocellulose, with RodA and DewC directly contributing to *A. nidulans* growth on lignocellulose^{14,27}. It can be assumed that they all fulfil specific functions and that their biochemical or biophysical properties vary. Likewise, in for example *Schizophyllum commune* the Sc3 hydrophobin is expressed in aerial hyphae and the Sc1 and Sc4 hydrophobins are expressed in hyphae of fruiting bodies, suggesting different cellular functions and interesting specific properties of each hydrophobin²⁸.

In this study we have implemented a universal method for heterologous production and purification of soluble class I hydrophobins (DewA, DewC, DewE from *A. nidulans*), an unknown class hydrophobin (DewD from *A. nidulans*) and class II hydrophobin (HFBI from *T. reesei*) in *E. coli*. To assess the suitability of different hydrophobins for biosynthetic surface modification, we have characterized their surface binding properties and analysed the long-term stability of the formed layers and their resistance towards temperature, UV light, ethanol and detergent. We have also tested the stabilizing effect of these proteins on water:oil emulsions to test their potential application as emulsion or foam stabilizers.

Results

Design of modified hydrophobins for production in *E. coli*. Efficient heterologous production of hydrophobins often requires modifications of the original protein sequence to ensure the correct biosynthesis and intracellular localization suitable for purification of these cysteine-rich amphiphilic proteins. We have modified the hydrophobins DewA, DewC, DewE, DewD from *A. nidulans* and HFBI from *T. reesei* by fusing them N-terminally with the pectate lyase B leader sequence *pelB*²⁹ and C-terminally with a His-tag (Fig. 1A). It has been shown previously that the fusion of *pelB* to the HIV-1 protein Vpu is a suitable method for the expression of membrane-targeted proteins in *E. coli*, and also Class II hydrophobins^{24,30}. Fused to PelB the proteins are directed to the bacterial periplasm from where they can be purified by denaturation and renaturation from inclusion bodies. Compared to another peptide modification with the YaaD fragment from *Bacillus subtilis*, introduced for hydrophobin purification in *E. coli*²¹, the PelB peptide is smaller and is less likely to interfere with the surface binding properties of the hydrophobins. The His-tag was added to the hydrophobins for immunodetection and potential downstream purification steps, for example if the crystallization of the protein would be eligible. The purification of recombinant hydrophobins was carried out from *E. coli* periplasm using alkaline pH and resulted in almost

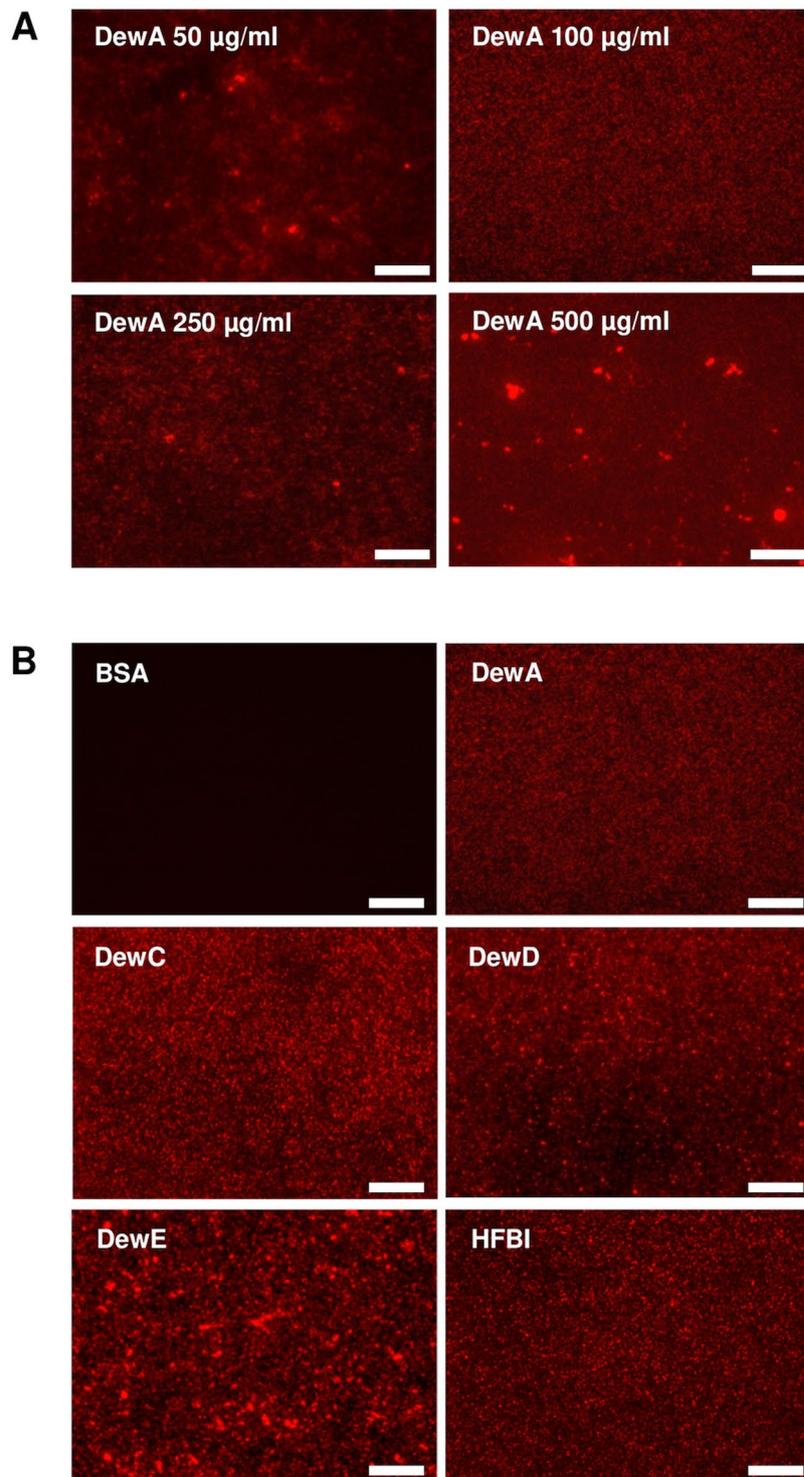


Figure 2. Hydrophobin coating on glass slides visualized by fluorescence microscopy. (A) DewA coated glass slides with different protein concentrations in the coating solution. (B) Glass slides coated with the 5 different hydrophobins with a protein concentration of 100 µg/ml. BSA was used as negative control. Scale bar = 20 µm.

complete solubilization of the produced hydrophobins (Fig. 1B). From one liter culture following hydrophobin concentrations have been achieved in final volume of 20 ml each: 2.3 mg/ml DewA, 3.4 mg/ml DewC, 2.1 mg/ml DewD, 1.9 mg/ml DewE, 1.3 mg/ml HFBI.

Fluorescence microscopy of hydrophobin coated glass. To determine the protein concentration suitable to generate even and uniform hydrophobin coatings, clean glass slides were coated with DewA solution with different protein concentrations ranging from 50 µg/ml up to 500 µg/ml. Hydrophobin coatings were visualized

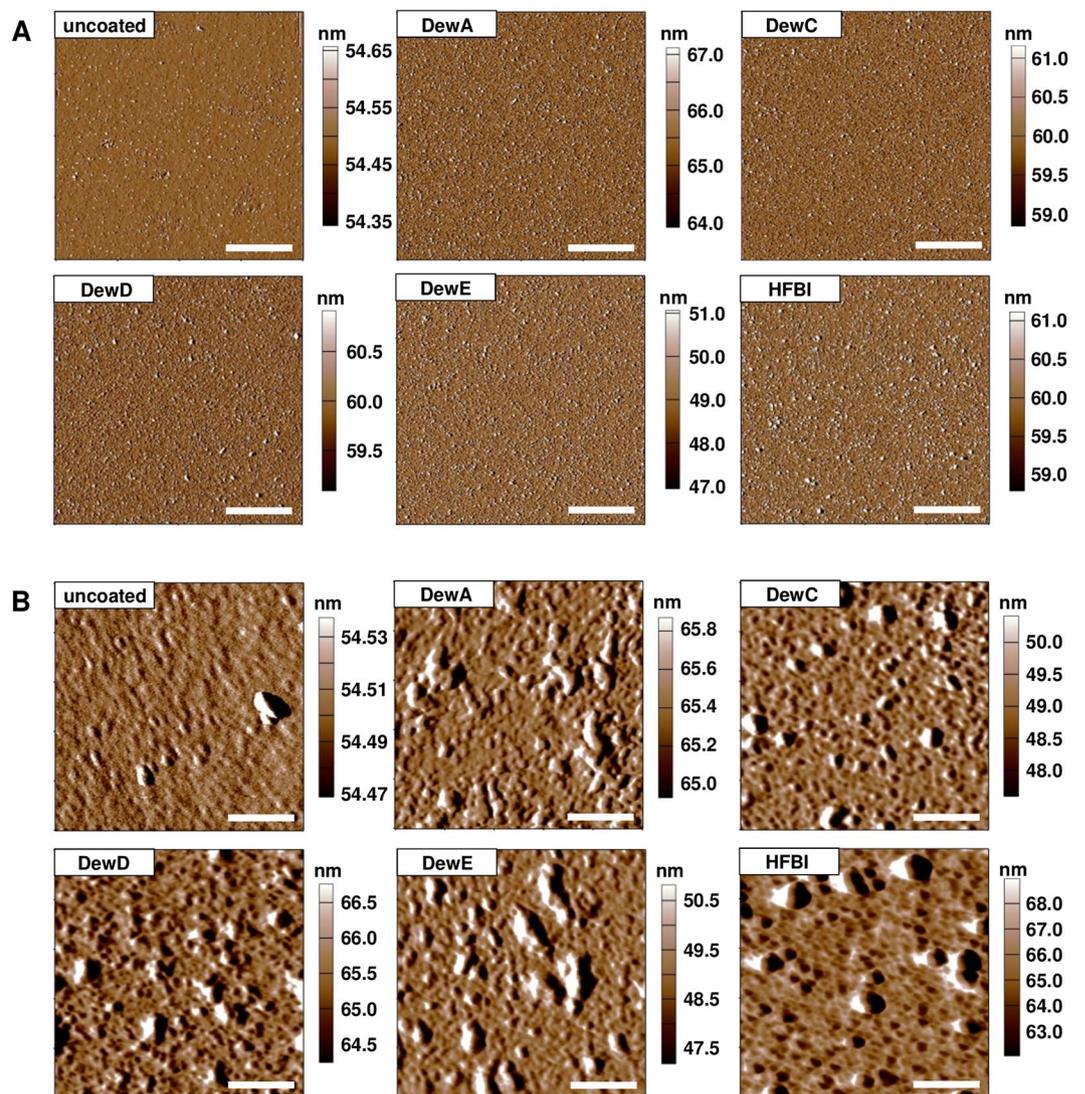


Figure 3. Atomic force microscopy of hydrophobin coated glass surfaces. Depicted are amplitude images of scans of 400 μm² (A) and 1 μm² (B).

by fluorescence microscopy with an α -His primary antibody and a Cy3-labelled secondary antibody. A uniform layer was achieved with protein concentrations of 100 μg/ml and 200 μg/ml (Fig. 2A). Lower concentrations led to an uneven coating, whereas higher concentrations resulted in the formation of big hydrophobin aggregates on the surface. The protein concentration of 100 μg/ml was chosen for all further surface coating experiments. The results achieved with the hydrophobins DewC, DewD, and HFBI did not differ substantially from the DewA layers at 100 μg/ml concentration (Fig. 2B). DewE coating showed, however, a more uneven and grained layer structure on glass surface. This result could not be altered by lower or higher DewE concentration in the coating solution (see Supplementary Fig. S2).

Atomic force microscopy of coated surfaces. To analyse the structure of the hydrophobin layer on glass surface, atomic force microscopy (AFM) was performed. Amplitude images with 20 μm side length resembled the ones generated by fluorescence microscopy. A uniformly patterned, 3D-structured protein layer was observed for all five hydrophobin coatings on scans of 400 μm side length and was missing on untreated glass (Fig. 3A). A more detailed view of the surface was generated with scans of 1 μm side length and a slightly higher cantilever resonance frequency (Fig. 3B). Small globular structures of 10 to 20 nm were observed underlying bigger aggregates with an average diameter of 100 nm. Rodlet structures, typical for hydrophobin layers on for example native conidiospore surface⁴, were not observed for the four tested *A. nidulans* hydrophobins, or for HFBI from *T. reesei*. The height profile of the DewA coating revealed a maximal aggregate thickness of 8 nm (Fig. 4A). This was comparable to the results obtained for DewC, DewD, HFBI, but for DewE a height up to 20 nm could be observed (see Supplementary Fig. S3), which corresponds to the results obtained with immunofluorescence microscopy. Additionally, adhesion force measurements were carried out to check, if the coating of glass with hydrophobins leads to a hard or soft sticky surface. The displacement of the cantilever when pulled back from the DewA-coated

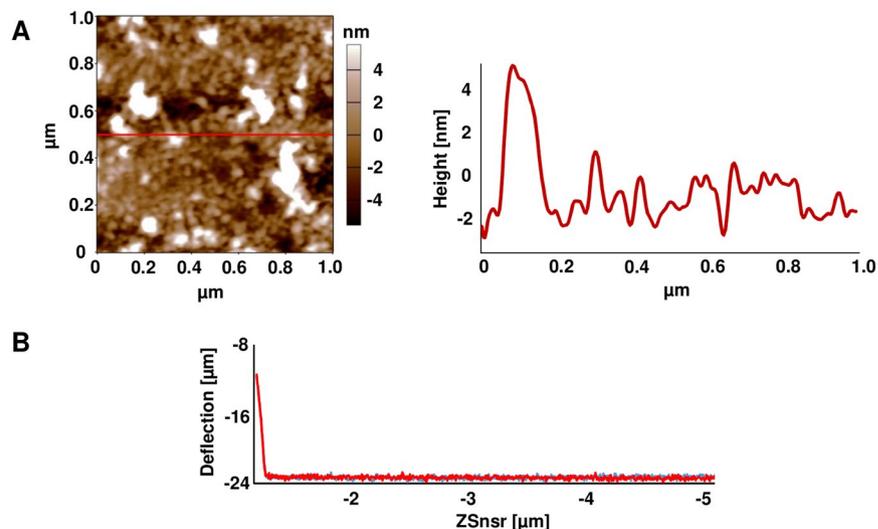


Figure 4. Height and adhesion characterization of the DewA coating. (A) AFM height image with height profile. (B) Adhesion force measurement of DewA coated glass. Plotted is the displacement between the cantilever and the resting position of the sample surface on the X axis against the deflection of the cantilever on the Y axis. Depicted in red is the convergence, in blue the divergence of the cantilever and the surface.

