

**Proteomanalytische Identifizierung  
protektiver Vakzinekandidaten  
von *Staphylococcus aureus***

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

- Dr. rer. nat -

im Fachbereich Biologie  
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Eva Glowalla**

aus Groß-Strehlitz, Polen

Köln 2007

Berichtersteller: Prof. Dr. J.C. Howard  
Prof. Dr. M. Krönke

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2007

*Für Axel Tophoven,  
Claudette Soumahoro  
und meine Eltern*

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Klinische Relevanz</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Resistenzentwicklung: MRSA</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Impfstoffentwicklung zur Prävention von <i>S. aureus</i>-     Infektionen</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>14</b>
2.1.1 Chemikalien.....	14
2.1.2 Geräte.....	14
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	15
2.1.4 Kits.....	16
2.1.5 Bakterienstämme .....	16
2.1.6 Oligonukleotide.....	17
2.1.7 Antikörper .....	17
2.1.8 Enzyme.....	18
2.1.9 Vektoren .....	18
2.1.10 Mausstämm.....	18
2.1.11 PCR.....	18
2.1.12 Agarosegele.....	18
2.1.13 Anästhesie .....	19
2.1.14 Bakterienkultur .....	19
2.1.15 1D- und 2D-SDS-PAGE.....	19
2.1.16 Gelfärbung .....	20
2.1.17 Western Blot und Immunfärbung.....	20
2.1.18 Kolonieblot .....	20
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Isolation von zellwandassoziierten Proteinen .....	21
2.2.2 Depletion von <i>S. aureus</i> -spezifischen IgGs.....	22
2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	22
2.2.4 1D-Gelelektrophorese .....	22
2.2.5 2D-Gelelektrophorese .....	23
2.2.6 Silberfärbung .....	25
2.2.7 Coomassie-Färbung.....	25
2.2.8 Western Blot und Immunfärbung .....	25
2.2.9 Identifizierung von Vakzinekandidaten .....	26
2.2.10 Klonierung von GST-Fusionsproteinen .....	27

2.2.11	Selektion von Expressionsklonen mittels Kolonie Blot.....	28
2.2.12	Expression von GST-Fusionsproteinen.....	28
2.2.13	Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	29
2.2.14	Affinitätsaufreinigung von Antikörpern aus IVIG .....	30
2.2.15	Isolierung von humanen Neutrophilen.....	30
2.2.16	IgG-vermittelte Phagozytoseaktivität von humanen Neutrophilen .....	31
2.2.17	Immunisierung von Mäusen.....	32
2.2.18	Serumgewinnung aus Mäusen .....	33
2.2.19	Bestimmung der Antikörpertiter mittels ELISA .....	33
2.2.20	Murines Sepsismodell.....	34
2.2.21	<i>in vivo</i> Visualisierung (IVIS).....	34
2.2.22	Bestimmung der Bakteriendichte in Organen .....	35
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	<b>Untersuchung von IVIG auf opsonisierende Antikörper gegen <i>S. aureus</i> .....</b>	<b>36</b>
3.2	<b>Identifizierung immunogener, zellwandassoziierter Proteine von <i>S. aureus</i> mittels Proteomanalyse .....</b>	<b>38</b>
3.3	<b>Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine .....</b>	<b>43</b>
3.4	<b>Absorption und Aufreinigung antigenspezifischer Antikörper aus IVIG .....</b>	<b>46</b>
3.5	<b>Die opsonisierende Wirkung von anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160 .....</b>	<b>48</b>
3.6	<b>Induktion antigenspezifischer Antikörperproduktion durch Immunisierung mit rEno, rOxo und rhp2160 .....</b>	<b>50</b>
3.7	<b>Einfluss der antigeninduzierten Immunantwort auf eine <i>S. aureus</i>-Infektion.....</b>	<b>53</b>
3.8	<b>Überleben der immunisierten Mäuse nach Infektion mit <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>57</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>59</b>
4.1	<b>Identifizierung zellwandassoziierter Vakzine Kandidaten .....</b>	<b>59</b>
4.1.1	IVIG repräsentiert eine adäquate Quelle für opsonisierende, <i>S. aureus</i> -spezifische IgGs .....	63
4.1.2	SUPRA ermöglicht die Identifizierung zellwandassoziierter, immunogener <i>S. aureus</i> -Proteine .....	64
4.2	<b>Antibakterielle Aktivität der mittels SUPRA identifizierten Kandidaten.....</b>	<b>67</b>
4.2.1	Anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160 Antikörper induzieren bakterielle Opsonophagozytose.....	68
4.2.2	Immunisierung mit rEno, rOxo und rhp2160 führt zu einem protektiven Effekt gegen <i>S. aureus</i> -Infektion.....	69
4.3	<b>Impfstoff-Optimierung zur Prävention von <i>S. aureus</i>-Infektionen .....</b>	<b>71</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>75</b>
	<b>Referenzen .....</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
agr	<i>Accessory Gene Regulator</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST <sup>®</sup>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CA	Chloramphenicol
CBB	Coomassie Brilliant Blue R250
CFU	<i>colony forming units</i>
CHAPS	3-an der Entwicklung -propansulfate
CifA	<i>Clumping Factor A</i> (Fibrinogen-bindendes Protein)
Cna	Kollagen-bindendes Protein
CP	<i>Capsular Polysaccharide</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dSaIVIG	Depletiertes IVIG, absorbiert mit <i>S. aureus</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
FA	Freund-Adjuvans
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FnBP	Fibronectin-bindendes Protein
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase

IAA	Jodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani (Nährmedium)
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization-Time of Flight</i>
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MH	Miller-Hinton
MOI	Multiplizität der Infektion
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Tweenhaltige Phosphat-gepufferte Salzlösung
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSI	<i>Pounds per square inch</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SERPA	Serologische Proteomanalyse
SUPRA	Subtraktive Proteomanalyse
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBST	Tweenhaltige Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht
V	Volt
wt	Wildtyp

## 1. Einleitung

### 1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) zählt zu den fakultativ anaeroben, grampositiven Kokken aus der Familie der *Staphylococcaceae* (früher *Micrococaceae*). Der Koagulase produzierende *S. aureus* kommt in der Natur ubiquitär vor. Das Bakterium ist auch außerhalb seines Wirtsorganismus, z. B. in der Luft, Haut, Schuppen, Kleidung oder auf anderen unbelebten Flächen lange überlebensfähig und äußerst resistent gegenüber hohen Temperaturen. Die Besiedelung durch *S. aureus* als Kommensale der Haut und der Schleimhäute kommt sowohl bei Menschen wie bei Tieren vor. Weltweit ist ca. ein Drittel der Gesamtbevölkerung dauerhaft und asymptomatisch mit *S. aureus* kolonisiert. Ein noch höherer Bevölkerungsanteil (20-75%) ist vorübergehend mit dem staphylokokkalen Keim besiedelt [1].

### 1.2 Klinische Relevanz

Während *S. aureus* für gesunde Menschen einen harmlosen, zu der Hautflora gehörenden bakteriellen Keim darstellt, kann sich das Bakterium bei alten oder immungeschwächten Menschen zu einer lebensbedrohlichen Gefahr entwickeln. Gerade durch die stetig ansteigende Zahl an immunsupprimierten Patienten, den zunehmenden Einsatz von Kathetern, Implantaten oder anderen Polymeroberflächen in der Medizintechnik, aber nicht zuletzt auch wegen der Entstehung von resistenten Keimen gegen gängige Antibiotika, gewann *S. aureus* in den letzten 10 Jahren massiv an klinischer Bedeutung. Dadurch bedingt steigt die Nachfrage nach alternativen Behandlungs- und Präventivmaßnahmen gegen staphylokokkale Infektionen.

Als Hauptverursacher nosokomialer (im Krankenhaus erworbener) Infektionen gehört *S. aureus* mit fast 30 % zu den am häufigsten isolierten Mikroorganismen [1]. Aber auch als Erreger von außerhalb des Krankenhauses erworbenen Infektionskrankheiten (*community-acquired*) gewinnt er zunehmend an Bedeu-

tung [2]. Zu den häufigsten durch *S. aureus* verursachten Erkrankungen gehören vergleichsweise harmlose Wund- oder Hautinfektionen, wie Furunkel oder Karbunkel, aber auch lebensbedrohliche Krankheiten, wie Endokarditis, Osteomyelitis, Bakteriämie oder Sepsis. Diese invasiven Erkrankungen werden durch Virulenzfaktoren vermittelt, die durch Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix des Wirtes die Invasion des Bakteriums in die Wirtszellen bzw. -gewebe unterstützen. Weitere ernstzunehmende Erkrankungen werden durch die Sekretion von staphylokokkalen Toxinen verursacht. Dazu gehören Lebensmittelvergiftungen, welche durch die Enterotoxine A-O ausgelöst werden, das toxische Schock-Syndrom (TSS), das durch das Toxin-1 verursacht wird, und eine exfoliative Dermatitis (*staphylococcal scalded skin syndrome*), die durch die Einwirkung der exfoliativen Toxine A und B hervorgerufen wird [3-5]. Heute sind mehr als 40 verschiedene extrazelluläre Proteine, Enzymen und Oberflächenproteinen bekannt, die als Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*-Erkrankungen spielen [4]. Die zytolytische Aktivität der meisten Toxine führt zu einer aktiven Schädigung und Zerstörung von Wirtszellstrukturen bzw. -zellen. Neben dem porenbildenden  $\alpha$ -Toxin und den Hämolytinen sind insbesondere die Leukozydine bzw. das Panton-Valentin-Leukozydin zu erwähnen, welche eine gezielte Zerstörung von Immunzellen verursachen [6]. Einige der Toxine, wie z. B. TSST und die Enterotoxine, zeichnen sich neben ihrer zytotoxischen Aktivität durch die Eigenschaft eines „Superantigens“ aus. Superantigene sind biofunktionelle Moleküle, die durch Bindung an die MHC-II-Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen und an den T-Zellrezeptor der T-Zellen, die Funktion der T-Zellen negativ stimulieren und damit zur Dysregulation des Immunsystems führen [7, 8]. Die Neutralisation von humanen antimikrobiellen Peptiden, wie z.B. den Defensinen, stellt einen weiteren wichtigen Verteidigungsmechanismus von *S. aureus* gegenüber der wirtszelleigenen Immunantwort dar. Dazu zählen unter anderem die Metalloprotease Aureolysin und die Serinprotease Staphylokinase [9, 10]. Darüber hinaus sind die kapsulären Polysaccharide (CPs) und das Protein A zu erwähnen. Während die CPs das Bakterium vor dem Zugriff der phagozytierenden Immunzellen schützen [11], verhindert Protein A durch Bindung an die Fc-Region der IgG Antikörper eine effektive Aktivierung von wirtszelleigenen Immunzellen [12].

Zu dem wichtigsten Pathomechanismus von *S. aureus* gehört die Adhäsion der Bakterien an extrazelluläre Matrixkomponenten des Wirtes. Diese wird durch das Zusammenspiel von unterschiedlichen, an der Oberfläche des Bakterium lokalisierten Adhäsinen, wie die Fibronektin-bindende Proteine (FnBP), Kollagen-bindende Proteine (Cna) oder Fibrinogen-bindende Proteine (Clf A = *Clumpingfactor A*), vermittelt [13]. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*-Erkrankungen gehören die Adhäsine zu den prominentesten und best charakterisierten Oberflächenproteinen, auch in Bezug auf ihre Funktion als potentielle Vakzinekandidaten.

Die meisten der Adhäsine zählen zu der Familie der MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Sie zeichnen sich durch ein N-terminales Signalpeptid, das für den Transport des Proteins aus dem Zytoplasma zuständig ist, und eine C-terminale hydrophobe Region mit einem konservierten LPXTG-Motiv, das entscheidend für die kovalente Verankerung des Proteins in die bakterielle Zellwand ist, aus [14, 15]. Zu weiteren prominenten Mitgliedern der MSCRAMM-Familie gehört das Protein A, das sich jedoch aufgrund seiner immunmodulatorischen Funktion von den hauptsächlich adhäsiven Virulenzfaktoren unterscheidet [16]. Kürzlich führte eine eingehende Datenbankanalyse, in welcher sechs durchsequenzierte *S. aureus*-Genome nach offenen Leserastern mit der Kodierungssequenz für das LPXTG-Motiv durchsucht wurden, zur Identifizierung von insgesamt 21 LPXTG-Proteinen, davon 10 bis dahin unbekannte [17].