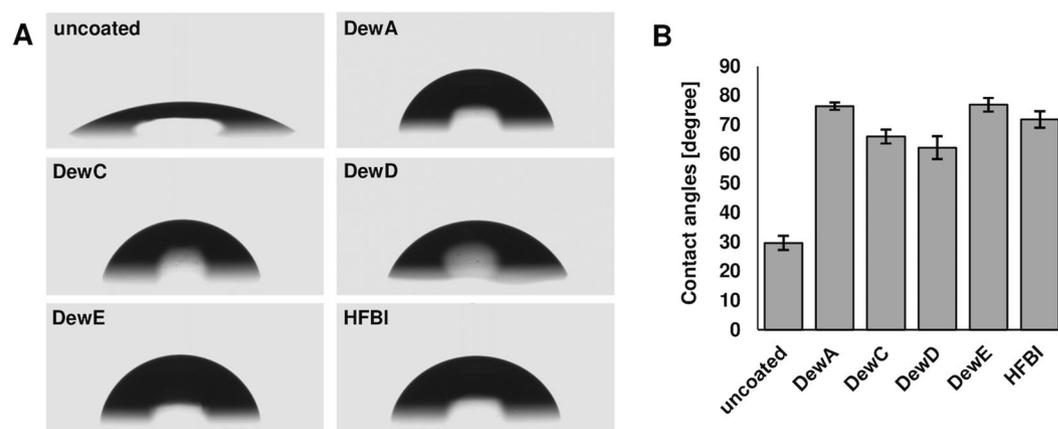


Figure 5. Water contact angle measurements of hydrophobin coated glass slides. (A) Pictures of water droplets on bare and hydrophobin coated glass. (B) Contact angle measurements of hydrophobin coated glass slides. Data shown as mean ± standard deviation with $n = 20$.

surface showed no deflection from the initial trajectory leading to the surface, showing that the modified surfaces had no sticky characteristics (Fig. 4B). Similar results were achieved with other hydrophobins (see Supplementary Fig. S3).

Determination of the hydrophobic effect of hydrophobin coatings. The static water contact angles of a water droplet on hydrophobin-coated glass slides were measured to analyse the effect of hydrophobins on the hydrophobicity of the glass surface (Fig. 5A). Coatings with class I hydrophobins DewA and DewE generated the most hydrophobic surfaces with measured contact angles of $76.3 \pm 0.6^\circ$ and $76.8 \pm 1.2^\circ$ respectively, compared to the untreated glass with $29.6 \pm 2.4^\circ$ (Fig. 5B). DewC and DewD coated glass showed slightly less hydrophobic effect with $66.0 \pm 1.2^\circ$ and $62.2 \pm 1.9^\circ$ respectively. The hydrophobic effect of the Class II hydrophobin HFBI with a mean contact angle of $71.8 \pm 1.4^\circ$ lied in the middle. Generally, all hydrophobin coatings showed a strong hydrophobic effect on glass.

Stability of the hydrophobin coatings. Alongside the ability of hydrophobins to form uniform layers and modify the characteristics of coated surfaces, the stability of such modification plays an essential role in technical applications of these proteins. Therefore, we have tested the resistance of the coatings on glass towards temperature, UV light, 70% ethanol, 1% SDS detergent and in deionized water. To determine how much protein was left on the surface after the specific treatments, immunofluorescence detection of hydrophobin coatings

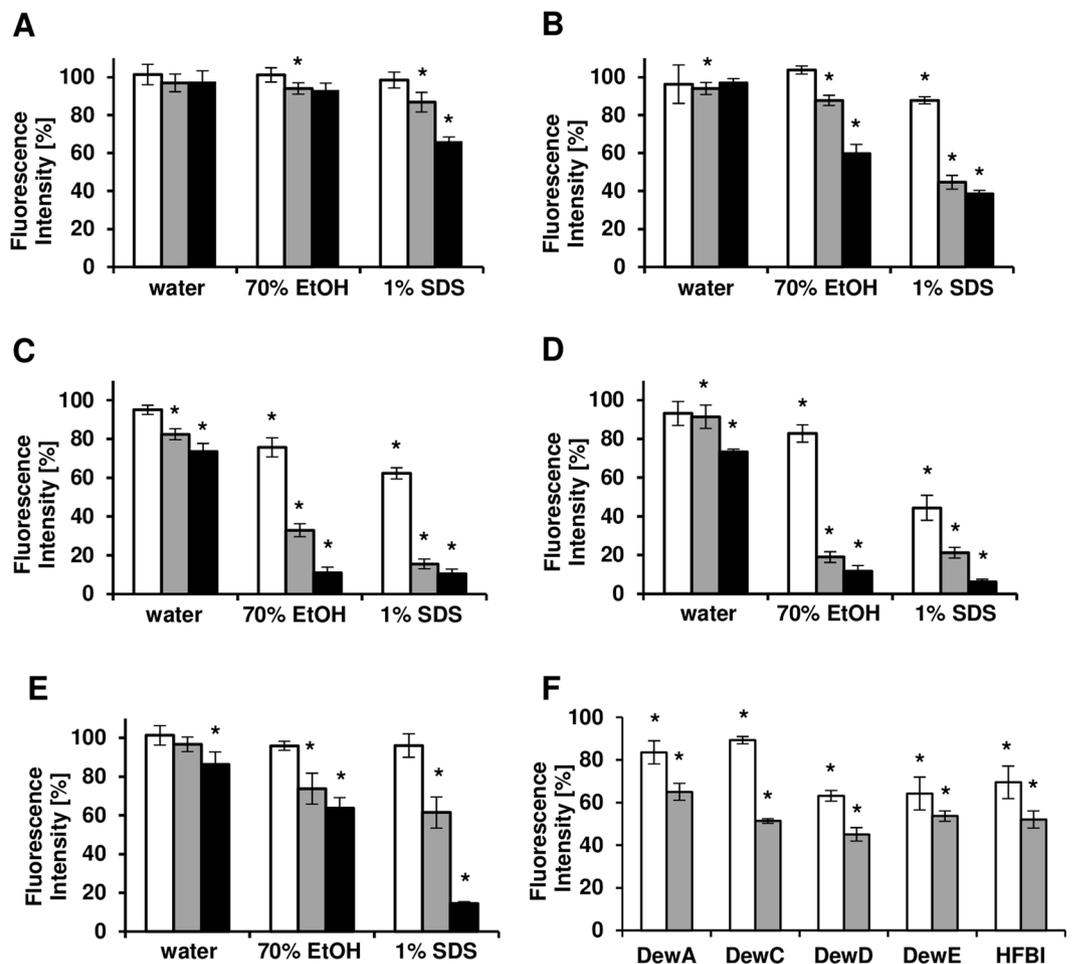


Figure 6. Stability assay of hydrophobin coatings. Diagrams showing the fluorescence intensity of the remaining DewA (A), DewC (B), DewD (C), DewE (D) and HFBI (E) coating after 1 day (white), 3 days (grey) and 7 days (black) in water, 70% EtOH or 1% SDS. (F) Diagram showing the fluorescence intensity of the remaining coating after illumination with UV-C (white) and heating at 80 °C (grey). Data shown as mean \pm standard deviation with $n = 18$ (* $p < 0,01$).

treated with different solutions was used. For the protein wash-out treatments half of the glass slide wells were not submerged and therefore set as an untreated control with the measured fluorescence intensity defined as 100% for that specific glass slide only (see Supplementary Fig. S4). Three regions of interest on 6 different images were analysed for each condition and time point resulting in a total $n = 18$. DewA coatings were the most stable towards water, ethanol and SDS treatments (Fig. 6A). After 7 days incubation in water, 97.6% of the fluorescence intensity was maintained. 70% ethanol reduced the fluorescence intensity down to 92.3% and 1% SDS to 66.2%. For DewC coating the incubation in water for 7 days resulted in a loss of 2.9% fluorescence (Fig. 6B). After the treatments with ethanol and SDS only 59.2% and 38.6% of the initial fluorescence signal was detected for this protein. DewD and DewE formed the less stable coatings on glass (Fig. 6C,D). After a week in water, only 73.6% of the coating was left in samples with DewD and 73.3% for DewE. The hydrophobins could be removed nearly entirely with ethanol and SDS. The stability of the class II hydrophobin HFBI coating was comparable to that of DewC for water and ethanol (Fig. 6E). SDS has removed 85.6% of the coating, resulting in a remaining fluorescence intensity of 14.4%.

Illumination with UV-C for 20 min led to a reduction of the hydrophobin coating of 16.4% for DewA, 10.9% for DewC, 36.9% for DewD and 35.8% for DewE (Fig. 6F). HFBI coating was reduced to 69.5%. After the incubation for 2 hours at 80 °C (dry heat), DewA coating was reduced to 65.0%. DewD showed the least stable coating towards heat and only 45.0% of the initial coating was left after baking. DewC, DewE and HFBI showed similar stability towards heat with remaining coatings of 51.4%, 53.6% and 52.1%.

Clearly, though it was previously shown that class I hydrophobins in contrast to class II form highly stable layers on solid surfaces, the hydrophobin affiliation with a certain class doesn't necessarily determine the stability of the hydrophobin-formed layer. However, the class I hydrophobin DewA showed the highest resistance towards all treatments, as expected.

Emulsion stabilization by soluble hydrophobins. Several tested hydrophobins, especially DewD and DewE, formed relatively unstable coating on glass, as demonstrated in the Fig. 6. The possibility to use these

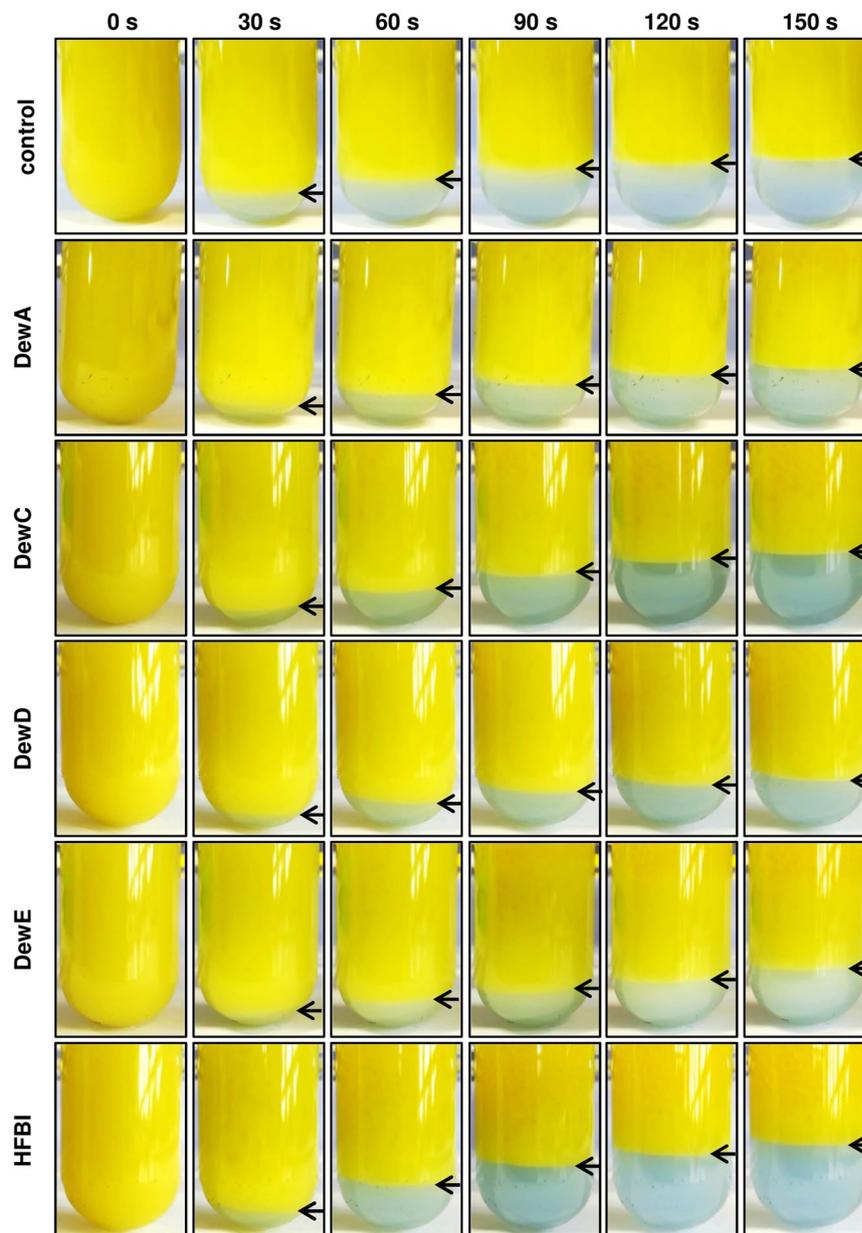


Figure 7. Emulsion stabilization assay. Hydrophobins were dissolved to a final concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ in ddH_2O and vortexed with the same volume canola oil to generate an homogenous emulsion. Final hydrophobin concentration in the mixture 100 $\mu\text{g/ml}$. Phase separation was documented by video recording.

proteins in soluble form for emulsion stabilisation was tested on the oil:water mixture. Already 100 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of the hydrophobins DewA, DewE and especially DewD have shown a stabilizing effect on the emulsion, compared to the sample without hydrophobin (Fig. 7). However, DewC and HFBI showed no such effect in the given concentration. With the increasing hydrophobin concentration the emulsifying effect was increased for all tested proteins (see Supplementary Fig. S5).

Discussion

The mechanism of the hydrophobin self-assembly into monolayers on hydrophilic:hydrophobic interfaces has been addressed in various studies in the last years. Both structural characteristics of the proteins and the nature of interface have been shown to influence the layer organization and the formation of rodlets^{10,31,32}. Though most studies analysed and compared single or few representatives of class I or II hydrophobins, filamentous fungi often contain several hydrophobins that belong to a single class³³. It has also been shown that these hydrophobins are often expressed during different stages of organism development, have different localization or exhibit different functions^{4,28,34}.

Our results show that hydrophobins from a single organism that belong to the same class can exhibit various surface binding characteristics. The tested hydrophobins from *A. nidulans* DewA, DewC, DewD, DewE and HFBI

Primer	Sequence (5'-3')
DewA fw	ATGCATGCGCTTCATCGTCTC
DewA rev	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCCTCAGCCTTGGTACCAG
DewC fw	ATGCATGCAATTCACAATCGC
DewC rev	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCGAGAACCTGGACAGGAAC
DewD fw	ATGCATGCATCTTCCACCTCC
DewD rev	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCCTTGCAACGCCATCAC
DewE fw	ATGCATGCTTATGAAGGTCGCCACTGC
DewE rev	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCGTGGCCGTGCTCCAG
HFBI fw	ATGCATGCAGCCGTAGAAAGATC
HFBI rev	ATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCTGCGCCACGGC
pelB fw	AACCATGGATGAAATCGTTCATCGCGCCGATCGCTGCGGGCCTGCTGCTGGCCCTGTCTCAGCCGCTGCTGGCTGGCATGCAA
pelB rev	TTGCATGCCAGCCAGCAGCGGCTGAGACAGGGCCAGCAGCAGGCCCGCAGCGATCGGGCGCGATGAACGATTTCATCCATGGTT

Table 1. Primers used in this study. The underlined sequences represent the restriction sites for cloning. The italicized sequences represent the 6xHis tag.

from *T. reesei* were all efficient in forming glass surface coatings, thereby increasing the hydrophobicity of glass. Mostly, the hydrophobins formed a uniform layer, with the exception for DewE, which formed protein aggregates, visible both via immunofluorescence and atomic force microscopy. The analysis of the coating resistance towards ethanol, detergent, temperature and UV revealed major differences in the hydrophobin layer characteristics. Only the DewA protein layers showed the class I typical high resistance towards water, ethanol, detergent and temperature treatments. Also, as expected, the HFBI protein, which is a class II hydrophobin, has formed less stable layers on the glass surface. Other hydrophobins from *A. nidulans* demonstrated lower resistance towards mentioned treatments than expected. The DewE protein showed most distinctions in both layer formation and stability compared to other tested proteins. It not only formed larger protein aggregates on surface, but was also almost completely removed by both ethanol and SDS treatments that interfere with the hydrophobic interactions between the hydrophobin molecules. This sensitivity could be explained by the nontypical structure of the DewE protein compared to other class I hydrophobins⁴. Though the DewE hydrophathy pattern was previously identified as similar to class I hydrophobins, two hydrophobic unstructured loops that are conserved in typical class I hydrophobins DewA, RodA and DewB from *A. nidulans* are shifted in the DewE protein⁴. Another hydrophobin that showed low resistance towards treatments with ethanol and SDS, DewD, has even more distinct hydrophobicity pattern in comparison to other hydrophobins from *A. nidulans* and could not be assigned to any class⁴. Both protein layers also showed higher sensitivity towards UV-C and temperature treatments than DewA. On the other hand they showed the best emulsion stabilization effect in oil:water emulsion. The DewC protein, though assigned to class I hydrophobins based on its secondary structure, showed coating stability characteristic close to the HFBI protein.