Eine weitere Gruppe von Oberflächenproteinen bilden die nicht-kovalent gebundenen Proteine. Durch ionische Wechselwirkungen sind sie mit der bakteriellen Zellwand assoziiert. Sie besitzen weder die N-terminale Signalsequenz noch das C-terminale LPXTG-Motiv und sind aufgrund des Fehlens eines konservierten, übergreifenden Motivs mittels bioinformatischen Screening-Methoden nicht identifizierbar. Auch darüber, auf welchem Weg diese nicht verankerten Proteine an die bakterielle Oberfläche gelangen, wird bis dato nur spekuliert. In den meisten Fällen handelt es sich bei diesen zellwandassoziierten Proteinen um Enzyme, die in metabolische und biogenetische Prozesse involviert sind. Gleichzeitig können sie als Virulenzfaktoren sowohl in adhäsive als auch invasive Pathogenitätsprozesse des Bakteriums involviert sein. Die staphylokokkallen Enzyme, Autolysin und Enolase sind zwei Vertreter dieser

neuen Virulenzgruppe. Neben ihrer wichtigen enzymatischen Funktion in der Zellwandsynthese und Zellteilung [18] binden die Autolysine/Adhäsine (Atl A/Aaa) Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin [19]. Die erst kürzlich an der bakteriellen Oberfläche identifizierte Enolase ist primär als eines der Schlüsselenzyme der Glykolyse bekannt, konnte jedoch wiederholt an der Oberfläche des Bakteriums identifiziert werden. Während Enolase in der Funktion eines Adhäsins mit hoher Affinität Plasminogen und Laminin bindet [20, 21], ist seine enzymatische Funktion an der Zelloberfläche noch nicht entschlüsselt. Das multifunktionale Eap-Protein (*extracellular adherence protein*), auch unter dem Namen Map (*MHC analogous protein*) bekannt, ist ein weiteres nicht-kovalent gebundenes Oberflächenprotein. Durch seine hohe Affinität zu Fibronectin, Fibrinogen und Vitronectin vermittelt Eap die Adhäsion und Internalisation von *S. aureus* an/in humane Zellen [22]. Durch Bindung an antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen führt Eap zur Inhibition der T-Zell-induzierten Immunantwort und damit zur Suppression des Immunsystems [23]. Nicht zuletzt wegen der multifunktionalen Aktivität werden die zellwandassoziierten Proteine in der Literatur als neue, erfolgversprechende Vakzinekandidaten propagiert.

Die fortwährende Entdeckung neuer Virulenzfaktoren bzw. alternativer Funktionen bereits bekannter Proteine verdeutlicht die enorme Komplexität des staphylokokkalen Pathomechanismus. Im Gegensatz zu anderen bakteriellen Pathogenen wird bei *S. aureus* selten eine Erkrankung durch die Einwirkung eines einzelnen Virulenzfaktors hervorgerufen. Mit Ausnahme des toxischen Schock Syndroms und der Enterotoxin-vermittelten Lebensmittelvergiftungen [24, 25] entstehen die *S. aureus*-assoziierten Erkrankungen als Folge einer Zusammenwirkung zahlreicher Virulenzfaktoren. Deutlich wird das anhand einer Vielzahl von *in vivo* Experimenten, in denen die *S. aureus*-vermittelte Virulenz anhand von für einen bestimmten Virulenzfaktor, wie z. B. CP 5, FnBP, Protein A und/oder  $\alpha$ -Toxin, defizienten Stämmen in experimentellen Tiermodellen untersucht wurde. Zwar konnte in vielen Fällen eine verminderte Virulenz der Defizienzmutanten festgestellt werden, die Entstehung einer Infektion mit der Folge einer Endokarditis, Mastitis, etc. konnte jedoch in keinem der Experimente vollständig verhindert werden [26-29]. In einer Katheter-assoziierten Infektion von Kaninchen konnte der für die drei prominentesten MSCRAMM-Adhäsine, FnBP, Cna und ClfA, defiziente *S. aureus*-Stamm eine Kolonisation mit

*S. aureus* nicht reduzieren. Vergleichbare Infektionsraten wurden sowohl für den defizienten Stamm als auch für den die drei Virulenzfaktoren exprimierenden *S. aureus*-Stamm beobachtet [30]. In einem Pneumoniae-assoziierten Infektionsmodell war der FnBP-defiziente *S. aureus*-Stamm sogar virulenter in der Ausprägung einer Pneumoniae in Ratten als der Wildtyp Stamm [31].

### 1.3 Resistenzentwicklung: MRSA

Antibiotika stellen bis heute das einzige effektive Mittel zur Behandlung von staphylokokkalen Infektionen dar. Das weltweit zunehmende Vorkommen von multiresistenten Stämmen erschwert die Behandlung von *S. aureus*-Erkrankungen massiv mit der Folge einer immer höheren Morbidität und Mortalität.

Der antibiotikaresistente *S. aureus* ist bekannt unter dem Namens Kürzel MRSA, das ursprünglich für „Methicillin-resistente *S. aureus*“ stand, heute aber allgemein für „multiresistente *S. aureus*“ verwendet wird. Methicillin war das erste  $\beta$ -Laktamase-stabile Antibiotikum und wurde ab 1959 wirkungsvoll gegen  $\beta$ -Laktam-resistente Staphylokokken eingesetzt. Bereits ein Jahr nach der Markteinführung, im Jahr 1960, wurde erstmals von einem Methicillin-resistenten klinischen Isolat (MRSA) berichtet [32]. Einige Jahre später erschienen die ersten gegen alle verfügbaren Penicilline resistenten MRSA [33], gefolgt von den ersten MRSA-Stämmen mit Resistenz gegen das Aminoglykosid Gentamycin im Jahr 1976 [34]. Die, verglichen mit anderen bakteriellen Pathogenen, sehr schnell fortschreitende Entwicklung von neuen Resistenzmechanismen führte zu einer immer häufigeren Prävalenz von MRSA-Stämmen, die nahezu gegen alle verfügbaren Antibiotika resistent waren [35]. Das Glykopeptid Vancomycin stellt nach wie vor das wirkungsvollste Antibiotikum zur Behandlung von MRSA Infektionen dar. Nach dem ersten Bericht über Vancomycin-intermediär-resistente *S. aureus*-Stämme (VISA) im Jahr 1997 [36-38], wurde in den USA nur fünf Jahre später der erste Vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA) identifiziert [39]. Kurz darauf folgten Berichte über weitere VRSA-Fälle in anderen Ländern [39-42].

Schon in den 70er Jahren führte der massive Einsatz von Methicillin zu periodisch auftretenden, epidemischen Ausbrüchen von MRSA auf Intensivstationen

[43]. Aber erst die in den letzten Jahren stetig zunehmende, weltweite Ausbreitung der MRSA Stämme machte die multiresistenten Staphylokokken zu einem schwerwiegenden Problem. Neusten Berichten zufolge wurde im Jahr 2004 in den USA auf Intensivstationen in fast 60 % der Fälle einer *S. aureus*-Infektion MRSA diagnostiziert. Innerhalb von nur zwei Jahren stieg die MRSA-Prävalenz um 11 % [44]. Die Mortalitätsrate von Patienten, die an einer MRSA-assoziierten Bakteriämie leiden, liegt bei 23 % [45]. Im Fall einer erfolgreich behandelten MRSA-Infektion entstehen erhebliche Zusatzkosten, die im Durchschnitt 6916 \$ pro Patient und Krankenhausaufenthalt betragen [45]. Mittlerweile ist die MRSA-Problematik nicht nur auf Krankenhäuser (HA-MRSA = *hospital-associated MRSA*) beschränkt, sondern breitet sich zunehmend als das sogenannte CA-MRSA (*community-associated MRSA*) auch in der Bevölkerung aus [46].

Durch die bereits heute schon sehr eingeschränkten therapeutischen Alternativen zur Bekämpfung von MRSA steht man den Infektionen immer häufiger machtlos gegenüber. Die Beobachtung einer stetig zunehmenden MRSA-Prävalenz und der damit verbundenen sehr hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten führte gerade in den letzten Jahren zu einem immensen Interesse an der Entwicklung alternativer Strategien zur Therapie und Prävention von MRSA.

#### **1.4 Impfstoffentwicklung zur Prävention von *S. aureus*-Infektionen**

Die ersten Bemühungen, einen effektiven Impfstoff (Vakzine) gegen *S. aureus* zu entwickeln, schlugen fehl als die Immunisierung mit dem Erreger selbst [47] oder einem staphylokokkalen Phagenlysate [48] keinen protektiven Effekt erzielte. In neueren Vakzinierungsstudien rückte die Immunisierung mit individuellen Zielstrukturen von *S. aureus*, denen eine entscheidende Rolle in der Virulenzentwicklung zugesprochen wird, stärker in den Vordergrund. Sowohl die Vakzinierung mit kapsulären Polysacchariden (CP = *capsular polysaccharide*), als auch mit einigen der Toxine, sowie mit den prominenten Adhäsinen, FnBp, Cna und ClfA, führte in den meisten Fällen zumindest zu einer partiellen Protektion gegen *S. aureus*-Infektionen.

Die kapsulären Polysaccharide (CP = *capsular polysaccharide*) stellen mit ihrer antiphagozytischen Aktivität einen wichtigen Pathomechanismus von *S. aureus* dar. Von den 13 bekannten Kapsel-Serotypen gehören die Typen 5 und 8 mit >80 % zu den am häufigsten vorkommenden Serotypen unter den *S. aureus*-Stämmen [49]. Die ersten Immunisierungsstudien an Mäusen zeigten, dass CP 5 und CP 8 nur eine schwache immunogene Wirkung hatten [50]. Die Immunisierung mit CP 5 verschaffte weder Ratten noch Kaninchen einen hinreichenden Schutz vor einer Kolonisation mit *S. aureus* in einem Endokarditis Infektionsmodell [47, 51]. Die Konjugation von CP5 bzw. CP8 an ein Trägerprotein, ein nicht-toxisches Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*, führte hingegen zu besseren Erfolgen. Das Konjugat induzierte sowohl hohe Titer an opsonischen, CP-spezifischen Antikörpern als auch eine T-Zellabhängige Immunantwort [50]. Passive Immunisierung mit anti-CP 5 Antikörpern reduzierte partiell die Häufigkeit von Endokarditis, Bakteriämie und Nierenabszessen in Ratten [52]. Eine aktive Immunisierung mit einer bivalenten CP5-CP8-Konjugatvakzine (StaphVax™) führte zu einer höheren Überlebensrate von Mäusen [53].

StaphVAX™ (Nabi Biopharmaceuticals) repräsentiert bis heute die einzige *S. aureus*-Vakzine, deren Effektivität bereits in klinischen Studien im Menschen untersucht worden ist. Mangels ausreichender Effektivität der CP5-CP8-Konjugatvakzine wurde jedoch die Phase III der klinischen Testung vorzeitig abgebrochen [54]. Die klinische Untersuchung scheiterte als in der randomisierten, Doppelblind-Studie, in der StaphVAX™ Hämodialysepatienten verabreicht wurde, trotz eines anfänglich hohen spezifischen Antikörpertiters nach 54 Wochen kein signifikanter Unterschied im Auftreten einer Bakteriämie bei den Patienten (27 von 892) und den Kontrollgruppen (37 von 906) festzustellen war. Nach diesem Misserfolg wird derzeit an einer neuen Generation von StaphVAX™ gearbeitet, in der das Konjugat durch ein weiteres Kapselpolysaccharid des Serotyps 336 ergänzt werden soll, um so ein breiteres protektives Spektrum zu erlangen. Zum anderen soll durch anschließende Boosterimmunisierung eine Langzeit-Protektivität gegen *S. aureus* erzielt werden [55]. Parallel zu der Vakzine wurde aus dem Serum von mit StaphVAX™ immunisierten Probanden das polyklonale Antikörperprodukt AltaStaph (Nabi Biopharmaceuticals) hergestellt. In der Phase II der klinischen Studien, in welcher die Verträglichkeit und

Wirksamkeit des Produktes in untergewichtigen Neugeborenen untersucht worden war, konnte eine gute Verträglichkeit von AltaStaph festgestellt werden. Die Studie ist jedoch gescheitert, als aufgrund von einer niedrigen Infektionsrate bei der Beobachtungsgruppe (nur 3% statt den erwarteten 9%) keine Aussage über die Effektivität von AltaStaph gemacht werden konnte [56].