Recently, the classification into two classes has more and more been questioned and intermediate, unknown or third class of hydrophobins has been proposed, based on the analysis of protein sequences and hydrophobicity profiles^{7,8}. Our results underline these analyses with experimental data on coating and emulsifying properties, showing how the structural complexity of these proteins is reflected in the physical characteristics of the hydrophobin constructs. And though some typical class I or II hydrophobins with classical surface coating characteristics can be found in different fungi, many of these proteins, like for example DewC, DewD and DewE from *A. nidulans*, elude the typical classification. These proteins exhibit unique structural and functional features. Through further characterization of these untypical hydrophobins, their structure and behavior on different hydrophobic:hydrophilic interfaces, the relationship between their structural characteristics and certain biochemical features and possibly the mechanisms of their action in fungi could be clarified. Also, whereas classical class I hydrophobins like DewA are suitable for functionalization of solid surfaces, the intermediate or unknown class hydrophobins, like DewD and DewE, show potential as foam or emulsion stabilizers in the food industry, as demonstrated by this study.

Methods

Strains and growth conditions. The *A. nidulans* strain GR5 (*pyrG89; wa3; pyroA4; veA1*)³⁵ was cultivated for two days in supplemented liquid minimal medium (MM)³⁶ before RNA extraction. *Escherichia coli* strains TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and SHuffle[®] T7 (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) were used for molecular biology techniques and protein expression respectively. Standard *E. coli* cultivation was carried out in lysogeny broth (1% trypton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)³⁷, protein expression in EC3 medium: 1.5% trypton, 1.5% yeast extract, 3% glycerol, 0.2% KH₂PO₄, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% MgSO₄ x 7 H₂O, 0.01% CaCl₂ x 2 H₂O, 0,1% SL4 trace elements¹⁵.

Plasmid construction. For the amplification of the *A. nidulans* hydrophobin genes *dewA*, *dewC*, *dewD* and *dewE* from cDNA, the mycelium from a two days old *A. nidulans* GR5 culture was filtered through miracloth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), grinded in liquid nitrogen and RNA was isolated with the E.Z.N.A. Fungal RNA Kit (Omega Biotek, Norcross, USA). After DNA digestion with the TURBO DNA-free[™] Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), cDNA was synthesized with the SuperScript[™] IV First Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). HFBI coding gene was synthesized *in vitro* (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium), sub cloned in pJET1.2 vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and

amplified by PCR. PCR fragments were cloned into pET28a vector (Novagen, Darmstadt, Germany), carrying a C-terminal His-tag, under the IPTG-inducible (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) T7 promoter using restriction enzymes SphI and HindIII. In a second step, the leader sequence from *Erwinia carotovora* pectate lyase B (pelB)²⁹ was generated by primer dimerization forming duplex DNA and then cloned N-terminally to the hydrophobin genes using NcoI and SphI restriction sites. All primers used are listed in Table 1.

Protein expression and purification. Protein expression from recombinant *A. nidulans* hydrophobins DewA, DewC, DewD and DewE and HFBI from *T. reesei* was carried out in SHuffle[®] T7 Competent *E. coli* cells. 500 ml EC3 medium supplemented with 50 μ g/ml kanamycin were inoculated to an OD₆₀₀ = 0.05 with an overnight culture and incubated at 37 °C and 180 rpm. Upon reaching an OD₆₀₀ = 0.6 protein expression was induced by addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) to a final concentration of 0.5 mM. Cells were harvested the next day and purification from inclusion bodies was performed at alkaline pH without the addition of urea as described previously¹⁵. Solubilized hydrophobins were stored at -20 °C.

Surface coating. The surface coating procedure was adapted from Rieder *et al.*²⁵, with following modifications. Prior to coating glass slides were washed for 30 min in 100% isopropanol, rinsed in deionized H₂O and dried under air flow. Aqueous solutions with 50, 100, 200 and 500 μ g/ml hydrophobin in coating buffer (50 mM Tris pH 8.0, 1 mM CaCl₂) were applied on the glass slides with the hydrophobin of choice and incubated at 60 °C for 2 hours in a humidity chamber to avoid complete evaporation of the coating solution. After incubation the protein solution was removed and the surfaces were subsequently washed three times for 10 min with distilled water and air-dried at room temperature.

Immunofluorescence microscopy. For specific immunodetection of the hydrophobin layers uncoated and hydrophobin-coated glass slides were blocked for 30 min with 10% milk in TBS (Tris-buffered saline) at room temperature. The primary α -His antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), diluted 1:2000 in 1% milk in TBS was applied for 1 hour. The glass slide surface was washed four times for 5 minutes in TBS and the secondary Cy3-labelled antibody to mouse IgG (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) was applied in 1:5000 dilution in 1% milk in TBS for 1 hour in the dark and washed in TBS and water. Imaging was carried out on an AxioImagerZ.1 with an AxioCam MRm camera and the software Zen Pro 2012 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) with the excitation wavelength of 552 nm and emission wavelength of 565 nm.

Atomic force microscopy. Atomic force microscopy (AFM) imaging was carried out on a MFP-3D AFM (Asylum Research, Santa Barbara, USA) with the software Igor Pro 6.35A5 (WaveMetrics, Portland, USA). The imaging process was conducted in tapping mode. Silicon cantilevers (BudgetSensors, Sofia, Bulgaria) were operated at a resonance frequency in the range of 65 kHz to 75 kHz possessing an average spring constant of 3 N/m.

Determination of water contact angles. The static water contact angles of uncoated and coated glass surfaces were measured with an OCA20 and the software SCA 202 v3.12.11 (both DataPhysics Instruments GmbH). 4 μ l deionized water drops were put on the surfaces by the “hanging drop” method and imaged with a CCD camera with a resolution of 768 \times 576 px. An ellipse fit was chosen to approach the droplet form, followed by the determination of the contact angles.

Coating stability assay. To define the stability of the different hydrophobin coatings, the wells of epoxy-coated 8-well diagnostic slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) were coated with hydrophobin. The slides were submerged half in deionized water, 70% ethanol or 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) solution for up to 7 days at room temperature (see Figure S4 for experimental setup).

After 1, 3 and 7 days, slides were rinsed with water and hydrophobin coating was visualized by fluorescence microscopy. For UV stability, coated slides were illuminated for 20 min in an UV-Crosslinker BLX-E254 (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) emitting UV-C with 254 nm. For temperature stability, coated slides were heated to 80 °C for 2 h in a hybridization oven and then analysed by fluorescence microscopy. Fluorescence intensity of taken images was measured with ImageJ. A total of three regions of interest for six images per condition was measured (n = 18). Values given are remaining coating intensity of submerged wells compared to the untreated wells on the same slide. Statistics were carried out using the two-tailed student's t-test assuming equal variance with an alpha level of 0,01. Data were tested for normality using the Anderson-Darling test.

Emulsion stability assay. Due to the amphiphilic character of hydrophobins, their use as emulsifying reagents is widely analysed. Here we chose a simple setup to assess the property of the purified hydrophobins to form stable oil-water emulsions. Hydrophobins were dissolved in water dyed with 25 μ g/ml Remazol Brilliant Blue R for better visualization of the aqueous phase. 2 ml of canola oil were vortexed with 2 ml hydrophobin solution for 30 s (final hydrophobin concentrations 100 μ g/ml and 500 μ g/ml) and phase separation was documented by video recording.

Data availability statement. The datasets generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information file) or are available from the corresponding author on request.

References

1. Wosten, H., De Vries, O. & Wessels, J. Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer. *Plant Cell* **5**, 1567–1574 (1993).
2. Wosten, H. A. & Scholtmeijer, K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1587–1597 (2015).

3. Kershaw, M. J. & Talbot, N. J. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* **23**, 18–33 (1998).
4. Grunbacher, A. *et al.* Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS One* **9**, e94546, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094546> (2014).
5. Valsecchi, I. *et al.* Role of Hydrophobins in *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi (Basel)* **4** <https://doi.org/10.3390/jof4010002> (2017).
6. Wessels, J. Developmental regulation of fungal cell-wall formation. *Ann. Rev. Phytopath.* **32**, 413–437 (1994).
7. Jensen, B. G., Andersen, M. R., Pedersen, M. H., Frisvad, J. C. & Sondergaard, I. Hydrophobins from *Aspergillus* species cannot be clearly divided into two classes. *BMC Res. Notes* **3**, 344, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-344> (2010).
8. Littlejohn, K. A., Hooley, P. & Cox, P. W. Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. *Food Hydrocolloids* **27**, 503–516 (2012).
9. Gebbink, M. F., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L. & Wosten, H. A. Amyloids—a functional coat for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 333–341 (2005).
10. Morris, V. K. *et al.* Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **286**, 15955–15963 (2011).
11. Wosten, H. A. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 625–646 (2001).
12. Wessels, J. G. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microb. Physiol.* **38**, 1–45 (1997).
13. Askolin, S. *et al.* Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules* **7**, 1295–1301 (2006).
14. Fokina, O., Fenchel, A., Winandy, L. & Fischer, R. Immobilization of LccC Laccase from *Aspergillus nidulans* on Hard Surfaces via Fungal Hydrophobins. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 6395–6402 (2016).
15. Boeuf, S. *et al.* Engineering hydrophobin DewA to generate surfaces that enhance adhesion of human but not bacterial cells. *Acta Biomater.* **8**, 1037–1047 (2012).
16. Janssen, M. I. *et al.* Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state. *Biomaterials* **25**, 2731–2739 (2004).
17. Ribitsch, D. *et al.* Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 3586–3592 (2015).
18. Green, A. J., Littlejohn, K. A., Hooley, P. & Cox, P. W. Formation and stability of food foams and aerated emulsions: Hydrophobins as novel functional ingredients. *Curr. Opin. Colloid. In.* **18**, 292–301 (2013).
19. Bailey, M. J. *et al.* Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobins I and II in transformants of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 721–727 (2002).
20. Kwan, A. H. *et al.* Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3621–3626 (2006).
21. Wohlleben, W. *et al.* Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *Eur. Biophys. J.* **39**, 457–468 (2010).
22. Niu, B. *et al.* Expression and characterization of hydrophobin HGFI fused with the cell-specific peptide TPS in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **83**, 92–97 (2012).
23. Gandier, J. A. & Master, E. R. *Pichia pastoris* is a Suitable Host for the Heterologous Expression of Predicted Class I and Class II Hydrophobins for Discovery, Study, and Application in Biotechnology. *Microorganisms* **6**, <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010003> (2018).
24. Przylucka, A. *et al.* Comparative Physicochemical Analysis of Hydrophobins Produced in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **159**, 913–923 (2017).
25. Rieder, A. *et al.* The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on *E. coli* and natural mixed culture biofilm formation. *Biofouling* **27**, 1073–1085 (2011).
26. Weickert, U., Wiesend, F., Subkowski, T., Eickhoff, A. & Reiss, G. Optimizing biliary stent patency by coating with hydrophobin alone or hydrophobin and antibiotics or heparin: an *in vitro* proof of principle study. *Adv. Med. Sci.* **56**, 138–144 (2011).
27. Brown, N. A. *et al.* RNAseq reveals hydrophobins that are involved in the adaptation of *Aspergillus nidulans* to lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 145, <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0558-2> (2016).
28. Wessels, J., De Vries, O., Asgeirsdottir, S. A. & Schuren, F. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* **3**, 793–799 (1991).
29. Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J. & Wilcox, G. Characterization of the *Erwinia Carotovora* Pelb Gene and Its Product Pectate Lyase. *J. Bacteriol.* **169**, 4379–4383 (1987).
30. Deb, A. *et al.* Bacterial expression, correct membrane targeting and functional folding of the HIV-1 membrane protein Vpu using a periplasmic signal peptide. *PLoS One* **12**, e0172529, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172529> (2017).
31. Morris, V. K., Kwan, A. H. & Sunde, M. Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins. *J. Mol. Biol.* **425**, 244–256 (2013).
32. Lo, V. C. *et al.* Fungal Hydrophobin Proteins Produce Self-Assembling Protein Films with Diverse Structure and Chemical Stability. *Nanomaterials (Basel)* **4**, 827–843 (2014).
33. Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T. & Penttilä, M. E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 877–896 (2005).
34. Lacroix, H. & Spanu, P. D. Silencing of six hydrophobins in *Cladosporium fulvum*: complexities of simultaneously targeting multiple genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 542–546 (2009).
35. Waring, R. B., May, G. S. & Morris, N. R. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**, 119–130 (1989).
36. Barratt, R. W., Johnson, G. B. & Ogata, W. N. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**, 233–246 (1965).
37. Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic. *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300 (1951).

Acknowledgements

This project was funded within the European Commission program Horizon 2020 (Project ID 646178, “Nanomaterials for conservation of European architectural heritage developed by research on characteristic lithotypes”). We would like to thank the NanoCathedral project consortium for the great collaboration.

Author Contributions

L.W. developed the methodology, performed the experiments, analysed the results and wrote the manuscript, F.H. participated in carrying out the experiments and data analysis, O.S. designed and coordinated the study, developed the methodology, analysed the results, wrote the manuscript, R.F. designed and coordinated the study, wrote the manuscript. All authors gave final approval for publication.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29749-0>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Immobilization of LccC Laccase from *Aspergillus nidulans* on Hard Surfaces via Fungal Hydrophobins

Oleksandra Fokina, Alex Fenchel, Lex Winandy, Reinhard Fischer

Institute for Applied Biosciences, Department of Microbiology, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

ABSTRACT

Fungal hydrophobins are small amphiphilic proteins that can be used for coatings on hydrophilic and hydrophobic surfaces. Through the formation of monolayers, they change the hydrophobicity of a given surface. Especially, the class I hydrophobins are interesting for biotechnology, because their layers are stable at high temperatures and can only be removed with strong solvents. These proteins self-assemble into monolayers under physiological conditions and undergo conformational changes that stabilize the layer structure. Several studies have demonstrated how the fusion of hydrophobins with short peptides allows the specific modification of the properties of a given surface or have increased the protein production levels through controlled localization of hydrophobin molecules inside the cell. Here, we fused the *Aspergillus nidulans* laccase LccC to the class I hydrophobins DewA and DewB and used the fusion proteins to functionalize surfaces with immobilized enzymes. In contrast to previous studies with enzymes fused to class II hydrophobins, the DewA-LccC fusion protein is secreted into the culture medium. The crude culture supernatant was directly used for coatings of glass and polystyrene without additional purification steps. The highest laccase surface activity was achieved after protein immobilization on modified hydrophilic polystyrene at pH 7. This study presents an easy-to-use alternative to classical enzyme immobilization techniques and can be applied not only for laccases but also for other biotechnologically relevant enzymes.

IMPORTANCE

Although fusion with small peptides to modify hydrophobin properties has already been performed in several studies, fusion with an enzyme presents a more challenging task. Both protein partners need to remain in active form so that the hydrophobins can interact with one another and form layers, and so the enzyme (e.g., laccase) will remain active at the same time. Also, because of the amphiphilic nature of hydrophobins, their production and purification remain challenging so far and often include steps that would irreversibly disrupt most enzymes. In our study, we present the first functional fusion proteins of class I hydrophobins from *A. nidulans* with a laccase. The resulting fusion enzyme is directly secreted into the culture medium by the fungus and can be used for the functionalization of hard surfaces.

Immobilization of enzymes is of increasing importance in biotechnology. It provides various advantages compared to the application of free enzymes in solution, like increased stability, easy recovery, and reuse of the enzymes (1, 2). In some cases, binding to certain surfaces even improved enzyme activity (3). Several methods of immobilization are distinguished and are based on chemical and physical interactions between the enzyme and the surface, each having its own advantages and disadvantages (1, 2). Basic parameters, like maintenance of high enzyme activity, prevention of enzyme leaching, and contamination of the product, are relevant for choosing the right method, depending on the reaction system. Special surface materials, chemical treatments, or spacer molecules are often required to ensure binding of the enzyme in an active form (2). These specifications not only limit the method application but also increase the procedure complexity and costs. An ability of some proteins, like, for example, fungal hydrophobins, to self-assemble in stable layers under physiological conditions presents a clear advantage in the development of enzyme immobilization systems.

Hydrophobins are small amphiphilic proteins that spontaneously form monolayers on hydrophilic and hydrophobic surfaces, changing their characteristics (4–6). In fungi, hydrophobins are secreted to reduce surface tension at the medium-air interface during hyphal growth and are responsible for the hydrophobicity of the aerial structures, such as aerial hyphae, conidiophores,

fruiting bodies, and spores (6). Depending on their structural characteristics, hydrophobins are divided into two classes, with class I protein aggregates binding strongly to surfaces and resisting detergents and high temperatures (5, 7). In contrast, layers of class II hydrophobins can be easily dissolved by pressure, detergents, or ethanol. The assembly of class I hydrophobins in highly stable monolayers is associated with the formation of amyloid fibrillar structures and includes conformational changes of the protein molecules upon interaction (8, 9).

The development of recombinantly produced hydrophobins in *E. coli* opened the possibility to test their application in various systems (10–12). Class I hydrophobins can be used to disperse hydrophobic substances in water and immobilize molecules on solid surfaces, as well as in antifouling (6). The filamentous fungus

Received 10 May 2016 Accepted 9 August 2016

Accepted manuscript posted online 26 August 2016

Citation Fokina O, Fenchel A, Winandy L, Fischer R. 2016. Immobilization of LccC laccase from *Aspergillus nidulans* on hard surfaces via fungal hydrophobins. *Appl Environ Microbiol* 82:6395–6402. doi:10.1128/AEM.01413-16.

Editor: A. A. Brakhage, HKI and University of Jena

Address correspondence to Oleksandra Fokina, oleksandra.fokina@kit.edu, or Reinhard Fischer, reinhard.fischer@kit.edu.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

TABLE 1 Oligonucleotides used for cloning and real-time PCR

Oligonucleotide name	Sequence (5'–3')
gpd(p)fw	TATAGAATTCAATCATCCTTATTCGTTGACC
gpd(p)rev	TATAGGCGCGCCTGTGATGTCTGCTCAAGC
P1SP(lccC)fw	TCTGGTTTCTTCTTTCTATGGG
P2SPdewABlccCfw	TATAGGCGCGCCATGCTGCGTTCTTCTTTCT
P3dewAF1fw	ATGCGCTTCATCGTCTCTC
P3dewBF2fw	GACAAGTTCCTCCGTCCTCC
P5SP(lccC)F1rev	AGAGAGACGATGAAGCGCATGGCAGAAGCATAGAGTGCATA
P5SP(lccC)F2rev	GGGACGGGGAAGTGTGCGGCAGAAGCATAGAGTGCAT
P6dewAF1rev	CTCAGCCTTGGTACCGGC
P6dewBF2rev	CAGAAATGGAGCCAAGGGC
P7SPdewABlccCrev	TATATTAATTAAGTACACCCGAATCATACTG
P8lccCrev	TTTACACAGGAAACAGCTATG
lccCfw	TAGGCGCGCCATGCTGCGTTCTTCTTTCT
lccCrev	TCTTAATTAAGTACACCCGAATCATACTG
QC1LccCAscIdel	GCTGGCGAGCCCAGCAGTACGGGACAAC
QC2LccCAscIdel	CTGGGCTCGCCAGCGGTACGTGTACTC
rtDewAfw	CTCTCGGGCAACACTGG
rtDewArev	GGCAACACAGTTGGTGGTTC
rtDewBfw	GAGTGACCTGCTCGGTG
rtDewBrev	CCACTCTTCGCACAGCAAAG
rtDewALccCfw	GAACCACCAACTGTGTTGCC
rtDewBLccCfw	CTTGCTGTGCGAAGAGTGG
rtDewABLccCrev	CGAGACATCGGTCCCAAAG
rtH2Bfw	TGCCGAGAAGAAGCCTAGCA
rtH2Brev	GAGTAGGTCTCCTTCTGTTG
gpdfwSeq	CCAGTCACGACGTTGTA
lccCfwSeq	GATACAACTACCACGAC
revSeq	GCATGCCTGCAGGTGCGAC

Aspergillus nidulans produces several class I hydrophobins, including a well-studied protein, DewA, which already showed great industrial potential and appears in several patent applications (13, 14). DewA has been used as an emulsion stabilizer, in optimization of biliary stents, in the production of microcapsules, and was even fused to peptides for selective enhancement of human cell adhesion to surfaces (15–17). A DewA-enzyme fusion presents a tempting alternative to conventional methods of highly stable surface functionalization with an enzyme. So far, a functional enzyme fusion was achieved to class II hydrophobins to enhance the activity of cutinases in solution and to create self-organized membranes with glucose oxidase on a solid surface (18–20). Extracellular fungal laccases present a suitable target for fusion with hydrophobins for immobilization due to their monomeric structure, high stability, and great biotechnological potential (21, 22). Different conventional immobilization methods have already been reported for laccases with application in dye decolorization, waste degradation, and in biological fuel cells (23).

Laccases (EC 1.10.3.2) belong to a group of blue oxidoreductases that can oxidize various aromatic and nonaromatic compounds (21, 24). Their redox potential depends on the coordination of copper ions in the catalytic center and serves as a criterion to divide them into three classes (25). *A. nidulans* produces several low-redox-potential laccases with low expression levels in vegetative hyphae (26–28). Since no laccase activity can be detected in supernatants of *A. nidulans* culture under normal growth conditions, no interference with the heterologously expressed laccases occurs. The overexpressed LccC laccase showed higher activity levels in culture supernatant toward the commonly used artificial

substrate ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylthiazoline-6-sulfonate)] than those in the other characterized *A. nidulans* laccases (26).

In this study, we created fusion proteins of the LccC laccase with class I hydrophobins DewA and DewB in *A. nidulans*. The proteins were directly applied for surface functionalization in the form of cell-free crude culture supernatant without additional purification steps. We also tested different hydrophobic/hydrophilic surfaces and experimental settings to determine the optimal conditions for the production and immobilization of hydrophobin-fused laccase.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. The *Aspergillus nidulans* strains GR5 (*pyrG89 wa3 pyroA4 veA1*) (29) and FGSCA4 (Fungal Genetics Stock Center, University of Missouri, Kansas City) were cultivated in supplemented minimal medium (MM) or yeast extract-agar-glucose (YAG) medium (30). Standard cloning and transformation procedures for *A. nidulans* were used (31–33). *Escherichia coli* strain Top10 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used for molecular biology techniques. For laccase and fusion protein production, *A. nidulans* culture was incubated at 28°C and 120 rpm for 2 days in liquid YAG medium with 1% glucose or 2% straw (0.1- to 1-cm pieces) as the source of carbon.

Construction of hydrophobin-laccase fusion proteins. Hydrophobin genes *dewA* and *dewB* (AspGD identification [ID] 1837) from *A. nidulans* were inserted into the *A. nidulans* *lccC* gene after the signal peptide sequence. For this purpose, three separately amplified DNA fragments were merged using a fusion PCR technique with the primers listed in Table 1, as described previously (34). The construct was then cloned into the pMCB17 vector (35) under the control of the constitutive yeast *gpd* promoter with *AscI* and *PacI* restriction enzymes. As a control, the *lccC*

gene was also cloned into the pMCB17 vector under the *gpd* promoter. The *AscI* restriction site in the *lccC* gene was removed using QuikChange PCR. Clones were checked by sequencing. *A. nidulans* GR5 strain was used as the recipient strain for all plasmids.

RNA isolation and quantitative real-time PCR. Conidia (10^7 spores) were inoculated in 50 ml of liquid medium with glucose or straw as the source of carbon in 100-ml Erlenmeyer flasks. After 48 h of incubation, the culture was filtered through Miracloth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and ground in liquid nitrogen. RNA was isolated with the E.Z.N.A. fungal RNA minikit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA). DNA was digested with the Turbo DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and diluted to 50 ng/ μ l. Quantitative real-time PCR was performed using the SensiFAST SYBR and fluorescein one-step kit (Bioline, Luckenwalde, Germany) on an iCycler (Bio-Rad, Munich, Germany). Each reaction mixture contained 0.2 μ M primers and 100 ng of RNA in 25- μ l total volume. The oligonucleotides are listed in Table 1. The program included 10 min of reverse transcription at 45°C for cDNA synthesis, followed by 2.5 min of inactivation of reverse transcriptase at 95°C and 40 PCR cycles (10 s at 95°C and 30 s at 58°C). Melting curve analysis was performed to assess the specific amplification of DNA. The results for each sample from cultures grown in the presence of straw were normalized to the corresponding results with the *h2b* gene and to the normalized sample obtained from cultures grown in the presence of glucose. Each expression level result is the average of the results from five independent experiments.

Laccase activity assay. To measure laccase activity in crude culture supernatant, 10^7 conidia spores were inoculated in 50 ml of liquid YAG medium with glucose or straw as the carbon source. The cultures were harvested 48 h after inoculation by filtering through Miracloth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and a 0.45- μ m-pore-size membrane filter. The laccase activity in culture supernatant was assayed using 1 mM ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylthiazoline-6-sulfonate)] in 50 mM acetate buffer (pH 5) (36). The change in absorbance at 420 nm was detected over a period of 10 min at 25°C with an Ultrospec III spectrophotometer (Pharmacia) or EnSpire multimode plate reader (PerkinElmer, Rodgau, Germany). The laccase activity in solution was calculated using the molar absorption coefficient of ABTS ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ liters} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), with one unit of laccase catalyzing the oxidation of 1 μ mol ABTS per min. The laccase activity on the surface was calculated using the molar absorption coefficient of ABTS in units per square centimeter of the solid surface with immobilized enzyme. One-way and two-way analysis of variance (ANOVA) were performed using the StatPlus:mac LE program (Analyst-Soft, Walnut, CA, USA) to compare the effect of pH and surface hydrophobicity on laccase activity after the immobilization on microtiter plate and glass surfaces. An alpha level of 0.05 was used for all statistical tests.

Surface coating. To test the immobilization of fusion proteins on hydrophobic and hydrophilic microtiter plate surfaces, 96-well nonmodified polystyrene microtiter plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) and cell culture plates with hydrophilic standard growth surface (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used. Coating of glass surfaces was performed on high-precision cover glasses (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and 0.4- to 0.85-mm glass beads (Weissker, Greiz, Germany). To compare the immobilization on glass surfaces with different characteristics, cover glasses were also treated with Sigmacote (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) to generate a hydrophobic surface prior to fusion protein immobilization. The coating procedure was adapted from previous studies (15). Filtered crude culture supernatants were diluted to 0.1 U/ml laccase activity (approximately 0.1 mg/ml total protein), directly applied on glass or polystyrene surfaces, and incubated overnight at 37°C in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5) or sodium phosphate buffer (pH 7) with 1 mM CaCl_2 . For the immobilization in the presence of DewA, recombinant H⁺proteinB containing YAAD-DewA-His (BASF-SE, Ludwigshafen, Germany) was mixed with 0.1 mg/ml laccase-containing culture supernatant in the molar ratios 1:0, 1:0.5, 1:2.5, and 1:5 DewA-LccC:DewA. After incubation, the nonbound proteins were removed, the

surface was washed 5 times for 10 min with 50 mM sodium acetate buffer (pH 5), and the laccase assay was performed under standard conditions.

Determination of water contact angles. The static water contact angles of uncoated and coated glass and polystyrene surfaces were measured with an OCA20 instrument and the software SCA 202 version 3.12.11 (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany). Four microliters of Millipore water was put on the surfaces by the “hanging drop” method and imaged with a charge-coupled-device (CCD) camera. An ellipse fit was chosen to approach the droplet form, followed by determination of the contact angles.

Homology modeling. A Protein Data Bank (PDB) file of the LccC laccase model was generated using the SWISS-MODEL Web server (<http://swissmodel.expasy.org>) by a homology modeling method (37–39). A high-resolution structure (1.7 Å) of a laccase from *Botrytis aclada* (PDB ID 3SQR) with 49.3% sequence identity to LccC was chosen as the template. Figures were generated using PyMOL (www.pymol.org).

RESULTS

Design of fusion proteins. Two class I hydrophobins from *A. nidulans* were chosen for fusion with the LccC laccase. The formation of monolayers on surfaces with the DewA protein is well characterized, and the protein has been previously modified with peptides without impairment of its coating ability (13, 15). Another hydrophobin from *A. nidulans*, DewB, has the typical class I structure but also possesses a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor for immobilization on the spore surface, where it contributes to its hydrophobicity (14). In our constructs, the hydrophobin genes were inserted into the *lccC* gene after the signal peptide sequence (Fig. 1a). This expression strategy was chosen because fusion of the laccase to the C terminus of DewB would mask the GPI anchor recognition site and prevent immobilization of DewB on the spore surface. This fact could increase the probability of obtaining a soluble fusion protein outside the cells. Also, the C terminus of a laccase from *Botrytis aclada*, which shows the highest sequence identity to the LccC laccase, compared to other published crystal structures, lies in the direct vicinity of the catalytic center inside the protein molecule (40). Therefore, a fusion of the hydrophobins to the C terminus of the LccC laccase could impair the three-dimensional structure of the enzyme and affect its activity.

In the resulting fusion proteins, the hydrophobin parts would be responsible for the assembly into a monolayer on the surface, leaving the laccase freely exposed to the surrounding medium (Fig. 1b). Due to the size difference between the LccC laccase and the hydrophobins, we expected that additional native hydrophobin could be added to the coating solution to act as a spacer. These small protein molecules would contribute to the formation of the monolayer and prevent steric hindrance between laccase molecules.