*S. aureus* exprimiert eine breite Palette an unterschiedlichen extrazellulären Produkten, die als Virulenzfaktoren zytolytische, immunmodulatorische oder neutralisierende Funktionen bei der Pathogenese von staphylokokkalen Erkrankungen ausüben. Wegen der hohen Diversität in der Toxin-Produktion unter den *S. aureus*-Stämmen und der Tatsache, dass selten ein Toxin von allen staphylokokkalen Stämmen exprimiert wird [12], eignen sich die Toxine nur bedingt als Vakzinekandidaten. Das pathogenetisch wichtigste Hämolysin ist das porenbildende  $\alpha$ -Toxin aus der Familie der Exotoxine. Neben seiner hämolytischen Wirkung zeigt  $\alpha$ -Toxin auch zytotoxische und letale Effekte. Krankheitsbilder wie Gewebnekrose oder gangränöse Mastitis sind häufige Folgen. Die Immunisierung mit nicht-toxischem  $\alpha$ -Toxin konnte zwar die Ausprägung der Symptome einer staphylokokkalen Mastitis reduzieren, war jedoch nicht in der Lage eine Infektion zu verhindern [57, 58]. Mit anti- $\alpha$ -Toxin Serum passiv immunisierte Mäuse waren sowohl gegen das Toxin selbst als auch gegen die Infektion mit *S. aureus* partiell geschützt [59].

Die an der Oberfläche des Bakteriums lokalisierten Virulenzfaktoren stellen einen weiteren wichtigen Angriffspunkt für die Vakzinierung gegen *S. aureus* dar. Gerade in ihrer Funktion als Adhäsine spielen sie pathogenetisch eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer invasiven *S. aureus*-Erkrankung und sind damit zum Gegenstand zahlreicher Vakzinierungsstudien geworden. Als geeignete Ziele für opsonisierende Antikörper können sie eine Opsonophagozytose und damit die Eliminierung des Bakteriums durch Zellen des Immunsystems vermitteln. Die oft konträren Ergebnisse der Vakzinierungsstudien zeigen jedoch, dass der protektive Effekt erheblich von dem für die Untersuchung gewählten Infektionsmodell abhängt. Im Fall eines antibakteriellen Effektes konnte bestenfalls eine partielle Protektion gegen eine *S. aureus*-Infektion beobachtet werden.

Das immunmodulatorische Protein A war eines der ersten Oberflächenproteine, welches als Angriffsziel für eine Vakzinierung in experimentellen Tiermodellen untersucht wurde. Trotz eines hohen anti-Protein A Antikörpertiters, wies die Immunisierung keinen protektiven Effekt gegen Sepsis in neugeborenen Ratten auf [60]. Antikörper gegen das Fibronektin-bindende Protein (FnBP) boten einen gewissen Schutz sowohl gegen eine experimentelle Ratten-Endokarditis [61] als auch gegen eine murine Mastitis [58]. Nach der Immunisierung mit einem rekombinanten Fragment des Kollagen-bindenden Proteins (Cna) wurde in einem murinen Modell einer septischen Arthritis eine protektive Immunantwort berichtet [62], während Cna-Immunisierung keinen Schutz vor einer Mastitis bot [58]. Antikörper gegen das Fibrinogen-bindende Protein (Clf A) zeigten eine protektive Wirkung gegen eine murine Mastitis Infektion [58]. Nach Verabreichung von monoklonalen anti-Clf A Antikörpern, mAb 12-9 (Aurexis<sup>®</sup>), war eine deutlich höhere Überlebensrate von MRSA-infizierten Mäusen in einem *in vivo* Sepsis Modell zu beobachten [63]. Das Antikörperpräparat Aurexis<sup>®</sup> befindet sich derzeit in der Phase II der klinischen Studien, in der die Verträglichkeit und die Pharmakodynamik des Produktes in Bakteriämie-Patienten analysiert wird. Die ersten Ergebnisse zeigten eine mit anderen Antikörperpräparaten vergleichbare Toleranz von Aurexis<sup>®</sup> [64]. Untersuchungen zur Dosis und Wirkung des Präparates sollen anschließend folgen.

Die Vakzinierungsstudien der letzten 20 Jahre zeigen deutlich, dass eine monovalente Vakzine mit einem individuellen Virulenzfaktor als Angriffspunkt definitiv nicht ausreicht, um eine effektive Prävention einer *S. aureus*-Infektion zu erreichen. Die staphylokokkale Virulenzfaktoren zeichnen sich durch große strukturelle und funktionelle Unterschiede aus. Proteine können als Enzyme, Toxine oder Adhäsine entweder an der bakteriellen Oberfläche als kovalent-gebunden oder assoziiert vorkommen, sowie sezerniert werden. Sie können zytotoxische, lytische, enzymatische, adhäsive, invasive, antiphagozytische oder immundysregulatorische Funktionen ausüben. Darüber hinaus können sie als Virulenzfaktoren oft multifunktional oder funktional-redundant wirken. Gerade diese funktionale Redundanz macht es unmöglich, durch Inaktivierung eines individuellen Virulenzfaktors die Pathogenität von *S. aureus* entscheidend zu senken. Des Weiteren unterliegt die Expression der staphylokokkale Pathogenitätsfaktoren einer strikten regulatorischen Kontrolle und kann, je nach Bedarf,

abhängig von Umweltbedingungen durch das Bakterium selbst herunter- bzw. hochreguliert werden. Das prominenteste Beispiel der globalen Virulenzregulatoren ist das *agr*-Zwei-Komponenten-System (*two component system*, TCS), das zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Sar A die Expression der meisten staphylokokkalen Virulenzfaktoren reguliert [65-67]. Gerade bei einer monovalenten Vakzinierung besteht die Gefahr, dass die vakzine Zielstruktur nur periodisch oder, aufgrund der bakteriellen Anpassung, gar nicht mehr exprimiert wird, was dazu führt, dass die Vakzine wirkungslos bleibt. Als Vakzinekandidaten würden sich daher solche Proteine optimal eignen, die an der Oberfläche des Bakteriums in überlebensnotwendige metabolische Prozesse involviert sind. Eine Kombination aus mehreren Proteinen dieser Art würde zusätzlich eine protektive und dauerhafte Wirkung einer solchen Vakzine sichern. Die Identifizierung geeigneter Vakzinekandidaten zur Herstellung einer polyvalenten Vakzine stellt damit einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung eines effektiven Wirkstoffes gegen *S. aureus*-Infektionen dar.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die weltweite Prävalenz von multiresistenten *S. aureus*-Stämmen, die steigende Zahl an immunsupprimierten Patienten, sowie die Zunahme im Gebrauch von Kathetern und anderen künstlichen Hilfsmitteln in der Medizintechnik macht *S. aureus*-Infektionen zu einem immer schwerer kalkulierbaren Risiko. Abgesehen von den noch wenigen, zur Verfügung stehenden, wirksamen Antibiotika, speziell in der Behandlung von MRSA-assoziierten Infektionen, ist es bis heute nicht gelungen, alternative Strategien zur Heilung und Prävention von staphylokokkalen Infektionen zu entwickeln.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ein neues, auf der Proteomanalyse basierendes Verfahren entwickelt werden, das die Identifizierung von neuartigen, immunogenen Oberflächenproteinen von *S. aureus* ermöglicht. Der Fokus soll speziell auf die Identifizierung von zellwandassoziierten, nicht-kovalent gebundenen Proteinen gerichtet werden. Kommerziell erhältliche, intravenöse Immunglobulin G Präparationen (IVIGs), die sich allgemein durch ein breites Spektrum an IgGs mit einer hohen Diversität auszeichnen, sollen dabei als Ausgangsmaterial zur Immunodetektion immunreaktiver, in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennter Oberflächenproteine dienen. An die anschließende MALDI-TOF-Sequenzierung und die Datenbank-gestützte Identifizierung der Proteinkandidaten soll anhand verschiedener Proteine die Effizienz der hier angewandten Identifizierungsmethode untersucht werden. Dazu sollen exemplarisch ausgewählte Kandidaten als GST-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt werden, um sie anschließend zur Aufreinigung von korrespondierenden Antikörpern aus IVIG zu verwenden. In *in vitro* Opsonophagozytose-Untersuchungen soll dann die Effektivität der Antikörper, eine Neutrophil-vermittelte Opsonophagozytose von *S. aureus* zu induzieren, ermittelt werden. Des Weiteren werden die rekombinanten Antigene dazu verwendet, Mäuse zu immunisieren, um anschließend den protektiven Effekt der Kandidaten in einem *in vivo* Sepsismodell zu analysieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, falls nicht gesondert erwähnt, in p. a. Qualität von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Applichem (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firma Operon (Köln) synthetisiert und in entsalztem Zustand geliefert. Puffer und Lösungen wurden entweder von Biorad (München) bezogen oder aber mit deionisiertem, bidestilliertem Wasser (EASYpure® II UV/UF, Barnstead) angesetzt und, wenn erforderlich, autoklaviert oder mit 0.2 µm Filter (Satorius, Göttingen) steril filtriert. Die Hersteller anderer verwendeter Materialien sind im Text aufgeführt.

#### 2.1.2 Geräte

Gerät	Gerätbezeichnung	Hersteller
Chromatographiesystem	ÄKTA™purifier	GE Healthcare
Elektrophoresekammer	Protean II xi Cell	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Criterion Cell	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Ettan Dalt II System	GE Healthcare
ELISA-Reader	MRX Tc	Dynex Technologies
Entwicklungsautomat	AGFA Curix 60	AGFA
Feinwaage	Sartorius laboratory	Sartorius
French®Press Zelle	K20, 20000 PSI	ThermoSpectronic
Geldokumentationsanlage	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Hochdruckhomogenisator	French®Press	ThermoSpectronic
IEF	Multiphor II	GE Healthcare

Gerät	Gerätbezeichnung	Hersteller
<i>in vivo</i> Visualisierungssystem	IVIS® 50	Xenogen
Koloniezähler	Coutermat FLASH	IUL
Laborwaage	Sartorius laboratory	Sartorius
MALDI-TOF MS	Reflex IV	Bruker Daltonics
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
PCR-Maschine	Thermocycler T3	Biometra,
Spektrophotometer	Genesis 20	Thermo
Spiralplater	Eddy Jet	IUL
Stromquelle	EPS-3501xL	GE Healthcare
Stromquelle	Power Pac 3000	Bio-Rad
Tank-Blotter	Criterion blotter (9.4x15 cm)	Bio-Rad
Tank-Blotter	Trans-Blot cell (16x20 cm)	Bio-Rad
Taumel-Rollenmischer	Cat RM5	Zipperer
Test-Tube-Rotator	Modell 34528	Snjiders
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus
Zentrifuge	RC 5 C plus	Sorvall

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Agarosegelkammern	Bio-Rad
Bottle-Top-Filter PES, 0,45µm	Nalgene
Centricon-Plus 70, 30 000 MWCO	Millipore
Criterion Empty Cassettes	Bio-Rad
ECL Hyperfilm	GE Healthcare
Ettan Dalt Gel	GE Healthcare
GSTrap™ FF Columns	GE Healthcare
HiPrep™ 26/10 Desalting Column	GE Healthcare

Name	Hersteller
HiTrap™ NHS-activated HP Columns	GE Healthcare
IEF-Elektroden Streifen	GE Healthcare
IPG-Streifen (3-10NL/4-7 NL)	GE Healthcare
Mikrotiter-Platten Maxisorp, 96-well	Nunc
Mueller-Hinton Agarplatten	Oxoid
Nitrocellulose	Schleicher & Schuell
Sterifix Membranfilter, 0,2µm	Braun

#### 2.1.4 Kits

Name	Hersteller
DC-Protein Assay	Bio-Rad
ECL Detection Reagent	GE Healthcare
Ettan Dalt Buffer Kit	GE Healthcare
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen
QIAquick PCR Purification	Qiagen
TMB Reagenz	BD Biosciences

#### 2.1.5 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	Genotyp
Top10 (Invitrogen)	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>araleu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
DH5α	φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169
BL 21	F', <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> , ( <i>rB-m B-</i> ), <i>gal</i>

<b><i>Staphylococcus aureus</i> (S. aureus)</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Herkunft</b>
ATCC 29213	(MSSA)	American Type Culture Collection
ATCC 29213-GFP	Ampicillin/ Chloramphenicol	Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Köln, S. Leggio
Xen29	Kanamycin	Xenogen Corp., Alameda, USA

### 2.1.6 Oligonukleotide

<b>Gen-Spezifität</b>	<b>Name</b>	<b>Nukleotidsequenz</b>
Enolase (Eno)	Eno_5f	5'-CACCATGCCAATTATTA CAGATG-3'
	Eno_3r	5'-TTATTTATCTAAGTTATAGAATGATTTG-3'
Oxoacyl-Reduktase (Oxo)	Oxo_5f	5'-CACCATGAAA ATGACTAAGAGTGCT-3'
	Oxo_3r	5'-TACATGTACATTCCACCATTTACATG-3'
hp2160	hp2160_5f	5'-CACCTTGATTAGAAACCGTGTTATG-3'
	hp2160_3r	5'-TTAGTTATTTTGTGTTACATCCTCATC-3'

### 2.1.7 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-GST IgG 1:2500	Primärer, (polyklonaler) Ziege-anti-GST IgG Antikörper	GE Healthcare
Anti-human IgG 1:1250	Sekundärer, Peroxidase (HRP)-gekoppelter (polyklonaler) Ziege-anti-human IgG Antikörper	Sigma
Anti-Maus IgG 1:5000	Sekundärer, Peroxidase (HRP)-gekoppelter (polyklonaler) Ziege-anti-Maus IgG Antikörper	Sigma
Anti-Ziege IgG 1: 5000	Sekundärer, Peroxidase (HRP)-gekoppelter (polyklonaler) Kaninchen-anti-Ziege IgG Antikörper	Sigma
IVIg (Octagam®) 1:500	Intravenöses Immunglobulin G Präparation (IVIg)	Octapharma

### 2.1.8 Enzyme

Bei allen enzymatischen Reaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

Name	Hersteller
Pfu-Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen	Fermentas

### 2.1.9 Vektoren

Name	Hersteller
pENTR™/D-TOPO	Invitrogen
Gateway® pDEST™15	Invitrogen

### 2.1.10 Mausstämme

Für Immunisierungsstudien verwendete, weibliche, 5-6 Wochen alte C57/BL6 Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen.

### 2.1.11 PCR

Oligonukleotide	Stammlösung: 50 pmol/μl Arbeitskonzentration: 10 pmol/μl
dNTPs	Stammlösung: 10 mM Arbeitskonzentration: 0,1 mM

### 2.1.12 Agarosegele

50x TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,5
10x Ladepuffer	200 mM Tris-Acetat, 5 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 0,01 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin (v/v), pH 8,0 bei 37°C 3 h schütteln
1 Kb DNA-Leiter	100 μl 1 Kb Plus DNA-Leiter (Invitrogen), 400 μl 10x Ladepuffer, 500 μl A. dest
1% Agarosegel	1 g Agarose, 100 ml 1x TEA-Puffer, 1 μl Ethidiumbromid (10 μg/ μl)

### 2.1.13 Anästhesie

#### Ketavet-Rompun Narkotikum

87,5 % physiologische NaCl-Lösung (0,9 %)  
 10 % Ketavet (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)  
 2,5 % Rompun (2 % Xylazinhydrochlorid)  
 intraperitoneale Verabreichung (i.p.), 200 µl/20 g Mausgewicht

### 2.1.14 Bakterienkultur

LB -Medium	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl, pH 7 auf 1 L mit A. dest. auffüllen
LB-Agar	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl, 15 g Agar, pH 7 auf 1 L mit A. dest. auffüllen
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, 5 ml, 2 M MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose, pH 7,0
Ampicillin	Stammslg.: 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O Arbeitskonzentration: 50 µg/ml
Chloramphenicol	Stammslg.: 10 mg/ml in MeOH Arbeitskonzentration: 20 µg/ml
Kanamycin	Stammslg.: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O Arbeitskonzentration: 50 µg/ml

### 2.1.15 1D- und 2D-SDS-PAGE

Laemmli-Puffer	0.06 M Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 25 % Glycerol, 0.2 % Bromphenolblau, 10 % 2β-Mercaptoethanol
Rehydratisierungslsg.	8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 40 mM DTT, 1 % CHAPS, 0.5 % Pharmalyte
Äquilibrierungslsg.	50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0.05 % Bromphenolblau
10x Tris/Tricine/SDS	Bio-Rad
TT-Puffer	3M Tris-HCl, 0,3 % SDS, 1 mM EDTA, pH 8.5
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

**2.1.16 Gelfärbung**

Silberfärbung	Fixierer:	50 % EtOH, 10 % Essigsäure
	Inkubationslsg.:	30 % EtOH, 6.8 g NaAcetat 0.5 % Glutaraldehyd (25 %-ig) 0.2 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O in 100 ml A. bidest.
	Färbung:	0.1 g AgNO <sub>3</sub> 0.02 % Formaldehyd (37 %-ig) in 100 ml A. bidest.
	Entwicklung:	2.5 g Natriumcarbonat 0.01 % Formaldehyd (37 %-ig) in 100 ml A. bidest.
	Stopplsg.:	5 % Essigsäure
Coomassie	Färbelsg.:	2.5 % Coomassie Brillant R250, 45 % Ethanol, 15 % Essigsäure
	Entfärbelsg.:	45 % Methanol, 15 % Essigsäure

**2.1.17 Western Blot und Immunfärbung**

TBST-Puffer (10x)	1.5 M NaCl, 0.5 M Tris, 0.5 % Tween 20, pH 7.4
PBST-Puffer (10x)	1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.2 % Tween 20, pH 7.4
Blocklsg.	5 % Magermilch, 2 % BSA in 1x TBST
Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 20 % Methanol
Stripping-Puffer	62.5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 100 mM 2β-Mercaptoethanol, pH 6.8

**2.1.18 Kolonieblot**

Denaturierungslösung	0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
Neutralisierungslösung.	1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4
SSC (20x)	0.3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7.0

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation von zellwandassoziierten Proteinen

Zur Gewinnung zellwandassoziiierter Proteine wurde der wt *S. aureus*-Stamm ATCC 29213 einem Glycerolstock entnommen und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Nach mindestens 12 h Inkubation bei 37°C wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte in 100 ml LB-Medium überführt und für etwa 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die sogenannte Vorkultur dazu verwendet, die Hauptkultur auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,05 einzustellen. Die Bakterien wurden unter konstantem Schütteln und bei aeroben Bedingungen bis zum Erreichen einer späten exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> = 0,8) kultiviert. Die Ernte der Staphylokokken erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 17000 x g und 4°C in 250 ml Zentrifugen-Bechern in der Sorvall Zentrifuge. Die Bakterienpellets wurden anschließend zwei Mal in 10 mM TE-Puffer gewaschen und bis zur Proteinextraktion bei – 20°C aufbewahrt. Die zellwandassoziierten Proteine wurden nach der Methode von Antelmann [68], mit geringfügigen Modifikationen gewonnen. Mit einem Extraktionspuffer aus 1,5 M LiCl in 25 mM Tris-HCL-Lösung (pH 7,2) wurden Proteine isoliert, die über ionische Wechselwirkungen in der Zellwand der Bakterien verankert sind. Dazu wurden Bakterienpellets in 10 ml Extraktionspuffer, der einen Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete, Roche) enthielt, resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (20 min/17000 x g/4°C) wurden die aus der bakteriellen Zellwand gelösten Proteine von den sonst intakten Bakterienzellen getrennt und ÜN in 10 % TCA (w/v) bei 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde anschließend 60 min bei 17000 x g und 4°C pelletiert und das Proteinpellet mit 100%igem (2x) bzw. 70%igem (1x) EtOH (-70°C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die zellwandassoziierten Proteine wurden dann durch vorsichtiges Schütteln in einem Thermomixer für 30 min bei RT und 300 rpm in 400 µl 8 M Harnstoff gelöst. Ungelöste Aggregate wurden durch anschließende Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g und RT entfernt und der Überstand, der die zellwandassoziierten Proteine enthielt, für die 2D-Gelelektrophorese verwendet.

### 2.2.2 Depletion von *S. aureus*-spezifischen IgGs

*S. aureus* ATCC 29213 von einer Blutagarplatte wurde dazu verwendet, 200 ml LB-Medium anzupflanzen. Die Bakterien wurden ÜN bei 37°C kultiviert und am nächsten Tag mittels Zentrifugation bei 17000 x g, 4°C und 30 min geerntet. Die Pellets wurden zwei Mal mit 1xPBS, pH 7,3 gewaschen und anschließend in 10 ml IVIG (Octagam®) aufgenommen. Die Adsorption *S. aureus*-spezifischer Antikörper erfolgte durch langsames Rollen der Suspension ÜN bei 4°C in 50 ml Falkons auf einem Taumel-Rollenmischer. Nach Zentrifugation für 20 min bei 17000 x g und 4°C wurde das Bakterienpellet, welches die gebundenen und somit *S. aureus*-spezifischen Antikörper enthielt, verworfen. Der Überstand, der das depletierte IVIG darstellte, wurde abgenommen und durch einen 0,2 µm Membranfilter filtriert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels des Bio-Rad DC Assays nach Anweisung des Herstellers bestimmt.

### 2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad DC Assays durchgeführt. Für die Proteinbestimmung zellwandassoziiierter Proteine wurde eine BSA-Standardreihe verwendet, wobei das BSA in 4 M Harnstoff gelöst war. Für die Konzentrationsbestimmung weiterer Proteinfraktionen, hierzu zählen u.a. das depletierte IVIG (dSaIVIG), *E. coli*-Zelllysate, affinitätsaufgereinigte Fusionsproteine sowie Antikörper, wurde eine in PBS gelöste BSA-Standardreihe benutzt. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers in einer Mikrotiter-Platte. Vermessen wurde im ELISA-Reader bei 750 nm.

### 2.2.4 1D-Gelelektrophorese

Die 1D-Gelelektrophorese wurde mit 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen nach der von Schagger und Jagow beschriebenen Methode [69] durchgeführt. Als apparatives System diente die Criterion Apparatur, kombiniert mit Criterion-Leerkassetten (13,3 x 8 cm, BioRad). Als Laufpuffer wurde 1x Tris/Tricine/SDS Puffer (Bio-Rad) verwendet.

Die aufgetragene Proteinmenge variierte je nach der aufzutrennenden Proteinfraktion. Während bei Gesamtzelllysaten 10 µg Protein pro Spur aufgetragen wurde, betrug die Proteinmenge bei affinitätsaufgereinigten Proteinfractionen jeweils nur 2,5 µg pro Spur. Das Gesamtvolumen der Proteinproben lag zwischen 5-20 µl und war abhängig von Proteinkonzentration und Anzahl der Proben pro Gellauf. Die erwünschte Proteinmenge wurde mit einer 50 %igen Glycerin-Lösung und 10x Lämmli-Probenpuffer auf das entsprechende Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und auf das Gel geladen. Als Größenstandard diente der „high range“ Rainbowmarker (GE Healthcare). Die Visualisierung der Proteinauftrennung erfolgte entweder mittels Silber- oder Coomassie-Färbung (Kap. 2.2. 6 bzw. 2.2.7). Eine Western Blot Analyse mittels einer spezifischen Antikörperfärbung (Immunfärbung) (Kap. 2.2.8) wurde durchgeführt, soweit ein spezifischer Proteinnachweis erforderlich war.