Production of hydrophobin-fused laccase. The fusion constructs were transformed into the *A. nidulans* GR5 strain. As shown in Fig. 2a, almost no laccase was present in the culture supernatants of transformed strains grown in submerged cultures on glucose (DewA-LccC, 0.1 ± 0.1 U/liter; DewB-LccC, 2.9 ± 0.1 U/liter). It is known that glucose represses secretion, whereas enzyme secretion is induced by polymers, such as lignocellulose in filamentous fungi (41). Straw was used as a single source of carbon in submerged culture, which resulted in the highest activity of hydrophobin-fused enzymes 2 days after inoculation (Fig. 2a). The activity of DewB-LccC protein (520.0 ± 146 U/liter) in culture supernatant was 4.5 times higher than that of DewA-LccC

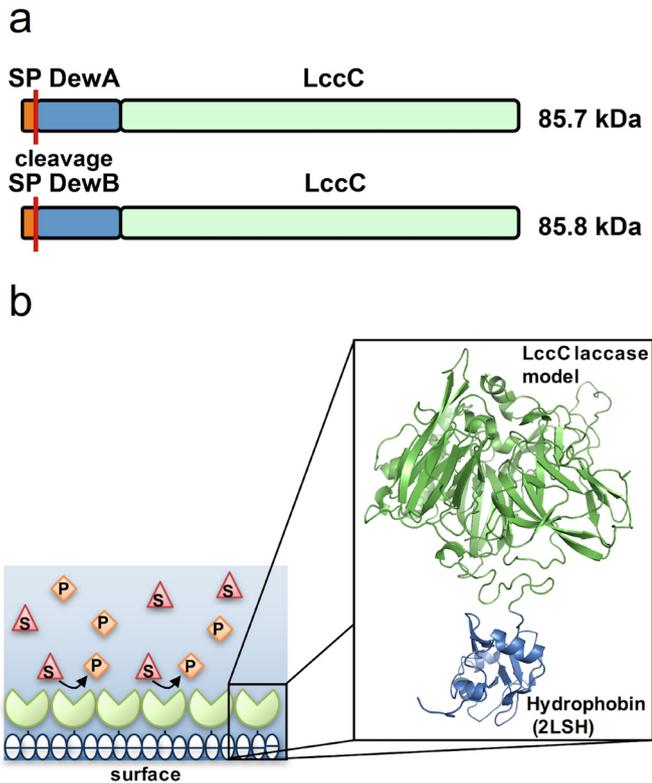


FIG 1 Schematic representation of hydrophobin-laccase constructs and their immobilization on surfaces. (a) DewA-LccC and DewB-LccC constructs. Hydrophobin genes were inserted into the *lccC* gene after the signal peptide sequence (SP) to allow fusion to the laccase. (b) Schematic representation of solid surface coated with hydrophobin-laccase fusion protein. Red triangles represent enzyme substrate, and orange rhombuses represent the product. Magnification shows the structure of DewA hydrophobin (PDB ID 2LSH), colored in blue, and LccC laccase model, colored in green, as strings and ribbons.

(114.7 ± 10 U/liter), which could be explained by the absence of the GPI anchor and artificial solubilization of DewB. DewA, however, does not have the GPI anchor; therefore, no increased secretion of the soluble protein compared to the wild type was expected. As observed in the previous studies (26), no laccase activity was detected in the wild-type strain culture supernatant. The LccC-producing strain showed moderate laccase activity in culture supernatant in the presence of both glucose (52.0 ± 0.1 U/liter) and straw (67.7 ± 11.5 U/liter).

The expression levels of *dewA* and *dewB* genes in wild-type *A. nidulans* strain, as well as the expression levels of artificial *dewA::lccC* and *dewB::lccC* genes, were compared in submerged culture with straw and glucose (Fig. 2b). The housekeeping gene *h2b* was used for the normalization. Both the *dewA* and *dewB* genes were expressed at higher levels in the wild-type strain cultures grown in the presence of straw and, although the fusion proteins were expressed under the control of a constitutive promoter, their expression levels were increased as well. Using straw in submerged cultures also prevented the formation of larger mycelial agglomerates and increased the active surface of cultures, probably contributing to the higher enzyme levels in culture supernatants.

Functionalization of polystyrene surface. Hydrophobin DewA with N-terminal or C-terminal peptide fusions have previ-

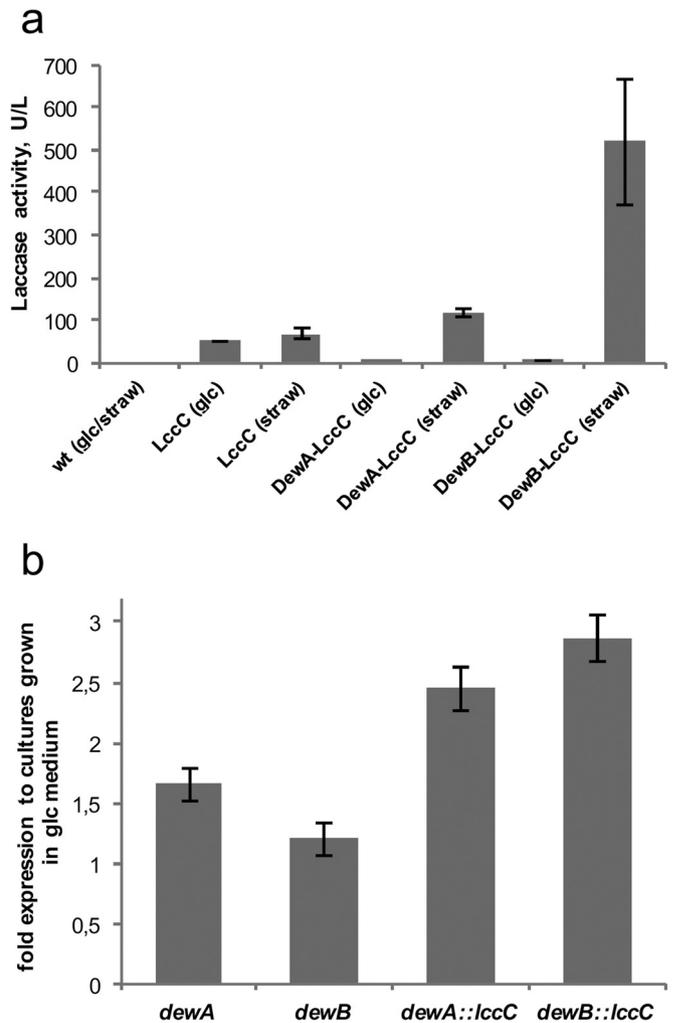


FIG 2 Production of the hydrophobin-fused LccC laccase. (a) Laccase activity in culture supernatant, measured with an ABTS-based assay. The cultures were incubated with glucose (glc) or straw, as indicated. wt, wild type. (b) Expression of *dewA* and *dewB* genes in the wild type and *dewA::lccC* and *dewB::lccC* constructs measured with real-time PCR. The results obtained with straw were normalized to the signals obtained from cultures grown in the presence of glucose. Error bars represent standard deviations from the results from five experiments.

ously been used to coat wells of 96-well microtiter plates (15). Since fusion to a large enzyme, like laccase, could influence the binding ability of hydrophobins, different coating conditions and surfaces were tested. Nonmodified polystyrene microtiter plates were used as hydrophobic surfaces and cell culture plates with standard growth surface as hydrophilic surfaces. The highest activity of $2.5 \times 10^{-4} \pm 0.1 \times 10^{-4}$ U/cm² was achieved on a hydrophilic surface at pH 7 with DewA-LccC protein (Fig. 3a). The activity on coated hydrophobic surfaces at pH 7 was slightly lower, indicating that despite the fusion with the laccase, immobilization on polystyrene was not impaired. After immobilization at pH 5, the laccase activity on the surface was lower, indicating that neutral pH was more preferable for coating. A two-way analysis of variance showed that the effect of pH on DewA-LccC surface activity was significant [$F(1, 8) = 17.6, P = 0.003$]. The effect of microtiter plate surface hydrophobicity, however, was not signifi-

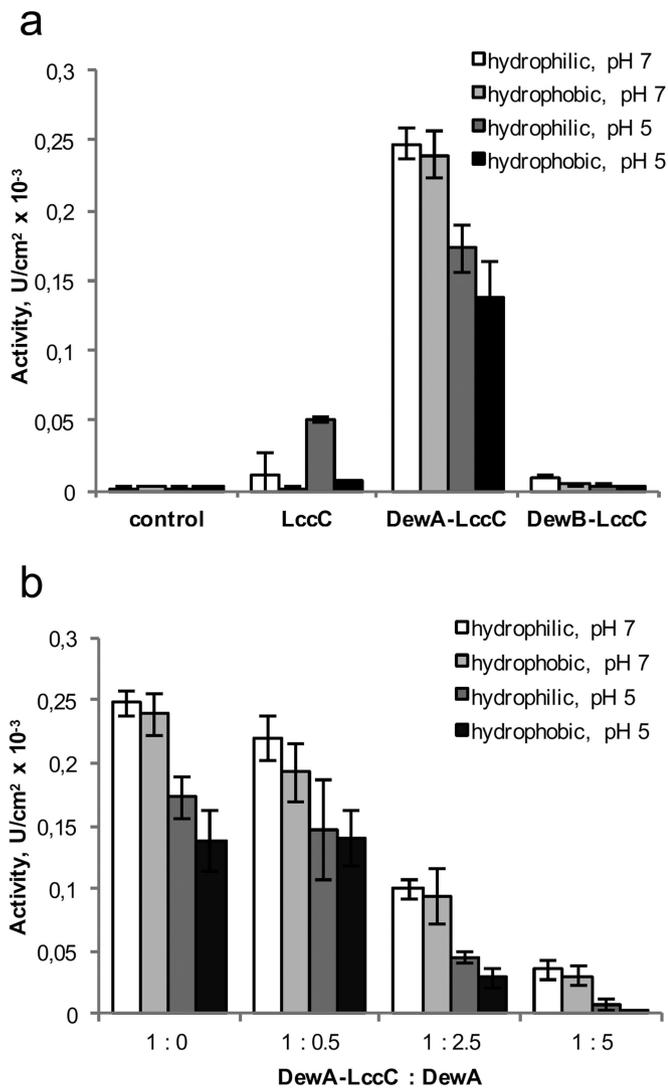


FIG 3 Coating of polystyrene microtiter plates. (a) Crude culture supernatants containing LccC, DewA-LccC, and DewB-LccC proteins with 0.1 U/ml laccase activity were used for coating 96-well microtiter plates with hydrophobic/hydrophilic surface characteristics at pH 5 and 7. Laccase surface activity was measured using the ABTS assay. Uncoated plates were used as a control. (b) Different DewA-LccC:DewA molar ratios were used to determine optimal coating conditions on hydrophobic/hydrophilic surface at pH 5 and 7. Recombinantly produced H⁺proteinB (DewA) was mixed with DewA-LccC-containing culture supernatant in ratios of 1:0, 1:0.5, 1:2.5, and 1:5, as indicated. Standard deviations from three independent experiments for each data point are indicated by error bars.

cant [$F(1, 8) = 1.06, P = 0.33$], nor was the combination of these two factors [$F(1, 8) = 0.4, P = 0.55$]. The maximal laccase activity on surfaces coated with DewB-LccC was much lower, at $0.1 \times 10^{-4} \pm 0.01 \times 10^{-4}$ U/cm² (Fig. 3a). The two-way analysis of variance showed the significance of the effect of both pH [$F(1, 8) = 10.25, P = 0.01$] and surface hydrophobicity [$F(1, 8) = 15.2, P = 0.004$]. The interaction of these two factors was not significant. However, due to the low surface activity, the DewB-LccC fusion protein is not suitable for surface functionalization. Similarly, the activity levels achieved with LccC alone were low ($0.1 \times 10^{-4} \pm 0.1 \times 10^{-4}$ U/cm²). The statistical analysis showed that the effect of both tested factors was not significant in this case. Probably, small

amounts of laccase itself can stick to the surface and perform the substrate oxidation.

Laccase is a relatively large protein compared to the 13-kDa DewA hydrophobin. The immobilization with the fusion protein alone would likely cause a reduction in the laccase activity due to the steric hindrance between single LccC molecules. Previous studies with the class II hydrophobin HFBI fused to a glucose oxidase revealed that a molar ratio between 1:1 and 1:19 of GOx-HFBI to HFBI allowed the highest enzyme activity on surfaces (18). Therefore, we tested different ratios between DewA and the DewA-LccC fusion protein (Fig. 3b). Nonmodified DewA had a negative effect on the surface activity under all coating conditions. This effect was proportional to the increasing DewA amounts, indicating that DewA substituted for the fusion protein. Since the immobilization was performed with crude culture supernatant containing native exoproteins from *A. nidulans*, including DewA, it can be assumed that the natural production increase of hydrophobins in the presence of straw (Fig. 2b) was sufficient for effective coating with laccase-fused DewA and did not require additional supplements, as was the case for heterologically produced and purified GOx-HFBI (18).

Functionalization of glass surfaces. The ability of laccase-fused hydrophobins to coat glass was tested with nonmodified and siliconized glass to compare hydrophilic and hydrophobic surfaces. The effect of both pH and surface hydrophobicity on DewA-LccC surface activity was significant, at $F(1, 8) = 18.97, P = 0.002$ for hydrophobicity and $F(1, 8) = 20.5, P = 0.002$ for pH, as was the interaction of these two factors [$F(1, 8) = 17.26, P = 0.003$]. The highest laccase activity was achieved after the coating of nonmodified hydrophilic microscopy coverslips at pH 7, similarly to polystyrene microtiter plates (Fig. 4a). However, the activity levels were three times lower than those with the polystyrene coating under the same conditions. The laccase activity after coating under other conditions was more than four times lower than that with nonmodified glass at pH 7. The activity levels on the surfaces with DewB-LccC were comparable to those achieved on polystyrene. However, the laccase surface activity did not significantly depend on immobilization conditions [$F(1, 8) = 0.9, P = 0.37$ for hydrophobicity and $F(1, 8) = 4.67, P = 0.06$ for pH]. Similarly, both factors had no significant effect on the surface activity of LccC alone, at $F(1, 8) = 3.85$ and $P = 0.09$ for hydrophobicity, and $F(1, 8) = 0.38$ and $P = 0.55$ for pH.

Coating of nonmodified glass beads resulted in the highest laccase surface activity with DewA-LccC at pH 7 (Fig. 4b). The effect of pH on laccase activity was significant for all tested proteins, as determined by the one-way analysis of variance: DewA-LccC, $F(1, 4) = 26.08, P = 0.007$; DewB-LccC, $F(1, 4) = 40.0, P = 0.0004$; and LccC, $F(1, 4) = 23.14, P = 0.009$.

In previous studies, the coating of glass with recombinantly produced DewA showed lower protein immobilization efficiency at room temperature than at 80°C (13). Due to the structural characteristics of glass surfaces, the hydrophobin immobilization could be impaired at lower temperatures than those with microtiter plates and would require fixation through the application of higher temperatures during the incubation.