### **2.2.5 2D-Gelelektrophorese**

In der 2D-Gelelektrophorese erfolgt die Trennung der Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Parametern, dem isoelektrischen Punkt (pI) und der Molmasse eines Proteins. In der 1. Dimension werden die Proteine in einem immobilisierten pH-Gradienten ihrem pI entsprechend aufgetrennt. Dieser Vorgang wird als isoelektrische Fokussierung (IEF) bezeichnet. In der 2. Dimension werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts (MG) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

Die in 8 M Harnstoff gelösten zellwandassoziierten Proteine (Kap. 2.1.1) wurden auf 18 cm langen Gelstreifen mit immobilisiertem, nicht-linearem pH-Gradienten (IPG Streifen, GE Healthcare) fokussiert. Die Proteine wurden zunächst in einem breiten pH-Bereich (pH 3-10), der sowohl sehr saure als auch sehr basische Proteine erfasst, aufgetrennt. Da die Mehrheit der Proteine jedoch im sauren pH-Bereich fokussierte (pH 4-5), sind die Proteine zusätzlich in einem engeren pH-Bereich (pH 4-7) aufgetrennt worden, um eine höhere Auflösung dieser Proteine zu erzielen. Die Rehydratisierung der Proteine erfolgte ÜN in einem Gesamtvolumen von 400 µl. Für Silber- und Immunfärbung wurden 100 µg Protein und für Coomassie-Färbung 500 µg Protein mit der Rehydrati-

sierungslösung (Kap. 2.1.15) versetzt und in einem Thermomixer 20 min solubiliert. Nach anschließender Zentrifugation von 20 min bei 17000 x g und 18°C wurde der Überstand für die ÜN-Rehydratisierung der IPG-Streifen verwendet. Am nächsten Tag wurden die Streifen für die IEF in die Multiphor II (Pharmacia FRG) überführt und mit Paraffinöl bedeckt. Die IEF der Proteine erfolgte entsprechend den Herstellerangaben bei 18,5°C in vier Phasen:

Phase 1:	500 V	1mA	5W	2500 <sup>V</sup> / <sub>h</sub>
Phase 2:	500 V	1mA	5W	2500 <sup>V</sup> / <sub>h</sub>
Phase 3:	3500 V	1mA	5W	10 k <sup>V</sup> / <sub>h</sub>
Phase 4:	3500 V	1mA	5W	45 k <sup>V</sup> / <sub>h</sub>

Nach Beendigung der IEF wurden die Proteine in der 2. Dimension entsprechend ihres Molekulargewichts mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Um einen optimalen Proteintransfer vom immobilisierten pH Gradienten (IPG) auf die zweite Dimension zu erzielen, wurden die Streifen zuvor in zwei Schritten in einem SDS-haltigen Puffer äquilibriert. Im ersten Schritt wurden die Proteine reduziert und denaturiert. Dazu wurden die fokussierten Gelstreifen 15 min in einer Äquilibrierungslösung (Kap. 2.1.12) inkubiert, die außerdem 7,5 mg/ml DTT enthielt. Neben der Spaltung von hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine durch SDS führt die reduzierende Thiolverbindung zur Spaltung von Schwefelstoffbrücken. Diese so freigewordenen SH-Gruppen wurden im zweiten Äquilibrierungsschritt durch Zusatz von 45 mg/ml Iodacetamid alkyliert. Anschließend wurden die IPG-Streifen nach Gebrauchsanweisung des Herstellers in die 2. Dimension überführt. Die Proteine wurden auf 12,5 % Tris-Glycin-SDS-Fertiggelen (25 x 20 cm) mit Hilfe des Ettan Dalt II Systems (GE Healthcare) aufgetrennt. Der Vorteil des Systems ist, dass in der Elektrophoresekammer die Proteine auf bis zu 12 Gelen gleichzeitig, somit unter gleichen Bedingungen, aufgetrennt werden können.

### **2.2.6 Silberfärbung**

Die hier angewandte, modifizierte Silberfärbung (Kap.2.1.16) erfolgte nach der Methode von Mann [70]. Die Gele wurden ÜN fixiert und anschließend für 30 min in die Inkubationslösung gelegt. Nach dreimaligem Waschen in A. bidest. für 10 min wurden die Gele in die Silbernitratlösung überführt und 20 min inkubiert. Nach anschließender Entwicklung der Gele wurde die weitere Reduktionsreaktion mittels der Stopplösung unterbunden. Nach Beenden der Färbung wurden die Gele in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

### **2.2.7 Coomassie-Färbung**

Die Gele wurden 2 h in der Coomassie-Färbelösung (Kap. 2.1.16) geschwenkt, anschließend in die Entfärberlösung überführt und so lange entfärbt bis sie die erwünschte Farbintensität angenommen haben. Der Färbevorgang wurde mit einem 30-minütigem Waschschrift in A. bidest. abgeschlossen. Die Gele wurden eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

### **2.2.8 Western Blot und Immunfärbung**

Der Transfer der mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten zellwandassoziierten Proteine auf Nitrozellulose-Membran erfolgte mit Hilfe des Trans-Blot Cell Systems (Bio-Rad) nach den Anweisungen des Herstellers. Nach dem Transfer für eine Dauer von 2 h bei 250 mA wurde die Nitrozellulose-Membran in den Block-Puffer (Kap. 2.1.17) überführt, um bei einer ÜN-Inkubation bei 4°C freie Bindungsstellen zu sättigen. Im Anschluss inkubierte die Membran mit dem Primärantikörper (dSaIVIG) in einer Verdünnung von 1:500 für 4 h bei 4°C und wurde anschließend drei Mal für 10 min in TBST gewaschen. Nach dem Entfernen der überschüssigen, nicht gebundenen Primärantikörper erfolgte die Färbung mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (anti-human IgG). Die Membran wurde mit dem 2. Ak, der in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt wurde, für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach dem darauf folgendem Waschschrift von 3x10 min in TBST wurde die Membran mit dem ECL-Reagenz (GE Healthcare) nach Gebrauchsanweisung des Herstellers versetzt und die Proteinsignale mit-

tels der chemolumineszenten Reaktion auf dem ECL Hyperfilm (GE Healthcare) in der Entwicklermaschine visualisiert.

Um einen bereits entwickelten Immunoblot erneut mit einem anderen Primärantikörper zu färben, wurde die Membran nach Erstentwicklung 5x5 min in PBST gewaschen und anschließend im Wasserbad bei 50°C im Stripping-Puffer (Kap. 2.1.17) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein erneuter Waschschrift von 5x5 min in PBST und 1x10 min in TBST. Anschließend wurde die Membran mit dem 1. Antikörper, gefolgt von dem 2. Antikörper, wie oben beschrieben, angefärbt.

Für alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Western Blot Analysen wurde das Criterion-Blotter-System (Bio-Rad) benutzt. Der Proteintransfer erfolgte innerhalb von 90 min bei 250 mA. Die Immunodetektion wurde nach der im vorstehenden Abschnitt beschriebenen Prozedur durchgeführt. Die eingesetzten Verdünnungen von Primär- und Sekundärantikörpern für die Immunfärbung sind in Kap. 2.1.7 aufgelistet.

### **2.2.9 Identifizierung von Vakzinekandidaten**

Die Identifizierung der immunreaktiven Zielproteine aus den zweidimensionalen Gelen erfolgte mittels MALDI-TOF Analyse.

Hierfür wurden die in der Western Blot Analyse differentiell detektierten Proteinspots zunächst den Proteinen auf den silbergefärbten Gelen, im nächsten Schritt den auf den Coomassie gefärbten Gelen zugeordnet. Da die Silberfärbung Proteine chemisch modifiziert und sie deshalb nicht mittels Massenspektrometrie identifiziert werden können, wurden die Proteinspots aus dem präparativen Coomassie-Gel ausgeschnitten und an das ZMMK Servicelabor (Köln) für die MALDI-TOF-Analyse weitergeleitet.

Die MALDI Massenspektren wurden mit dem Bruker Reflex IV Mass Spektrometer (Bruker-Daltonik, Leipzig) aufgenommen. Die Auswertung aller gewonnenen Daten wurde unter Verwendung der XMASS 5.15 sowie der BioTools 2.0 Postanalysis Software durchgeführt.

Zur Identifizierung der Zielproteine wurden die aus der MALDI-TOF Analyse resultierenden Peptidspektren mit Hilfe von Mascot (Matrix Science, London, UK) (<http://www.matrixscience.com>) unter Verwendung einer speziell dafür einge-

richteten *S. aureus*-Datenbank analysiert. Die verwendete *S. aureus*-Datenbank enthielt ausschließlich *S. aureus*-Sequenzen der vier bis dato durchsequenzierten *S. aureus*-Genome (Mu50, MW2, N315 und MRSA COL). Die Datenbanksuche erfolgte unter Berücksichtigung einer Massengenauigkeit von  $\leq 55$  ppm und der posttranslationalen Carbamidomethyl-Modifikation von Cysteinresten. Als Kriterium für eine erfolgreiche Proteinidentifizierung galt ein signifikanter MASCOT Score von  $>56$  ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.10 Klonierung von GST-Fusionsproteinen

Zur Generierung von N-terminalen GST-Fusionsproteinen wurde das Gateway System (Invitrogen) verwendet. Entsprechende DNA-Fragmente wurden unter Verwendung der im Kapitel 2.1.6 aufgelisteten Oligonukleotide mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA, die zuvor aus dem *S. aureus*-Stamm ATCC 29213 isoliert wurde. Die PCR-Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema:

Initiale Denaturierung	2 min bei 94°C	
Denaturierung	30 s bei 94°C	← 30 x
Annealing (Primer-Anlagerung)	45 s bei 50°C	
Elongation (Primer-Verlängerung)	3 min bei 72°C	
Finale Elongation	10 min bei 72°C	

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in den „Eingangsvektor“ (Entry Vektor) pENTR/D-TOPO nach Anweisungen des Herstellers kloniert und in den *E.coli* TOP10 Stamm (Invitrogen) transformiert. Nach der anschließenden Aufreinigung der DNA Plasmide und der darauffolgenden Restriktionsanalyse mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV und NotI wurde die Richtigkeit der Gensequenz mittels Sequenzierung bestätigt. Der Transfer der Zielgene aus dem „Eingangsvektor“ in den „Zielvektor“ (Destination Vektor) pDEST15 erfolgte mittels LR Rekombination. Der pDEST15 Vektor kodierte für das N-terminale GST-Gen. Für die Restriktionsanalyse der aufgereinigten Plasmide wurden die Restriktionsenzyme NotI und BamHI verwendet. Nach Transformation in den

*E. coli* DH5 $\alpha$  Stamm, wurden positive Klone, die mittels Restriktionsanalyse ermittelt wurden, in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 transformiert.

### **2.2.11 Selektion von Expressionsklonen mittels Kolonie Blot**

Die Selektion von rekombinanten, GST-exprimierenden Klonen wurde mittels des Kolonie Blots durchgeführt. Die Transformationsansätze (Kap. 2.2.10) wurden auf LB-Amp Agarplatten in entsprechenden Verdünnungen ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Durch Auflegen eines Nitrozellulose-Rundfilters auf die Transformationsplatte wurden die Kolonien auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran auf eine Ampicillin- und IPTG-haltige (250 mM) Agarplatte aufgelegt und 4 h bei 37°C inkubiert. Die folgenden Behandlungsschritte erfolgten durch Auflegen der Membran auf ein mit entsprechenden Lösungen (Kap. 2.1.18) getränktes 3MM Filterpapier (Whatman). Zur Lyse der Zellen, Denaturierung der DNA und Kopplung der DNA an die Membran wurde der Nitrozellulose-Filter 10 min in 10 % SDS-Lsg. und anschließend 5 min in der Denaturierungslösung inkubiert. Neutralisiert wurde die Membran durch zweimalige Inkubation für jeweils 5 min in der Neutralisierungslösung. Nach abschließender Inkubation in 2xSSC für eine Dauer von 15 min wurde die Membran zur Immunfärbung in die Blocklösung überführt. Die Immunodetektion erfolgte analog zu der im Kap. 2.2.8 beschriebenen Methode. Positive Signale wurden den Kolonien auf der Transformationsplatte zugeordnet und anschließend dazu verwendet, Glycerolstocks für nachfolgende Expressionsstudien anzulegen.

### **2.2.12 Expression von GST-Fusionsproteinen**

Zur Expression der GST-Fusionsproteine wurde der entsprechende *E. coli* BL21-Expressionsklon aus dem Glycerolstock auf eine frische LB-Amp Agarplatte ausgestrichen, um daraufhin mit einer Einzelkolonie eine 100 ml ÜN-Kultur anzupfen. Nach der ÜN-Inkubation bei 37°C wurde jeweils 10 ml der ÜN-Kultur zu 400 ml LB überführt und die 400 ml-Kulturen bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 30°C inkubiert. Nach der Induktion der Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG wurde die Inkubation der Kulturen ÜN bei 25°C (rEno, rhp2160) bzw. für 4 h bei 27°C (rOxo) fortgeführt.

Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 17000 x g für 20 min bei 4°C. Anschließend wurden die Pellets 1-2 Mal in 1xPBS gewaschen und in 3 ml 1xPBS, das Proteaseinhibitoren enthielt, resuspendiert. Die Gewinnung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels eines mechanischen Aufschlussverfahrens an einer French Press Anlage. Die Bakteriensuspension wird dabei unter einem sehr hohen Druck (20000 PSI) durch ein kleines Auslassventil geleitet, nach dem es zu einer plötzlichen Entspannung und damit zum Auftreten starker Scherkräfte kommt. Die entstehenden Scherkräfte bringen die Zellen zum Platzen, wodurch die zytoplasmatischen Proteine freigesetzt werden. Die so freigesetzten, löslichen Proteine wurden anschließend mittels Zentrifugation für 2 h bei 17,000 x g und 4°C von den übrigen Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen (Pellet) getrennt, durch 0,25 µm Filter filtriert und entweder bei -80°C aufbewahrt oder direkt mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

### **2.2.13 Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

Die GST-Fusionsproteine wurden mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von GSTrap™ FF Säulen an einer ÄKTA-Purifier-Durchflußchromatographie Anlage (GE Healthcare) aus dem *E.coli* Zelllysat aufgereinigt. Die Bindung der GST-Proteine an die Säulenmatrix erfolgte durch ÜN-Rezirkulation von dem *E.coli* Zelllysat bei 4°C und einer Flussrate von 0,5 ml/min an einer peristaltischen Pumpe. Anschließend wurde die beladene Säule an die ÄKTA-Purifier Anlage angeschlossen und mit PBS, das zusätzlich 0,2 M NaCl enthielt, bei einer Flussrate von 1-2 ml/min gewaschen. Nach dem Entfernen von ungebundenen Proteinen wurden die über GST gebundenen Proteine mit 10 mM reduziertem Glutathion, das in PBS, pH 8 gelöst war, eluiert. Die Eluate wurden anschließend mittels einer Entsalzungssäule (HiPrep™ 26/10, GE Healthcare) in PBS überführt und in einer Zentrifugeneinheit (Centricon Plus-70, Millipore) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa einkonzentriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die aufgereinigten Proteine mittels SDS-PAGE und Immunfärbung analysiert.

#### **2.2.14 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern aus IVIG**

Zur Affinitätsreinigung von Antikörpern wurden 3-8 mg der rekombinant exprimierten, affinitätsgereinigten Antigene gemäß den Herstellerangaben kovalent an NHS-aktivierte Sepharose Säule (GE Healthcare) gekoppelt.

Zur Gewinnung von spezifischen Antikörpern wurde das zuvor in PBS umgepufferte IVIG ÜN über die mit dem Antigen beladene Säule an einer peristaltischen Pumpe rezirkuliert. Eine niedrige Flussrate von 0,5 ml/min ermöglichte die Bindung von spezifischen Antikörpern an das korrespondierende Antigen unter Ausbildung stabiler Antigen-Antikörper-Komplexe, während unspezifische Antikörper die Säule passierten, ohne an die Matrix zu binden. Anschließend wurde die Säule an einer ÄKTA-Purifier-Durchflusschromatographie Anlage gewaschen und die spezifischen Antikörper mit 0,1 M Glycin-HCL (pH 2,7) eluiert. Durch das Vorlegen von 1 M Tris-HCL, pH 9 in die 1,5 ml Elutionsgefäße wurde der saure pH-Wert der Antikörperlösung schon während des Elutionsvorgangs neutralisiert. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend vereint und mit Hilfe von Zentrifugenfiltereinheiten (Centricon Plus-70, 30kDa MWCO, Millipore) in PBS umgepuffert und einkonzentriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die aufgereinigten Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität mittels SDS-PAGE und Immunodetektion analysiert.

#### **2.2.15 Isolierung von humanen Neutrophilen**

Die Neutrophilen wurden mittels einer Dextran-Sedimentation, gefolgt von Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque, aus heparinisierem Blut von gesunden Freiwilligen gewonnen. Dazu wurde 50 ml heparinisieretes Blut 1:1 mit 3 %igem Dextran T-500 versetzt und für 20 min stehen gelassen bis sich eine Leukozyten reiche, Erythrozyten arme Plasma Schicht über den sedimentierten Erythrozyten bildete. Diese wurde in ein neues Gefäß übertragen und 10 min bei 250 x g und 5°C zentrifugiert. Das Zellpellet, das immer noch viele Erythrozyten, Lymphozyten und Monozyten enthielt, wurde in 40 ml 0.9 %igem NaCl resuspendiert, mit 10 ml Ficoll-Lösung unterschichtet und 40 min bei 400 x g und 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand, der sowohl Lymphozyten als auch Monozyten enthielt, wurde verworfen, während das Pellet, welches die

Neutrophilen enthielt, einer hypotonischen Lyse unterzogen wurde. Hierdurch sollten die restlichen Erythrozyten eliminiert werden. Das Pellet wurde in 20 ml eisgekühltem 0.2 %igem NaCl resuspendiert und 30 s inkubiert. Anschließend wurden 20 ml von einer 1.6 %igen NaCl-Lösung hinzugefügt, um die isotoni-sche Umgebung wiederherzustellen. Nach Zentrifugation für 6 min bei 250 x g und 5°C wurde der Schritt noch zwei Mal wiederholt, bis keine Erythrozyten mehr sichtbar waren. Im Anschluss an die hypotonische Lyse wurden die Neutrophilen in 1 ml PBS aufgenommen und ihre Zellzahl durch Färbung mit Trypan-Blau in einer Neubauer-Zählkammer (LO-Laboroptik, VWR) bestimmt.

#### **2.2.16 IgG-vermittelte Phagozytoseaktivität von humanen Neutrophilen**

Die Untersuchung der opsonischen Wirkung von IVIG bzw. der affinitätsaufge-reinigten, *S. aureus*-spezifischen Antikörper erfolgte durch Messung der IgG-vermittelten Phagozytoseaktivität von humanen Neutrophilen mittels Durch-flusszytometrie (FACS). Die quantitative Auswertung der Phagozytoseaktivität basierte auf der Detektion von grün fluoreszierenden Neutrophilen. Die Fluores-zenz der Zellen wurde dabei durch ihre Fähigkeit vermittelt, GFP-exprimierenden *S. aureus* ATCC 29213 zu phagozytieren.

Für die Untersuchung der Phagozytose wurde der GFP-exprimierende *S. aureus*-Stamm wie folgt kultiviert: 25 ml LB-Medium, das mit Chlorampheni-col (20 µg/ml) versetzt war, wurde mit 250 µl einer ÜN-Kultur angeimpft und die Bakterien bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bei 37°C kultiviert. Mittels Zentrifugation bei 17000 x g, 4°C und 20 min wurden die Bakterien geerntet, das Bakterienpellet in PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS aufge-nommen. Nach erneuter Messung der OD<sub>600</sub> wurde der Bakterienansatz auf ei-ne OD<sub>600</sub> von 3 eingestellt. Diese definierte OD entspricht einer *S. aureus*-Ausgangskonzentration von 10<sup>9</sup> CFU/ml.

IVIG bzw. die affinitätsaufgereinigten Antikörper wurden in einer Konzentration von 500 µg/ml eingesetzt. Diese Konzentration entspricht in etwa dem Durch-schnittsgehalt von IgGs, die sich in 2,5 % des humanen Serums befinden. (durchschnittlicher IgG-Gehalt im humanem Serum: 12-18 mg/ml).

Um die Opsonophagozytose zu initiieren, wurden IgGs mit 2,5x10<sup>6</sup> frischen humanen Neutrophilen (Kap. 2.2.15) und dem GFP-exprimierendem *S. aureus*

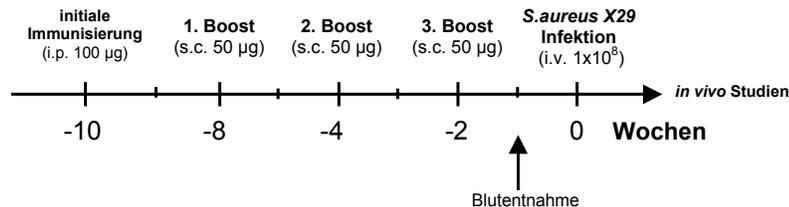
in einer Multiplizität der Infektion von 10 (MOI 10 = 10:1/Bakterien:PMNs) auf Eis in einem 1,5 ml Kryoröhrchen zusammenpipettiert. Die Gesamtdauer der Phagozytose wurde auf insgesamt 3 min festgelegt. Dazu wurden die 1 ml Phagozytoseansätze zuerst bei 37°C 60 s langsam über Kopf auf einem Test-Tube-Rotator (Snijders) rotiert, 60 s bei 400 x g und 37°C zentrifugiert und schließlich für weitere 60 s stehen gelassen. Die phagozytische Aktivität wurde gestoppt, indem die Kryoröhrchen auf Eis gestellt wurden. Zur Elimination von überschüssigen, extrazellulären Bakterien wurden die Pellets drei Mal 5 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Dabei wurden die Überstände jeweils verworfen und die Zellpellets in neues PBS aufgenommen. Direkt im Anschluss an den letzten Zentrifugationsschritt wurde die erste Messprobe (t3) entnommen. Diese wurde in einer Verdünnung von 1:5 in 0,5 % BSA/PBS Puffer mit Hilfe des FACSCalibur immunocytometry Systems und der CELLQuestPro Software (BD Biosciences) analysiert. Mittels der Zwei-Parameter-Durchflusszytometrie wurde neben der GFP-vermittelten Fluoreszenz, gleichzeitig die Propidiumiodid (PI)-vermittelte Fluoreszenz von toten Zellen detektiert. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Messung mit 5 µg/ml PI angefärbt.

Zur Untersuchung der opsonischen und bakteriziden Wirkung von antigenspezifischen Antikörpern (Kap. 3.5.) wurde neben der t3-Messprobe eine zweite Messprobe zu einem späteren Zeitpunkt entnommen. In diesem Fall wurden die Hauptansätze nach der differentiellen Zentrifugation für weitere 30 min bei 37°C auf dem Test-Tube-Rotator inkubiert. Nach der Entnahme der Messprobe t33 wurden dann beide Proben (t3 und t33) gleichzeitig im FACS äquivalent zu der oben beschriebenen Methodik analysiert.

### **2.2.17 Immunisierung von Mäusen**

Für die Immunisierung von 6-8 Wochen alten, weiblichen C57/Bl6 Mäusen wurde eine Emulsion aus Freund's Adjuvans und der Antigenlösung mit rekombinantem Protein in einem Verhältnis von 1:1 hergestellt. Zur initialen Immunisierung wurde den Mäusen eine Emulsion von 100µg Protein in PBS und Freund's komplettem Adjuvans (CFA) in einem Gesamtvolumen von 200 µl interperitoneal (i.p.) verabreicht. Im Abstand von jeweils 2 Wochen folgten drei Sekundärimmunisierungen (Boost) mit Emulsion aus 50µg Protein und Freund's in-

komplettem Adjuvans (IFA). Die Applikation der Boosteremulsionen erfolgte subkutan (s.c.) in den Nacken der Maus. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen, um den Antikörpertiter im Serum zu bestimmen. Der Immunisierungsablauf ist in Abb.1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1** Schema zum Ablauf der Immunisierung von Mäusen.

### 2.2.18 Serumgewinnung aus Mäusen

Blut aus Mäusen wurde durch retro-orbitales Bluten unter Anästhesie (Diethylether) gewonnen. Das Blut wurde 1h bei RT inkubiert, um eine vollständige Gerinnung zu gewährleisten. Anschließend wurde der Blutkuchen für 20 min bei 600 x g abzentrifugiert und der Überstand (Serum) abgenommen. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Serum bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.19 Bestimmung der Antikörpertiter mittels ELISA

Die quantitative Bestimmung des Antikörpertiters im Serum von immunisierten Mäusen erfolgte mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Eine 96-well Maxisorp-Platte wurde ÜN bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 100 µl/well PBS Puffer, in dem 0,5 µg/ml des Antigens gelöst waren, vorbeschichtet. Nach Waschen in PBST wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in Blocklösung (300 µl/well; StartingBlock T20 (PBS), Pierce) für 20 min bei RT abgesättigt. Vor der Zugabe des Serums wurde die Platte erneut mit PBST gewaschen. Das Serum wurde in Triplikaten seriell in 10er Schritten von  $1:10^2$  bis  $1:10^7$  verdünnt und in einem Gesamtvolumen von 100 µl/well in die vorbeschichtete Platte übertragen. Nach Inkubation für 2 h bei RT und dem darauf folgenden Waschschritt erfolgte der Antikörpernachweis durch Zugabe eines Peroxidase-

konjugierten Ziege-anti-Maus Antikörpers, der in einer Verdünnung von 1:4000 und 100 µl/well eingesetzt wurde. Zur Bindung des Sekundärantikörpers wurden die Platten weitere 2 h bei RT inkubiert und anschließend mit PBST gewaschen, bevor die gebundene Enzymaktivität mit 100 µl TMB-Substrat pro well (BD Biosciences) detektiert wurde. Die resultierende Absorption wurde nach dem Abstoppen der Farbreaktion mit 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl/well) bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

### **2.2.20 Murines Sepsismodell**

Die immunisierten Mäuse wurden intravenös (i.v.) entweder mit dem biolumineszenten *S. aureus* Xen29 (1x10<sup>8</sup> CFU/ml) oder mit wt *S. aureus* ATCC 29213 (3x10<sup>7</sup> CFU/ml) infiziert. Die Bakterien wurden analog zu der in Kap. 2.2.16 beschriebenen Kultivierung von GFP-exprimierenden *S. aureus* gezüchtet und auf eine Ausgangskonzentration von 10<sup>9</sup> CFU/ml eingestellt. Nach weiteren Verdünnungsschritten in PBS wurden 300 µl der entsprechenden Bakterienkonzentration in die laterale Schwanzvene der Mäuse injiziert. Bei allen Infektionsversuchen wurde die Bakterienkonzentration der applizierten Verdünnung durch Ausplattieren auf MH-Agarplatten mittels Spiralplater (Eddy Jet, IUL) und Auszählung der CFUs mittels Koloniezähler (Coutermat FLASH, IUL) kontrolliert.