Determination of water contact angles. We anticipated that coating with DewA would render hydrophilic surfaces hydrophobic and that coating with the DewA-laccase fusion protein would change the polarity to hydrophilic due to the exposure of the hy-

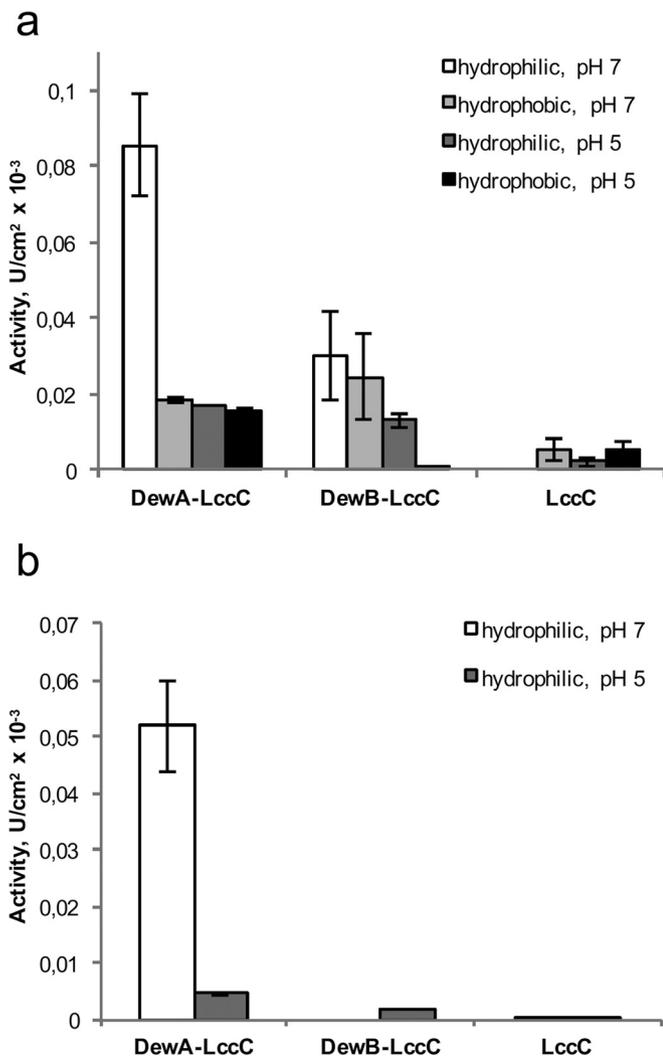


FIG 4 Coating of glass. (a) Microscopy coverslips were coated using culture supernatants containing LccC, DewA-LccC, and DewB-LccC with 0.1 U/ml laccase activity at pH 5 and 7. Hydrophobic glass surface was generated through siliconization. Laccase activity on surfaces was measured using the ABTS assay. (b) Glass beads with 0.4- to 0.85-mm diameter were coated with laccase-containing culture supernatants at pH 5 and 7. Standard deviations from three independent experiments for each data point are indicated by error bars.

drophilic enzyme. To test this hypothesis, we performed contact angle measurements on different surfaces. Therefore, 4 μ l of Millipore water was spotted onto uncoated and coated glass and polystyrene surfaces and visualized with a CCD camera (Fig. 5a). The contact angles of the droplets were measured (Fig. 5b). Coating with DewA generated slightly more hydrophobic surfaces on non-modified glass and polystyrene. On siliconized glass, DewA coating lowered the hydrophobicity. This result can be explained by the amphiphilic nature of hydrophobin. The protein-surface interaction mechanism is different for hydrophobic and hydrophilic surfaces, leaving different parts of hydrophobin exposed. All surfaces coated with DewA-LccC showed a reduction in hydrophobicity compared to the uncoated surfaces, because of the exposed laccase. This effect was strongest on polystyrene, which also showed the highest enzymatic activity.

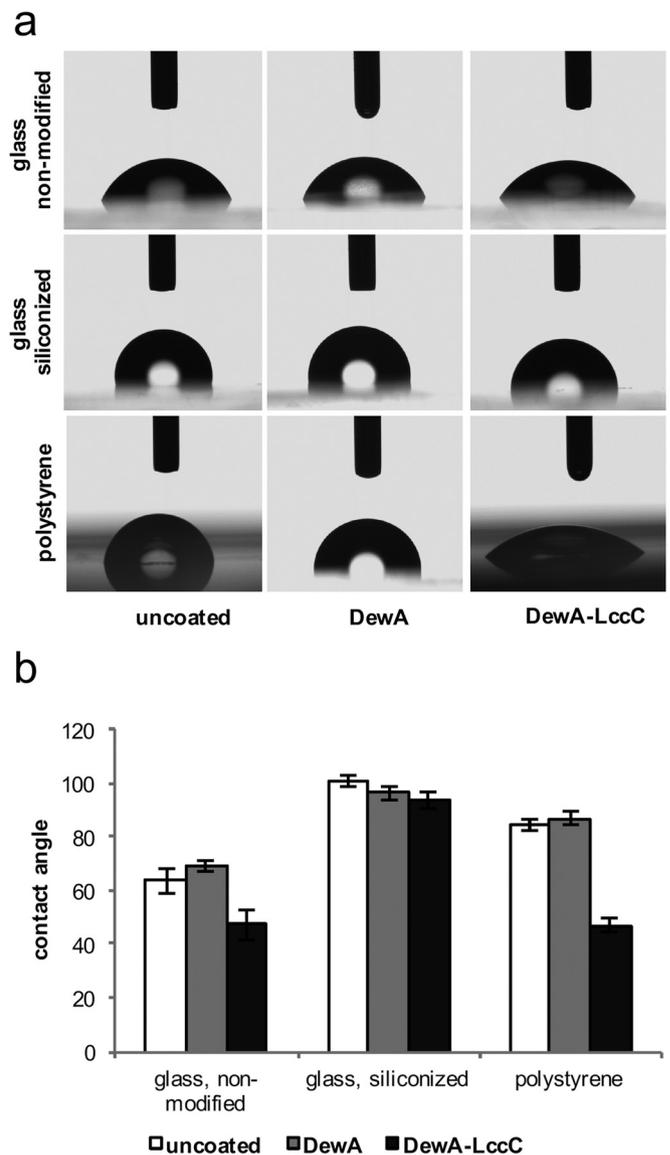


FIG 5 Water contact angle measurements. (a) Four microliters of Millipore water was put on untreated glass, siliconized glass, and polystyrene. Surfaces were tested uncoated, coated with DewA, and coated with DewA-LccC. (b) The angle (degree) between the surface and the droplet was measured. The mean of 10 measurements is displayed, and the error bars represent the standard deviation.

DISCUSSION

Class I hydrophobins are suited for the establishment of highly stable monolayers on surfaces (5). Compared to previously published studies that presented combinations of peptides and tags bound to hydrophobins for improved production, detection, or surface functionalization, fusion with enzymes is more problematic (11, 15). Not only could the ability of the hydrophobin to self-assemble into monolayers be impaired, but the enzyme also could lose its activity due to conformational changes caused by the fusion. Using bioinformatic tools, we came to the conclusion that fusions of the laccase LccC to the C terminus of the hydrophobins should allow the functionality of both protein parts of the resulting fusion product. Unfortunately, due to the vicinity of the lac-

case C terminus to the catalytic center, no C-terminal fusion of a detection tag to the enzyme was possible. However, laccase activity assays could easily substitute for immunodetection assays to show immobilization and functionality of the fusion proteins.

The choice of *A. nidulans* as a production strain also had several advantages and disadvantages. Heterologous production of hydrophobins, especially DewA, has already been established in *E. coli*; however, it includes a protein purification procedure that would denature enzymes (11). Also, *E. coli* is not suited for the production of highly glycosylated proteins, like fungal laccases. *A. nidulans*, on the other hand, produced and secreted the fusion proteins in amounts suitable for direct application on surfaces. The lack of additional purification steps reduces the cost and effort for protein recovery. Since all hydrophobins from *A. nidulans* are present on the spore surface in the wild-type strain (14), an additional class I hydrophobin, DewB, was chosen for fusion with the LccC laccase. The GPI anchor that is normally present at the C terminus of this hydrophobin in its native form and responsible for its immobilization on spores was substituted by LccC. As expected, the resulting DewB-LccC protein was present in culture supernatants at much higher concentration than DewA-LccC, probably due to the disturbance of its immobilization mechanism. Unfortunately, however, the DewB-LccC protein failed in creating stable coatings on the tested surfaces. The concentration of DewA-LccC in crude culture supernatant was, however, sufficient for conducting immobilization experiments. Cultivation of the fungus with straw under conditions that stimulate protein secretion and increased expression of both hydrophobins and fusion protein genes contributed to the high protein yield. *A. nidulans* also provided an unexpected advantage as a homologous hydrophobin producer. Probably due to the presence of native DewA in the culture supernatant, no addition of recombinant DewA protein was needed to achieve maximum laccase activity on the surfaces.

The immobilization experiments on different surfaces showed that despite the C-terminal fusion to a laccase, DewA retained its coating abilities on both hydrophilic and hydrophobic surfaces. The coating of hydrophilic glass and polystyrene surfaces showed the highest laccase activity after immobilization. This results of these enzymatic activity assays are in agreement with the results obtained by contact angle measurements. The reduction in hydrophobicity of DewA-LccC-coated surfaces, compared to uncoated or with recombinant DewA-coated surfaces, are probably caused by the highly glycosylated laccase. The highest decrease in hydrophobicity and the highest laccase activity were both observed on the polystyrene surface. Therefore, polystyrene has proven to be the best surface for immobilization of the fusion protein. The pH conditions during coating were modified in comparison to previous studies, performed at pH 8 (13, 15), due to the acidic pH optimum profile of fungal laccases (21). Although pH 5 had a clear negative effect on the immobilization, laccases are generally stable at neutral pH, and pH 7 was suitable for the assembly of the hydrophobin layer. The polystyrene surface proved to be more suitable for coating at low temperatures. Fusion of DewA to thermostable enzymes would provide a possibility for fixing the hydrophobin layer on glass at higher temperatures. Since DewA forms stable coatings after 16 h of incubation at 80°C (13), it is perfectly suited for fusion with thermostable enzymes.

The LccC laccase itself is a low-redox-potential laccase with relatively low activity (26) and is not suited for industrial application. Due to a conserved three-dimensional structure and a con-

served reaction mechanism, its fusion to a class I hydrophobin and successful coating serves as proof of principle for a possibility of enzyme immobilization using this system. LccC can be substituted with other laccases that are of interest in, for example, dye decolorization, phenolic waste degradation, or biofuel cells (22). Also, other monomeric enzymes, like lipases, dehydrogenases, or decarboxylases, can be fused to hydrophobins for surface functionalization. Class I hydrophobins, like DewA, provide not only a stable binding to the surface, but they create an ordered protein monolayer with even enzyme exposure to the surroundings. Therefore, overloading of the surface, which often leads to the inhibition of enzyme activity in other immobilization techniques, is prevented. Hydrophobins also do not require additional treatment, because their coating ability is caused by a natural process of transformation from the soluble form to monolayer aggregates at the air-liquid and liquid-surface interfaces.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Wohlmann for technical assistance.

We declare that we have no competing interests.

This work was supported by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) through the program “BioProFi” (FKZ: 03SF0424). The funders had no role in the study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

FUNDING INFORMATION

This work was funded by Federal Ministry of Education and Research (BMBF) (FKZ: 03SF0424).

REFERENCES

- Sheldon RA. 2007. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv Synth Catal* 349:1289–1307. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.200700082>.
- Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* 38:453–468. <http://dx.doi.org/10.1039/B711564B>.
- Pierre A. 2004. The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatal Bio-transformation* 22:145–170. <http://dx.doi.org/10.1080/10242420412331283314>.
- Wosten H, De Vries O, Wessels J. 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobin rodlet layer. *Plant Cell* 5:1567–1574. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.5.11.1567>.
- Kershaw MJ, Talbot NJ. 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet Biol* 23: 18–33. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.1997.1022>.
- Wosten HA, Scholtmeijer K. 2015. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1587–1597. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6319-x>.
- Scholtmeijer K, Wessels JG, Wosten HA. 2001. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:1–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530100632>.
- Gebbink MF, Claessen D, Bouma B, Dijkhuizen L, Wosten HA. 2005. Amyloids—a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 3:333–341. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1127>.
- Morris VK, Ren Q, Macindoe I, Kwan AH, Byrne N, Sunde M. 2011. Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. *J Biol Chem* 286: 15955–15963. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.214197>.
- Kwan AH, Winefield RD, Sunde M, Matthews JM, Haverkamp RG, Templeton MD, Mackay JP. 2006. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3621–3626. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0505704103>.
- Wohlleben W, Subkowski T, Bollschweiler C, von Vacano B, Liu Y, Schrepp W, Baus U. 2010. Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *Eur Biophys J* 39:457–468. <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-009-0430-4>.
- Kirkland BH, Keyhani NO. 2011. Expression and purification of a func-

- tionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E. coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:327–335. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0777-7>.
13. Rieder A, Ladnorg T, Woll C, Obst U, Fischer R, Schwartz T. 2011. The impact of recombinant fusion-hydrophobin coated surfaces on *E. coli* and natural mixed culture biofilm formation. *Biofouling* 27:1073–1085. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2011.631168>.
 14. Grunbacher A, Throm T, Seidel C, Gutt B, Rohrig J, Strunk T, Vincze P, Walheim S, Schimmel T, Wenzel W, Fischer R. 2014. Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS One* 9:e94546. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094546>.
 15. Boeuf S, Throm T, Gutt B, Strunk T, Hoffmann M, Seebach E, Muhlberg 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.022>.
 16. Weickert U, Wiesend F, Subkowski T, Eickhoff A, Reiss G. 2011. Optimizing biliary stent patency by coating with hydrophobin alone or hydrophobin and antibiotics or heparin: an *in vitro* proof of principle study. *Adv Med Sci* 56:138–144. <http://dx.doi.org/10.2478/v10039-011-0026-y>.
 17. Schulz A, Liebeck BM, John D, Heiss A, Subkowski T, Böker A. 2011. Protein-mineral hybrid capsules from emulsions stabilized with an amphiphilic protein. *J Mater Chem* 21:9731–9736. <http://dx.doi.org/10.1039/c1jm10662g>.
 18. Takatsuji Y, Yamasaki R, Iwanaga A, Lienemann M, Linder MB, Haruyama T. 2013. Solid-support immobilization of a “swing” fusion protein for enhanced glucose oxidase catalytic activity. *Colloids Surf B* 112:186–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.051>.
 19. Ribitsch D, Herrero Acero E, Przylucka A, Zitzenbacher S, Marold A, Gamerith C, Tscheliessnig R, Jungbauer A, Rennhofer H, Lichtenegger H, Amenitsch H, Bonazza K, Kubicek CP, Druzhinina IS, Guebitz GM. 2015. Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. *Appl Environ Microbiol* 81:3586–3592. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04111-14>.
 20. Espino-Rammer L, Ribitsch D, Przylucka A, Marold A, Greimel KJ, Herrero Acero E, Guebitz GM, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2013. Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. stimulate enzymatic hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. *Appl Environ Microbiol* 79:4230–4238. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01132-13>.
 21. Baldrian P. 2006. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30:215–242. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>.
 22. Kunamneni A, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M. 2007. Fungal laccase—a versatile enzyme for biotechnological applications, p 233–245. *In* Méndez-Vilas A (ed), *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. Formatex, Badajoz, Spain.
 23. Fernández-Fernández M, Sanroman MA, Moldes D. 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv* 31:1808–1825. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.013>.
 24. Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19–26. <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>.
 25. Eggert C, LaFayette PR, Temp U, Eriksson KE, Dean JF. 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 64:1766–1772.
 26. Mander GJ, Wang H, Bodie E, Wagner J, Vienken K, Vinuesa C, Foster C, Leeder AC, Allen G, Hamill V, Janssen GG, Dunn-Coleman N, Karos M, Lemaire HG, Subkowski T, Bollschweiler C, Turner G, Nusslein B, Fischer R. 2006. Use of laccase as a novel, versatile reporter system in filamentous fungi. *Appl Environ Microbiol* 72:5020–5026. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00060-06>.
 27. Aramayo R, Timberlake WE. 1990. Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* yA (laccase I) gene. *Nucleic Acids Res* 18:3415. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.11.3415>.
 28. Scherer M, Fischer R. 2001. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* 199:207–213. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10676.x>.
 29. Waring RB, May GS, Morris NR. 1989. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* 79:119–130. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90097-8](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(89)90097-8).
 30. Barratt RW, Johnson GB, Ogata WN. 1965. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52:233–246.
 31. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 32. Käfer E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv Genet* 19:33–131.
 33. Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1470–1474. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.5.1470>.
 34. Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, Edgerton H, Xiong Y, Taheri-Talesh N, Osmani SA, Oakley BR. 2007. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* 1:3111–3120. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.405>.
 35. Fernández-Abalos JM, Fox H, Pitt C, Wells B, Doonan JH. 1998. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 27:121–130. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00664.x>.
 36. Eggert C, Temp U, Eriksson KE. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62:1151–1158.
 37. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a Web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195–201. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>.
 38. Benkert P, Biasini M, Schwede T. 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27:343–350. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>.
 39. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42:W252–W258. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku340>.
 40. Osipov E, Polyakov K, Kittl R, Shleev S, Dorovatovskiy P, Tikhonova T, Hann S, Ludwig R, Popov V. 2014. Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70:2913–2923. <http://dx.doi.org/10.1107/S1399004714020380>.
 41. Bouws H, Wattenberg A, Zorn H. 2008. Fungal secretomes—nature’s toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:381–388. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1572-5>.