### **2.2.21 *in vivo* Visualisierung (IVIS)**

Die *in vivo* Visualisierung mittels des IVIS imaging Systems (Xenogen Corp.) ermöglicht sowohl die bildliche Darstellung als auch eine quantitative Analyse des Verlaufs einer Infektion in einem individuellen Labortier. Die *in vivo* Visualisierung basiert auf der Detektion von Licht, das von vitalen Zellen oder Gewebe emittiert wird. Für die hier genutzte Applikation wurde Biolumineszenz als Signalquelle verwendet, welche von dem biolumineszierenden *S. aureus*-Stamm Xen 29 (Xenogen Corp.) erzeugt wurde. Dieser spezielle Bakterienstamm ist in der Lage sowohl das Luziferase-Enzym, als auch dessen Substrat konstitutiv zu exprimieren. In der Detektionskammer, in der max. 5 Versuchstiere gleichzeitig analysiert werden können, wird das emittierte Licht durch eine sensitive, signalverstärkende *cooled charge-coupled device* (CCD) Kamera er-

fasst. Die Signalstärke der Biolumineszenz wird dabei als die Anzahl von Photonen, die in einer Sekunde pro  $\text{cm}^2$  emittiert werden, berechnet.

Da das schwarze Fell und eine Pigmentierung der BL6 Mäuse die Emission des Lichts erheblich beeinträchtigt, wurden die immunisierten Mäuse einen Tag vor der Infektion mit *S. aureus* durch eine i.p. Applikation von 200 $\mu\text{l}$  eines Ketavet-Rompun-Narkotikum anästhesiert und das Fell auf der Bauchseite (der Kamera zugewandten Seite) rasiert. Anschließend wurden Mäuse mit einer ausgeprägten Pigmentierung aussortiert. Die erste *in vivo* Messung der Bauchseite der Tiere erfolgte 24 h nach der Infektion mit *S. aureus* und wurde an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Die Mäuse befanden sich dabei im anästhesierten Zustand, der durch eine konstante Zufuhr einer 1,5 % Mischung aus Isofluran und Sauerstoff während der gesamten Messzeit (5 min pro Aufnahme) aufrechterhalten wurde. Die Stärke der Biolumineszenz wurde durch die Berechnung der Gesamtzahl der Photonen/s/ $\text{cm}^2$  ermittelt. Die quantitative Datenanalyse erfolgte anschließend mit Hilfe der LivingImage Software (Xenogen Corp.).

### **2.2.22 Bestimmung der Bakteriendichte in Organen**

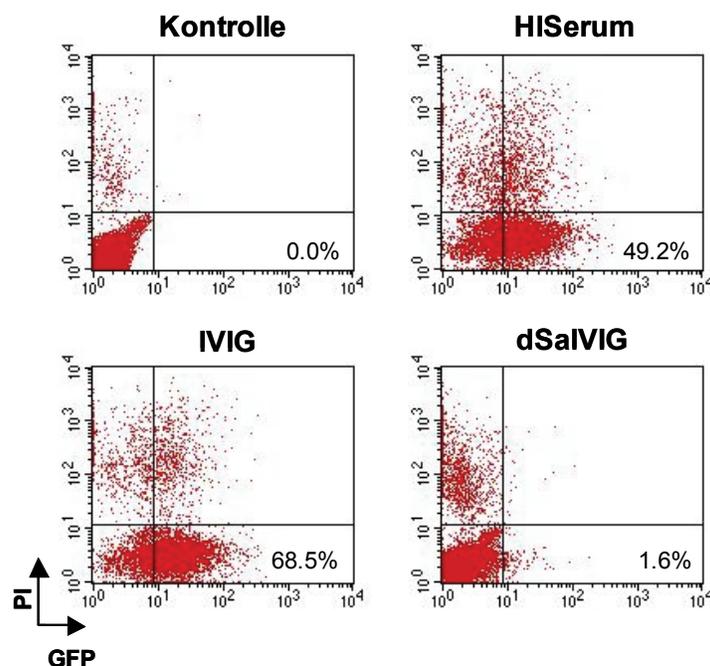
Die Bestimmung der Bakteriendichte in den Organen wurde direkt im Anschluss an die letzte IVIS Aufnahme (Tag 3 nach Infektion) vorgenommen. Milz, Nieren, Leber, Lunge und Herz wurden mit sterilem Besteck entnommen und auf einer Feinwaage gewogen. Jedes Organ wurde in 2 ml PBS und 0,05% Triton X100 unter Zugabe von zuvor sterilisiertem Seesand (Siliciumdioxid, Sigma) homogenisiert und das Homogenat in 15 ml Falcons überführt. Nach Zentrifugation für 5 min, bei 150 x g und 4°C wurde der Überstand seriell verdünnt und auf MH-Agarplatten mit Hilfe des Spiralplaters (IUL) ausplattiert. Die Bestimmung der CFU-Zahl erfolgte mittels des Koloniezählers (IUL).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung von IVIG auf opsonisierende Antikörper gegen *S. aureus*

Intravenöse Immunglobulin G Präparationen (IVIG) zeichnen sich durch eine große Vielfalt von Antikörpern gegen unterschiedliche Pathogene aus und stellen damit eine geeignete Antikörperquelle zur Identifizierung von immunreaktiven, bakteriellen Zielstrukturen mittels Proteomanalyse dar. Da sich die für kommerzielle Zwecke hergestellten IVIGs durch eine große Antikörpervarianz auszeichnen, wurde die in dieser Arbeit verwendete IVIG Präparation (Octagam®, Octapharma) zunächst daraufhin untersucht, ob sie opsonisierende Antikörper gegen *S. aureus* enthält. Die opsonisierende Wirkung von IVIG wurde mittels einer Opsonophagozytose-Untersuchung analysiert. Dazu wurden frisch isolierte humane Neutrophile und der GFP-exprimierende *S. aureus*-Stamm ATCC 29213 (MOI 10) in der Gegenwart von IVIG bzw. IVIG, aus dem *S. aureus*-spezifische Antikörper durch vorhergegangene Adsorption mit dem Bakterium depletiert wurden (dSaIVIG) oder hitzeinaktiviertem Serum (HISerum) bei 37°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Phagozytosereaktion extrazellulären Bakterien durch differentielles Zentrifugieren eliminiert und die Zellzahl von GFP-positiven Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Unter Anwendung der Zwei-Parameter-FACS-Analyse wurden gleichzeitig PI-angefärbte d.h. tote Zellen detektiert.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Abb. 2 anhand von Punktdiagrammen (Dot-Plots) dargestellt. Während in der IVIG vermittelten Phagozytose 68,5% der Neutrophile als GFP-positiv gemessen wurden, entsprach die durch HISerum induzierte Phagozytoseaktivität einer Rate von 49,2% GFP-positiven Zellen. In Gegenwart von dSaIVIG waren dagegen nahezu keine grün fluoreszierenden Neutrophile detektierbar (1,4%).



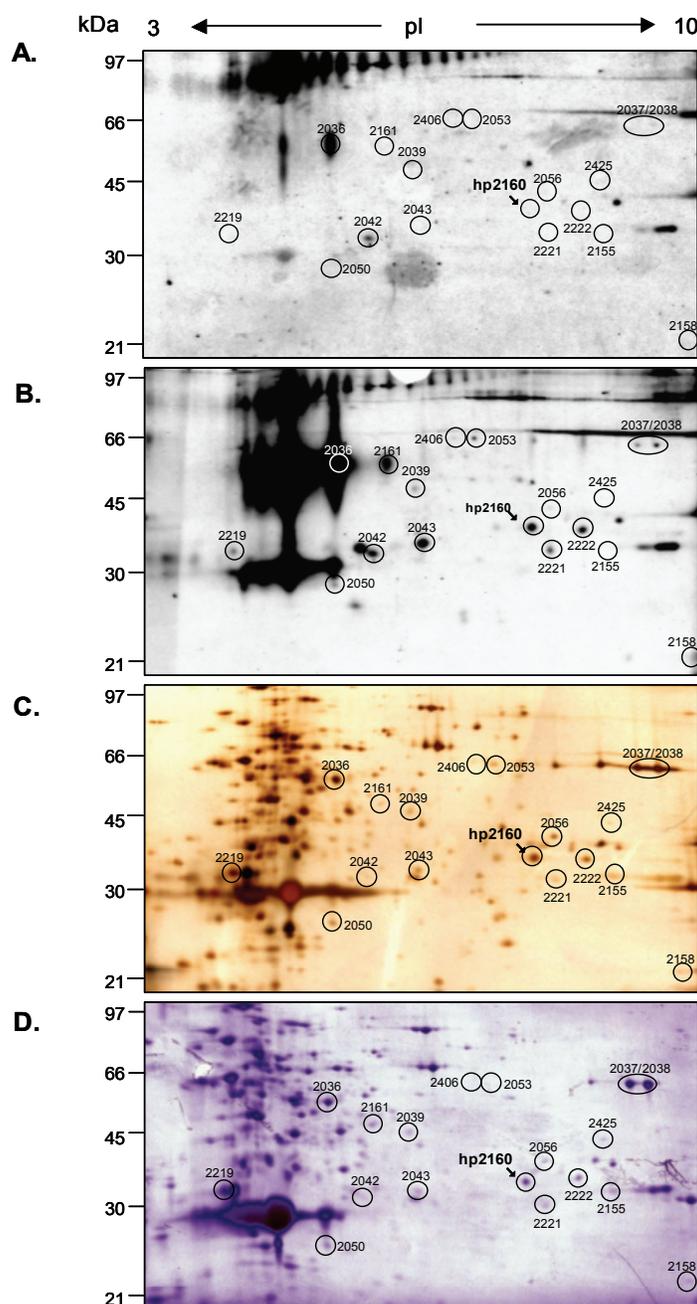
**Abb. 2** *In vitro* Opsonophagozytose von GFP-exprimierenden *S. aureus* durch humane Neutrophile. Dreifachansätze aus  $2.5 \times 10^6$  humanen Neutrophilen, *S. aureus* (MOI 10) und IVIG bzw. dSaIVIG (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder hitzeinaktiviertem Serum (HISerum, 2.5%) wurden 3 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und im Anschluss an die differentielle Zentrifugation im FACS analysiert. Mittels der Zwei-Parameter-Durchflusszytometrie wurde der GFP- und der Propidiumiodid (PI)-positive Anteil an Neutrophilen bestimmt. Der prozentuelle Anteil an GFP-positiven Neutrophilen repräsentiert Zellen mit phagozytierten Bakterien. Als Kontrolle wurde die Phagozytose von Zellen in Gegenwart von Bakterien ohne IgG-Zusatz gemessen.

Der Anteil an PI-positiven Zellen war mit 2-3 % in allen drei Ansätzen (HISerum, IVIG bzw. dSaIVIG) ähnlich niedrig.