PAPER • OPEN ACCESS

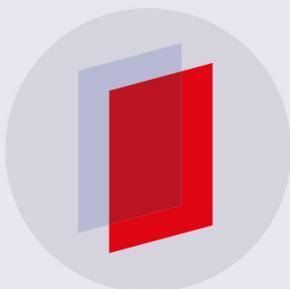
Self-cleaning and antifouling nanocomposites for stone protection: properties and performances of stone-nanomaterial systems

To cite this article: M Roveri *et al* 2018 *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **364** 012070

View the [article online](#) for updates and enhancements.

Related content

- [Dealloying-driven synthesis and characterization of AgCl/Ag/TiO₂ nanocomposites with enhanced photocatalytic properties](#)
Tongyang Wang, Yan Wang, Zhengfeng Zhao *et al.*
- [ZnO for photocatalytic air purification applications](#)
I V. Tudose and M. Sucheai
- [Photocatalytic hydroxyapatite-titania nanocomposites for preventive conservation of marble](#)
Enrico Sassoni, Eros D'Amen, Norberto Roveri *et al.*



IOP | ebooks™

Bringing you innovative digital publishing with leading voices to create your essential collection of books in STEM research.

Start exploring the collection - download the first chapter of every title for free.

Self-cleaning and antifouling nanocomposites for stone protection: properties and performances of stone-nanomaterial systems

M Roveri¹, F Gherardi¹, S Goidanich¹, D Gulotta¹, V Castelvetro², R Fischer³, L Winandy³, J Weber⁴ and L Toniolo¹

1. INSTM – Department of Chemistry, Materials and Chemical Engineering “Giulio Natta”, Politecnico di Milano, Italy

2. INSTM – Department of Chemistry, University of Pisa, Italy

3. KIT – Karlsruhe Institute of Technology, Germany

4. University of Applied Arts Vienna, Austria

marco.roveri@polimi.it

Abstract. The development of nanocomposites combining photocatalytic, antifouling and protective features has provided interesting and promising results in the last years. However, few data about the behaviour of the nanomaterials applied on stone surfaces are available in the literature. In the framework of the EU-Horizon 2020 project “Nano-Cathedral”, nanostructured protective treatments have been designed with different nanoparticles (TiO₂, Ag, ZnO), solvents and silane/siloxane-based polymeric matrices. The innovative formulations have been applied on 6 lithotypes, selected among the stones used in five medieval cathedrals (Vitoria-Gasteiz, Ghent, Cologne, Vienna and Pisa) and a contemporary theatre (Oslo Opera House), which are emblematic of different European geological and environmental areas. The treated stone specimens have been fully characterized to evaluate the surface optical and morphological compatibility, the reduction of water absorption by capillarity, the change in wettability and water vapour permeability properties. The selected treatments fulfil all these requirements and exhibit good photocatalytic and antifouling properties once applied on stone specimens. Different accelerated ageing procedures have also been performed in order to evaluate the stability of the polymeric matrices in the presence of photoactive TiO₂.

1. Introduction

The use of nanomaterials in the conservation of natural and artificial stone materials has been an active research topic over the last fifteen years, showing a potential for tackling different aspects of conservation, from consolidation to protection against chemical and biological decay agents.

In particular, the development of chemically stable nanocomposites based on the addition of inorganic TiO₂, ZnO or Ag nanoparticles (NPs) to silanic or acrylic matrices has provided an effective means of combining the water repellency features of siloxane, fluorinated and acrylic polymers with the photocatalytic activity of nano-TiO₂ [1], able to promote the solar-driven degradation of many pollutants, and the biocidal properties of Ag and ZnO [2].

“Nano-Cathedral”, a Horizon 2020 project currently in progress, is devoted to developing a systematic approach to the use of TiO₂, ZnO and Ag-based nanomaterials in the protection of European



architectural heritage, by evaluating the performance of an array of innovative research products applied on natural stones with highly different properties.

In this work, three innovative nanocomposites based on different silicon-based matrices and containing different types and concentrations of NPs were set up with the contribution of companies and their protective performance was assessed on different stone substrates.

As stone substrates, three lithotypes with largely complementary properties were selected, i.e. Apuan marble, Balegem limestone and Schlaitdorf sandstone. These natural stones were employed in relevant historical buildings involved in the project: Apuan marble is used in the Cathedral of Pisa (Italy, XIII cent.) and in a contemporary high-standing building, the Oslo Opera House (Norway, 2008), Balegem stone is present in the Cathedral of Ghent (Belgium, XIII cent.) and Schlaitdorf stone in the Cathedral of Cologne (Germany, XIII cent.).

The performance of the selected nanocomposites was evaluated on fresh stone substrates in laboratory conditions according to the recent EN Standard Protocol for the assessment of protective treatments in the field of Cultural Heritage [3] and by assessing their photocatalytic/biocidal activity.

Moreover, three different artificial ageing protocols that take into account the separate effects of heat, UV light irradiation and meteoric run-off are currently being conducted in laboratory conditions, with the aim of investigating the durability of nanocomposites once applied on stone substrates and predicting their long-term response towards environmental exposure. Partial results from this investigation will be presented, including those related to the effects of heat and UV light irradiation.

As a final step of the Project, the nanocomposites were applied on deteriorated surfaces in pilot areas of the respective historical buildings and the evaluation of their performance is currently being performed in the real environmental conditions, which are very different from site to site. Results from this onsite experimentation will be complementary and determinant for a thorough evaluation of the effectiveness of the considered new protectives and will be available at the end of the Nano-Cathedral project.

2. Materials and methods

Three nanocomposites were selected, according to a preliminary screening protocol, among those prepared by the companies involved in the project. Owing to the confidential non-disclosure agreement signed within the Project, only partial information can be given about the products, as shown in table 1.

Table 1. Description of the nanocomposites.

Product	Composition	Solvent	Property
WNC	alkyl alkoxy silane oligomers (15% w/w) with TiO ₂ NPs (0.96% w/w)	water	photocatalytic
ANC	alkyl alkoxy silane monomers (40% w/w) with TiO ₂ NPs (0.12% w/w)	2-propanol	photocatalytic
TNC	hydrophobized silica with AgO and ZnO nanoparticles (0.2% w/w)	2-propanol	anti-bacterial

The stone substrates belong to three different lithotypes, i.e. Apuan marble, Balegem limestone and Schlaitdorf sandstone, whose main characteristics are summarized in table 2.

Table 2. Main characteristics of lithotypes (porosity data are from mercury intrusion porosimetry measurements).

Lithotype	Provenance	Description	Open porosity (%vol)
Apuan marble	Carrara region, Italy	Metamorphic rock with almost purely calcitic composition and highly compact texture	0.7±0.1
Balegem limestone	Ghent region, Belgium	Sedimentary rock with large siliceous clasts in calcitic matrix; compact texture	9.9±0.8
Schlaitdorf sandstone	Neckar area, Germany	Sedimentary rock with chiefly siliceous composition and coarse texture	16±1

5x5x1 cm and 5x5x2 cm specimens (6 for each size) of fresh lithotypes were gently polished with abrasive paper (P180 carborundum paper), washed and kept in deionized water for 1 hour in order to remove possible soluble salts and then dried in oven at 50 °C until constant weight (a minimum of 48 hours). The nanocomposites were applied by capillary absorption for 6 hours, using a filter paper pad saturated with the treating material, according to EN 16581:2014 standard [3]. The time of application was defined after checking the time necessary to allow for the penetration of the products inside the depth of lithotypes. A commercial protective treatment based on silanes and siloxanes, Silres BS 290 (Wacker Chemie, dil. 8 wt.% in white spirit), was used as reference material for comparison. In order to determine the amount of absorbed dry matter, all stone specimens were weighed before the treatment and then after solvent evaporation until constant weight was achieved (a minimum of 48 hours). For all products, the amount of dry matter per unit area is reported in table 3.

Table 3. Dry matter (mg/cm²) absorbed by the fresh stone specimens.

Treatment	Apuan Marble	Balegem	Schlaitdorf
WNC	0.3±0.2	16±1	26±4
ANC	1.3±0.1	10±3	18±10
TNC	4.5±0.2	7±1	7.7±0.5
Silres BS 290	2±1	12±8	18±7

The colour change of stone specimens after the application of the products was measured with a Konica Minolta CM-600D Vis spectrophotometer with a D65 illuminant at 8°, in the 360-740 nm wavelength range. 25 measurements were performed on each specimen before and after the treatment. The results were expressed in the CIE L*a*b* colour space and the average values of L*, a* and b* were used to calculate the colour change ΔE^* . A threshold value of $\Delta E^*=5$ was set as requirement for aesthetic compatibility [4].

Static contact angle test was performed on 15 points for each sample, according to EN Standard Protocol [5], using an OCA (Optical Contact Angle) 20 PLUS (DataPhysics, Germany) equipment, with a drop volume of 5 μ l, after 10 seconds. The test was carried out before and after the application of the treatments.

The capillary water absorption of the stone specimens was measured following the EN Standard Protocol [6] on untreated and treated specimens. The data were elaborated according to the literature [7]. In order to evaluate the reduction of water absorption, two parameters were considered: the relative capillary index (Cirel) and the ratio of the absorption coefficients of treated and untreated specimen (ACT/ACnt).

Water vapour permeability tests were performed according to the EN Standard Protocol [8] on the specimens before and after the application of the treatments, using the “wet cup” system described in [9]. In order to evaluate the retention of permeability, the ratio of the permeability values of treated and untreated specimen ($\delta t/\delta nt$) was calculated.

The photocatalytic properties of the products were assessed through the Rhodamine discolouration test, according to the laboratory procedure and data elaboration described in [9]. The extent of discolouration (D^*) of specimens treated with WNC and ANC was divided by that of specimens treated with Silres BS 290, which has no photocatalytic properties and can be used as blank.

In order to determine the antibacterial activity of TNC, sterilized stone samples of the three chosen lithotypes were treated with the products and, after the complete evaporation of the solvent, were incubated with fresh *Bacillus cereus* or *Pseudomonas putida* cultures for 16 h at 28 °C. As controls, untreated stone samples were also incubated with the bacterial strains. After the incubation, the stone samples were washed once with fresh medium to remove unattached cells. Remaining bacteria were collected by scratching an area of 5 cm² with a sterile swab. The swab was then transferred to 3 ml fresh medium and vortexed to release the bacterial cells in the medium. Serial dilutions of this suspension

were placed on solid medium plates and incubated at 28 °C for another 16 h. Afterwards, single colonies could be observed and were counted to determine the number of CFU (Colonie Forming Units).

The artificial ageing of stone specimens in laboratory conditions was conducted for 750 hours through two different protocols: one thermal ageing in oven at 65 °C and one UV light ageing in an irradiation chamber (Suntest XLS⁺, URAI S.p.A) equipped with a Xenon arc lamp (cut-off filter for $\lambda < 295$ nm, 765 W/m² irradiance). Two specimens per lithotype and treatment were selected for each protocol, among the six specimens that were characterized in the former part of this investigation. At the end of the first ageing cycle, the stone specimens were characterized through the static contact angle and capillary water absorption tests, according to the previously described methodologies. A complete testing procedure including all the tests will be carried out in the next few months, after another ageing cycle of 750 hours has been finished.

3. Results

The results of the colour measurements on fresh stone specimens are summarized in table 4.

Table 4. Total colour difference (ΔE^*) between treated and untreated specimens.

Treatment	Apuan Marble	Balegem stone	Schlaitdorf
WNC	1.5±0.5	3.4±0.4	1.5±0.2
ANC	2.8±0.8	1.7±0.5	7.1±0.6
TNC	4±1	4.5±0.8	2.6±0.5
Silres BS 290	1.8±0.9	3±2	8±2

It can be observed that all treatments preserve the original surface colour on Apuan marble and Balegem stone. On Schlaitdorf stone, WNC and TNC show excellent colour compatibility, whereas ANC and Silres BS 290 produce a colour change higher than the threshold value of 5, due to a darkening and yellowing effect. In both cases, the application of a lower amount of product would probably ensure a lower chromatic alteration.

The results of water absorption measurements on treated and untreated specimens are reported in table 5.

Table 5. Relative capillary index (CI_{rel}) and relative absorption coefficient (AC_t/AC_{nt}) of treated specimens.

Treatment	Apuan Marble		Balegem stone		Schlaitdorf	
	CI _{rel}	AC _t /AC _{nt}	CI _{rel}	AC _t /AC _{nt}	CI _{rel}	AC _t /AC _{nt}
WNC	0.75±0.05	0.4±0.4	0.35±0.07	0.1±0.1	0.44±0.05	0.11±0.05
ANC	0.13±0.02	0.19±0.03	0.07±0.01	0.02±0.01	0.08±0.02	0.028±0.009
TNC	0.5±0.2	0.03±0.02	0.19±0.09	0.01±0.01	0.09±0.01	0.031±0.007
Silres BS 290	0.2±0.3	0.05±0.07	0.5±0.3	0.6±0.3	0.11±0.07	0.02±0.01

On Apuan Marble, ANC shows the best results in terms of water absorption reduction. Good results were obtained by Silres BS 290 but the very high standard deviation values of both CI_{rel} and AC_t/AC_{nt} is an indication of the heterogeneity of the treatment applied on different marble samples. TNC proves to be a good water repellent product especially after a short time interval of contact with water (30 min), whereas WNC is not effective in water absorption reduction. On Balegem stone, the best effectiveness was obtained by ANC both after 4 days (CI_{rel}) and after 30 min (AC_t/AC_{nt}) compared to the other treatments. Good results were obtained by TNC and WNC, whereas Silres BS 290 shows poor effectiveness in the reduction of the water uptake. Finally, on Schlaitdorf stone, excellent results in terms of water absorption reduction were obtained from specimens treated with ANC, TNC and Silres BS 290,

with CIrel values of about 0.1. WNC shows rather good reduction as well, especially within 30 min of contact with water.

The results of water vapour permeability measurements on treated and untreated measurements are reported in table 6.

Table 6. Ratio of water vapour permeability values of treated and untreated specimens ($\delta t/\delta nt$).

Treatment	Apuan Marble	Balegem stone	Schlaitdorf
WNC	1.2±0.4	0.9±0.3	0.8±0.3
ANC	0.9±0.2	0.6±0.3	0.9±0.2
TNC	0.5±0.3	0.2±0.1	0.4±0.2
Silres BS 290	0.3±0.2	0.3±0.2	0.436±0.2

On Apuan marble, both WNC and ANC do not affect the original vapour permeability, since the $\delta t/\delta nt$ values are about 1. Further investigations would be necessary to explain, in the adopted treatment conditions, why WNC increases the mean values of vapor permeability of the stone. However, a similar effect has been reported in the literature concerning other coating materials [10]. TNC leads to a reduction of about 50% of permeability, whereas Silres BS290 significantly reduces it, indicating that probably the product is partially occluding the pores of the stone. On Balegem stone, WNC does not significantly affect the original water vapour permeability (reduction of about 10%), while ANC reduced the permeability of about 40%. Silres BS 290 and TNC show the highest reduction of permeability (about 70-80%). It is important to notice that, except for TNC, high values of standard deviation could be observed, indicating a high heterogeneity of the treated stones. On Schlaitdorf stone, WNC and ANC do not significantly change the original water vapour permeability; Silres BS 290 and TNC show comparable results with a reduction of the permeability of about 60%.

The results of static contact angle measurements on treated and untreated specimens are reported in table 7.

Table 7. Static contact angle (θ) of treated and untreated specimens (expressed in degrees); on untreated Schlaitdorf stone the contact angle could not be measured due to the very fast absorption of the drop.

Treatment	Apuan Marble		Balegem stone		Schlaitdorf	
	untreated	treated	untreated	treated	untreated	treated
WNC	66±10	113.8±0.7	71±8	116±4	-	128±2
ANC	72±18	140±10	37±7	143±3	-	137±3
TNC	55±7	129±12	54±10	149±3	-	133±7
Silres BS 290	58±11	101±5	32±8	125±12	-	127±6

In the case of Apuan marble, the application of all the new products reduces the surface wettability compared to the result obtained from Silres BS 290, with static contact angle values higher than 100°. In particular, ANC and TNC show a significant increase in the values of static contact angle (about 130-140°). On Balegem stone, all the products change the original surface wettability. In particular, specimens treated with TNC and ANC reach values of static contact angle of about 140-150° and the low standard deviation proves the homogeneity of this surface property of the treated stone. Finally, all the treatments applied on Schlaitdorf stone show water repellent properties, with contact angle values higher than 100°. In particular, ANC and TNC lead to a significant reduction of the surface wettability (about $\theta=140^\circ$), with low standard deviations proving the homogenous distribution of the products on specimens.

The results of the Rhodamine discolouration test are reported in table 8.

Table 8. Ratio of D^* values of specimens treated with WNC/ANC and specimens treated with Silres BS 290 at 150 min (D^*/D^*_{SILRES}).

Treatment	Apuan Marble	Balegem stone	Schlaitdorf
WNC	1.34	2.08	3.04
ANC	1.30	1.40	3.90

It can be observed that, on Balegem stone, WNC produces a higher discolouration compared to ANC. This is readily explained by its higher TiO_2 concentration. However, when it comes to Apuan marble, the photocatalytic performances of the products are comparable and the performance of ANC is significantly better in the case of Schlaitdorf stone, indicating that this product, despite a lower nanoparticle concentration, has a better performance compared to WNC once applied on certain substrates.

Concerning the results of the test for the antibacterial activity of TNC (table 9), it can be observed that Apuan marble specimens show minor reduction of the CFU number for both *Bacillus cereus* and *Pseudomonas Putida*. This could be explained either by the small amount of protective product absorbed by the marble, or by the small amount of bacteria able to attach to the marble surface. On the other hand, the antibacterial activity of Balegem and Schlaitdorf specimens prove the effectiveness of TNC in the reduction of CFU compared to the respective untreated specimens, especially regarding *Bacillus cereus*.

Table 9. CFU values of untreated specimens and specimens treated with TNC ($/10^6$ counts/mL).

Treatment	Apuan Marble		Balegem stone		Schlaitdorf	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
TNC	1.9±0.4	4.4±0.4	7±1	10.4±0.3	5.7±0.1	11.2±0.7
untreated	1.9±0.4	4.9±0.4	21±3	12.0±0.9	57±8	17±1

In conclusion, the laboratory tests conducted on fresh stone specimens showed that on Balegem and Schlaitdorf stones, ANC and TNC prove to be the best products regarding both protection efficacy and photocatalytic/antibacterial activity. In the case of Apuan marble, ANC has a comparable performance, while TNC shows only poor effectiveness in antibacterial activity.

Consequently, ANC and the reference Silres BS290 were chosen to undergo the ageing protocols on all three lithotypes, while TNC was only selected for Balegem and Schlaitdorf stones.

The results of the water absorption tests after 750 hours of thermal and UV light ageing are reported in figure 1. By comparing the values of CI_{rel} before and after the ageing, it can be observed that thermal ageing does not produce negative effects on the protective performance, while in the case of UV light ageing, some differences can be highlighted in the behavior of the products. Indeed, no effect is observed in the case of TNC, while the effectiveness of Silres and ANC in the reduction of water absorption is slightly reduced, but the change is not remarkable. The results prove that the addition of nanoparticles in the formulations does not negatively affect the protective properties of the treated specimens.

The results of the static contact angle tests after the ageing are reported in figure 2. It can be observed that in all cases thermal ageing does not significantly affect the surface water-repellency of the treated stones. On the other hand, UV light ageing leaves the specimens treated with TNC unaffected, but it produces a visible effect in the case of Silres BS 290 and has a very strong impact on specimens treated with ANC in the case of Apuan Marble and Balegem, where substantially the surface wettability of untreated stone is reverted, while on Schlaitdorf stone the loss of hydrophobicity is much less pronounced. This significant decrease observed on specimens treated with ANC may be related to the photocatalytic activity of TiO_2 nanoparticles towards the polymeric matrix in which they are embedded. These results indicate that, although photocatalytic treatments applied on stone are predictably affected

by a certain extent of degradation under UV light, this degradation remains largely a surface effect and the ability of the treatment to reduce water penetration is not significantly impaired.

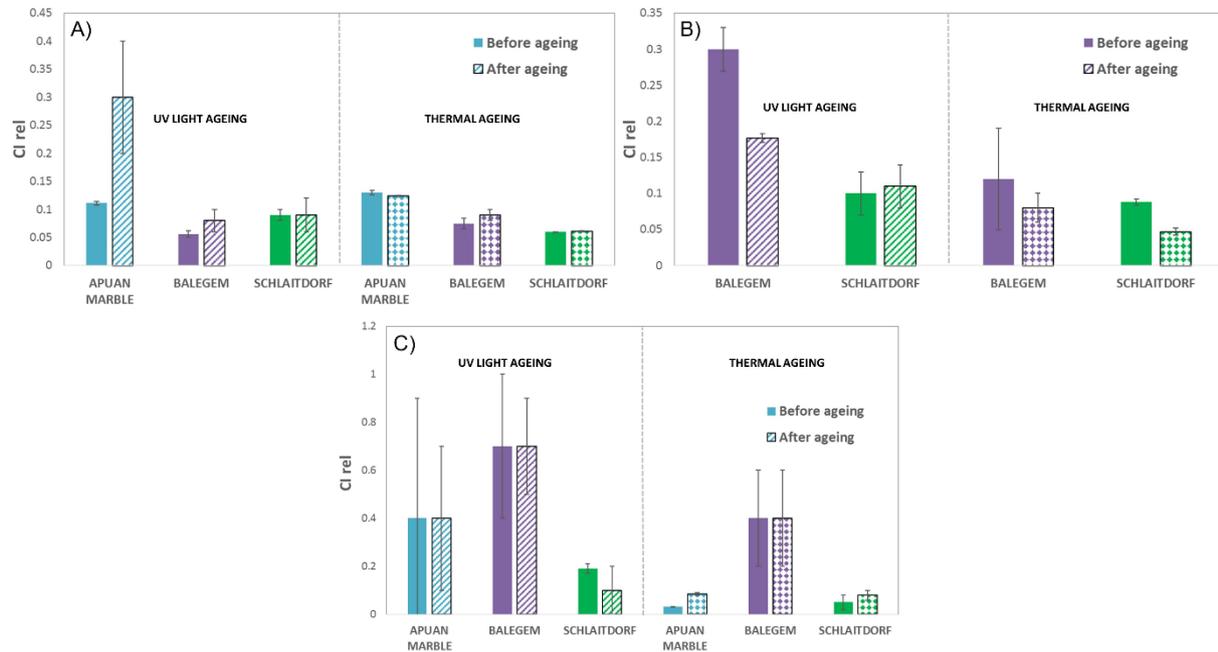


Figure 1. CIrel values of specimens treated with A) ANC, B) TNC and C) Silres BS 290 *before* and *after* the two ageing protocols.

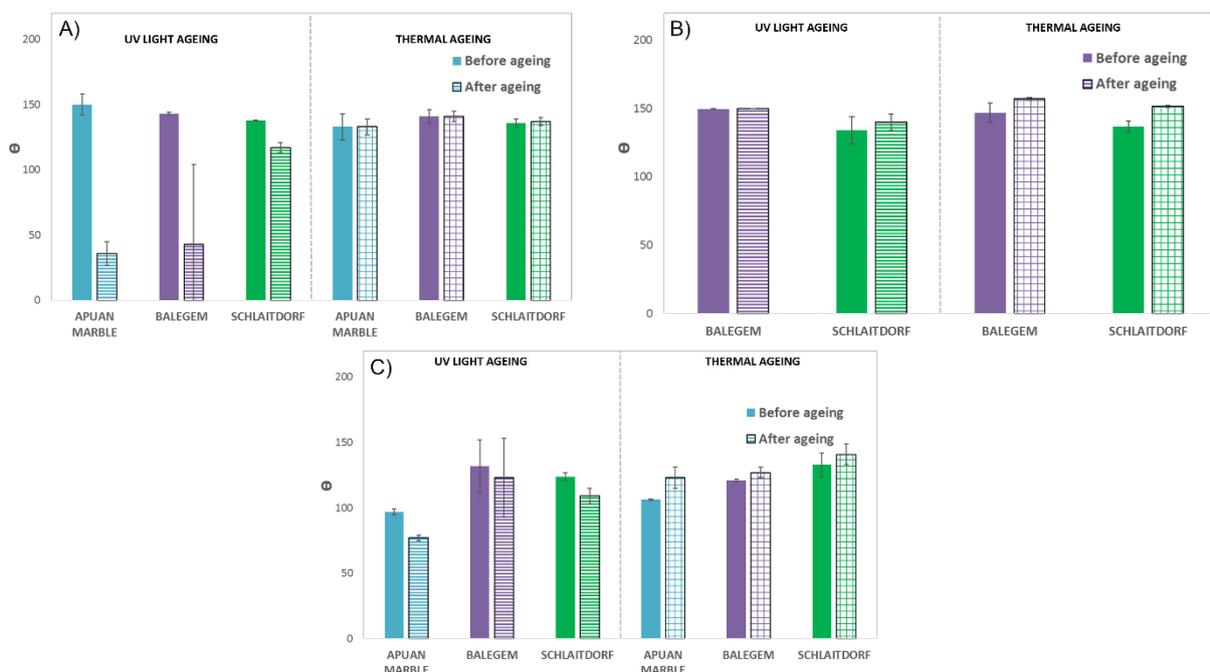


Figure 2. Values of static contact angle Θ (°) of specimens treated with A) ANC, B) TNC and C) Silres BS 290 *before* and *after* the two ageing protocols.

4. Conclusions

In this study, three innovative nanocomposites with photocatalytic or antibacterial properties, developed in the framework of the Nano-Cathedral H2020 Project, have been applied for protection purposes on three different lithotypes. The performance has been assessed through a set of laboratory tests and the durability has been evaluated by means of two different protocols of artificial ageing. The results indicate that two of the three products, one antibacterial and one photocatalytic product, show very high and promising protective effectiveness. The antibacterial product also showed excellent response in the durability tests, while the photocatalytic product proved to be able to retain much of its effectiveness in the reduction of water absorption but contact angle tests indicated a loss of hydrophobicity after the UV ageing protocol. This suggests the fact that, upon prolonged exposure to UV light, the product undergoes a degradation process, but this degradation, being a surface effect, does not significantly affect its effectiveness in reducing water absorption.

Acknowledgments

The Nano-Cathedral Project (Nanomaterials for conservation of European architectural heritage developed by research on characteristic lithotypes) is supported by the European program Horizon 2020 (GA n. 646178). The AA. wish to acknowledge the kind collaboration of the companies ChemSpec Srl (Italy), Colorobbia Srl (Italy) and Tecnan-Nanommat (Spain). Matea Ban from Technical University of Wien is gratefully acknowledged for Mercury Intrusion Porosimetry measurements.

References

- [1] Quagliarini E, Graziani L, Diso D, Licciulli A and D’Orazio M 2018 *Journal of Cultural Heritage* **30** 81–91
Toniolo L and Gherardi F 2018 The protection of marble surfaces: the challenge to develop suitable nanostructured treatments *Advanced materials for the conservation of stone* ed M Hosseini and I Karapanagiotis (New York: Springer International Publishing)
- [2] Cappelletti G, Fermo P and Camiloni M 2015 *Progress in Organic Coatings* **78** 511–6
Van der Werf I D, Ditaranto N, Picca R A, Sportelli M C and Sabbatini L 2015 *Heritage Science* **3** (29) 1-9
Serra C L, Tulliani J M, Sangermano M 2014 *Macromolecular Materials and Engineering* **299** (11) 1352–61
- [3] EN 16581 2014 *Conservation of cultural heritage - surface protection for porous inorganic materials - laboratory test methods for the evaluation of the performance of water repellent products* (European Committee for Standardization)
- [4] García O and Malaga K 2012 *Journal of Cultural Heritage* **13** (1) 77-82
- [5] EN 15802 2009 *Conservation of cultural property - Test methods - Determination of static contact angle* (European Committee for Standardization)
- [6] EN 15801 2009 *Conservation of cultural property - Test methods - Determination of water absorption by capillarity* (European Committee for Standardization)
- [7] Peruzzi R, Poli T and Toniolo L 2003 *Journal of Cultural Heritage* **4** 251-4
- [8] EN 15803 2010 *Conservation of cultural property - test methods – determination of water vapour permeability* (European Committee for Standardization)
- [9] Gherardi F, Roveri M, Goidanich S and Toniolo L 2018 *Materials* **11** 1
- [10] Kronlund D, Bergbreiter A, Meierjohann A, Kronberg L, Lindén M, Grosso D and Smått J H 2015 *Progress in Organic Coatings* **85** 159-67