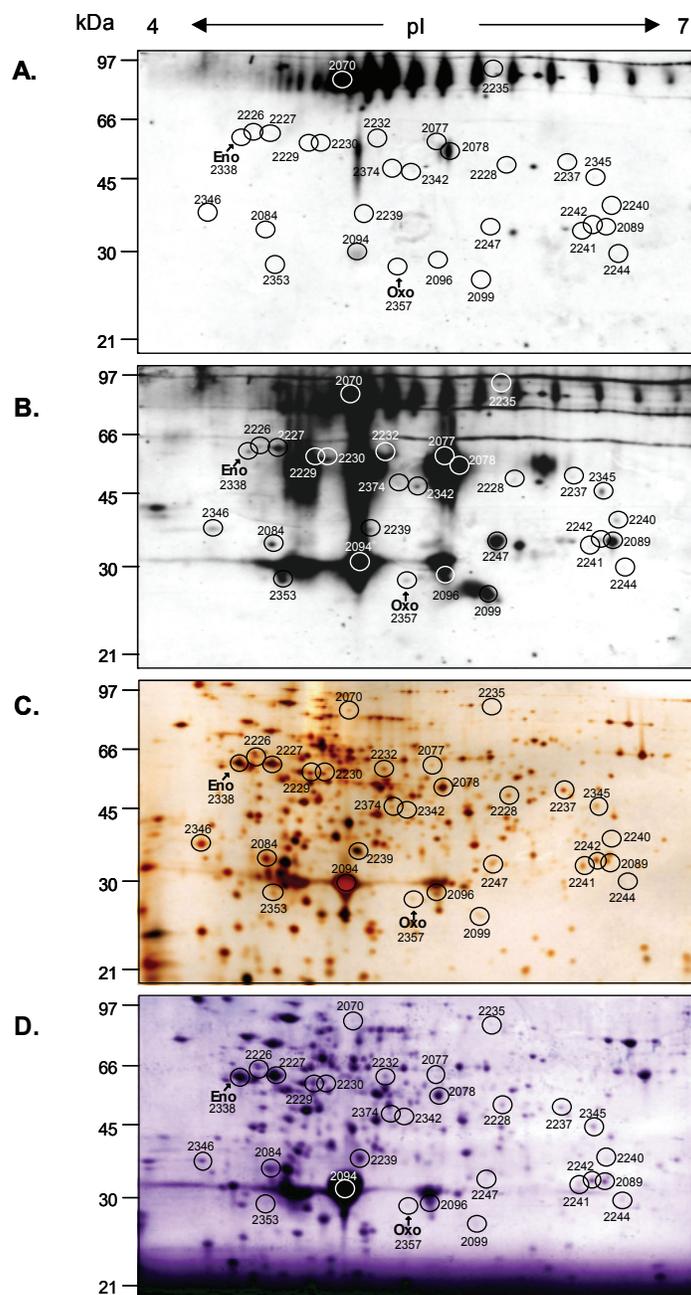
Die beachtliche Opsonophagozytoseaktivität in Gegenwart von IVIG, dafür aber eine kaum messbare in Gegenwart von dSaIVIG, ließ eindeutig darauf schließen, dass *S. aureus*-spezifische, opsonisierende Antikörper in IVIG vorhanden sind. Diese Antikörper sind durch Bindung an spezifische Oberflächenstrukturen von *S. aureus* eindeutig in der Lage, eine Komplement-unabhängige Phagozytose von Staphylokokken durch humane Neutrophile zu induzieren. Die Identifizierung der durch die opsonisierenden IgGs gebundenen antigenen Zielstrukturen sollte das Ziel der weiteren Forschungsarbeit sein.

### 3.2 Identifizierung immunogener, zellwandassoziierter Proteine von *S. aureus* mittels Proteomanalyse

Zur Identifizierung von Oberflächenstrukturen, welche von den IVIG Antikörpern spezifisch erkannt und gebunden werden, wurden zellwandassoziierte Proteine mit LiCL aus dem *S. aureus*-Stamm ATCC 29213 extrahiert (Kap. 2.2.1) und in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kap. 2.2.5) aufgetrennt. Um eine hohe Auflösung der Auftrennung zu erzielen, wurden die Proteine zunächst in einem breiten pH-Bereich von 3-10 (Abb. 3) und anschließend in einem engeren pH-Bereich von 4-7 (Abb. 4) aufgetrennt. Für jeden der beiden pH-Bereiche wurden die Proteine hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Daten in mehreren, voneinander unabhängigen Läufen jeweils in einer Serie von drei gleichzeitig laufenden Gelen aufgetrennt. Zur Detektion von immunreaktiven Proteinen wurde eines der drei Gele, wie in Kap. 2.2.8 beschrieben, geblottet und immungefärbt. Die zwei anderen Gele wurden zu analytischen Zwecken mit Coomassie bzw. Silber gefärbt. Für die gezielte Identifizierung von Proteinen, die von den in IVIG vorhandenen, opsonisierenden IgGs erkannt und gebunden werden, wurde ein neues auf Proteomanalyse basierendes Identifizierungsverfahren etabliert, das nach dem Prinzip der Kandidatenauswahl SUPRA (**S**ubtraktive **P**roteom**a**nalyse) benannt wurde. Dabei wurde die Auswahl der Proteinkandidaten auf die Proteine beschränkt, die mit IVIG, nicht aber mit dSalVIG immunreagierten. Proteine, die von IgGs erkannt wurden, die sowohl in IVIG als auch in dSalVIG vorhanden sind, wurden aufgrund niedriger Antigenspezifität bzw. Affinität von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Um die IVIG bzw. dSalVIG Immunsignale miteinander vergleichen zu können, erfolgte die subtraktive Immunoblotanalyse unter Verwendung derselben Membran, die zuerst mit dSalVIG und anschließend mit IVIG gefärbt wurde. Des Weiteren wurden beide Blots unter exakt den gleichen Bedingungen, unter Verwendung gleicher Antikörperkonzentration gefärbt und entwickelt. Zusätzlich wurde ein Abgleich der Immunfärbung anhand von Signalen vorgenommen, die von einer charakteristischen, in jedem der Blots vorkommenden Proteinkette (66-97 kDa) stammen.



**Abb. 3** Subtraktive Proteomanalyse (SUPRA) von *S. aureus* zellwandassoziierten Proteinen in einem pH-Bereich von 3-10 unter Verwendung von IVIG und dSaIVIG (*S. aureus*-depletiertes IVIG). Zellwandassoziierte Proteine des *S. aureus*-Stammes ATCC 29213 wurden in der 2D-Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und entweder geblottet (**A,B**) oder mit Silber (**C**) bzw. mit Coomassie (**D**) gefärbt. Die Gele wurden mit 100  $\mu$ g Protein für die Immun- und Silberfärbung und mit 500  $\mu$ g Protein für die Coomassie-Färbung beladen. Durch Immunfärbung mit dSaIVIG (**A**) bzw. IVIG (**B**) differenziell detektierte Proteinspots wurden Proteinen auf den Silber- und Coomassie-Gelen zugeordnet, aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF und anschließender Datenbanksuche identifiziert (runde Umrahmung). Erfolgreich identifizierte Proteinspots sind in Tabelle 1 aufgelistet.



**Abb. 4** Subtraktive Proteomanalyse (SUPRA) von *S. aureus* zellwandassoziierten Proteinen in einem pH-Bereich von 4-7 unter Verwendung von IVIG und dSalIVIG (*S. aureus*-depletiertes IVIG). Zellwandassoziierte Proteine des *S. aureus*-Stammes ATCC 29213 wurden in der 2D-Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und entweder geblottet (**A,B**) oder mit Silber (**C**) bzw. mit Coomassie (**D**) gefärbt. Die Gele wurden mit 100 µg Protein für die Immun- und Silberfärbung und mit 500 µg Protein für die Coomassie-Färbung beladen. Durch Immunfärbung mit dSalIVIG (**A**) bzw. IVIG (**B**) differenziell detektierte Proteinspots wurden Proteinen auf den Silber- und Coomassie-Gelen zugeordnet, aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF und anschließender Datenbanksuche identifiziert (runde Umrahmung). Erfolgreich identifizierte Proteinspots sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Wie exemplarisch in den Abbildungen 3 A, B und 4 A, B dargestellt, resultierte die Anfärbung der Blots mit dSaIVIG und IVIG in der Detektion von sehr unterschiedlichen Antigen-Erkennungsmustern. Während die Depletion von *S. aureus*-spezifischen Antikörpern die Detektion einer nur sehr begrenzten Anzahl von Proteinspots zur Folge hatte (Abb. 3 A u. 4 A.), war die Anzahl der mit IVIG angefärbten Spots um ein Vielfaches höher (Abb. 3 B u. 4 B). Die Antikörperfärbungen variierten in der Detektion von Proteinen mit unterschiedlich stark ausgeprägten Signalintensitäten. Während sich einige der Spots durch ein außerordentlich starkes immunogenes Signal auszeichneten, wie z. B. die Proteinkette zwischen 45 und 66 kDa bzw. 30 kDa, ergaben andere Proteine ein sehr schwaches Detektionssignal. Alle differenziell detektierten Proteine, d.h. Proteine die mit IVIG reagierten, nicht aber mit dSaIVIG, galten unabhängig von der Signalstärke, mit der sie detektiert wurden, als Zielproteine, die anschließend den Proteinspots auf den silber- (Abb. 3 C u. 4 C) bzw. Coomassie-gefärbten (Abb. 3 D u. 4 D) Gelen zugeordnet wurden. Während das Coomassie-Gel das präparative Gel darstellte, aus dem nach der abgeschlossenen Zuordnung die Zielproteine ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF sequenziert (Kap. 2.2.9) wurden, diente das silbergefärbte Gel letztlich als zusätzliche Zuordnungshilfe. Trotz allem konnten nicht alle Immunoblotsignale den Proteinen auf dem Coomassie-Gel zugeordnet werden (z.B. das zwischen 45 und 65 kDa detektierte Proteinsignal).

Die auf die MALDI-TOF Analyse folgende Datenbanksuche erfolgte unter Nutzung einer Datenbank, die ausschließlich Sequenzen der bis dato vollständig durchsequenzierten *S. aureus*-Genome enthielt, und führte zur Identifizierung von 39 staphylokokkalen Proteinen. Diese sind in Tabelle 1 aufgelistet. Da alle Proteine in den mittlerweile sieben durchsequenzierten *S. aureus*-Stämmen aufzufinden waren, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei den mittels SUPRA identifizierten Proteinen um universell vorkommende *S. aureus*-Proteine handelt.

**Tab. 1** Liste der differentiell detektierten, mittels MALDI-TOF identifizierten, immunogenen *S. aureus*-Proteine

	Genbank Accession Nr.	Spot ID	Putative Identifikation	pI <sup>a)</sup>	MW <sup>b)</sup> (kDa)	MASCOT <sup>c)</sup> Total score	Sequenzab- deckung <sup>d)</sup> (%)
1	gij15927930	2160	hypothetical protein, similar to esterase	7.2	35.6	92	28
2	gij15926453	2338	enolase	4.6	47.1	206	47
3	gij15926814	2357	3-oxoacyl- (acyl-carrier protein) reductase	5.6	26.2	103	35
4	gij15926530	2036/2078	hypothetical protein, similar to NADH dehydrogenase	5.4	44.4	79	29
5	gij15926396	2037/2038	hypothetical protein, similar to anion-binding protein	9.0	74.4	248	38
6	gij2239274	2039/2345	peptidoglycan hydrolase	6.1	35.2	63	22
7	gij15926560	2042	conserved hypothetical protein	5.6	31.8	121	48
8	gij15928148	2043/2050/2096	immunodominant antigen A	6.1	24.2	80	23
9	gij14247692	2053	aldehyde dehydrogenase	6.6	51.9	56	15
10	gij21205110	2056	truncated beta-hemolysin	8.8	37.5	105	42
11	gij15927879	2155	secretory antigen precursor SsaA homolog	9.0	29.4	112	40
12	gij15927798	2158	50S ribosomal protein L13	9.3	16.3	228	66
13	gij15926780	2161	conserved hypothetical protein	5.7	34.6	186	45
14	gij15926226	2219/2227	translational elongation factor TU	4.7	43.1	98	33
15	gij15924043	2221	autolysin	9.7	102.6	77	11
16	gij21205078	2222	hypothetical protein	5.8	65.5	63	13
17	gij14247604	2406	protoporphyrinogen oxidase hypothetical protein, similar to synergohymenotropic toxin precursor	6.3	52.2	126	23
18	gij15927580	2425	glutamyl-t-RNAGln amidotransferase subunit A	8.6	38.7	78	14
19	gij6578924	2070	aminotransferase NifS homologue	5.0	52.3	143	36
20	gij15926504	2077	aminotransferase NifS homologue	5.3	46.4	346	60
21	gij15926226	2084	translational elongation factor TU	4.4	29.6	153	29
22	gij15923845	2089	hypothetical protein	5.7	29.4	113	38
23	gij15928148	2094/2099	immunodominant antigen A	5.9	24.2	84	23
24	gij15927677	2226	ATP synthase beta chain	4.7	51.4	317	55
25	gij21204821	2228	alanine dehydrogenase	5.6	40.1	268	55
26	gij15925843	2229/2230	phosphopentomutase	5.0	43.8	229	60
27	gij15926547	2232	NAD-specific glutamate dehydrogenase	5.2	45.9	255	50
28	gij15928230	2235	hypothetical protein, similar to autolysin precursor	6.0	69.2	72	16
29	gij14247509	2237	chorismate mutase homolog	5.8	40.7	112	34
30	gij15927670	2239	hypothetical protein, similar to SceD precursor	5.5	24.1	70	34
31	gij15923892	2240	hypothetical protein	6.5	37.1	89	19
32	gij15926841	2241	uridylate kinase	6.0	26.3	88	26
33	gij15926838	2242	transcription pleiotropic repressor codY	5.9	28.7	178	49
34	gij14247601	2244	enterotoxin SEM	6.5	27.5	68	28
35	gij15926324	2247	ferrichrome transport ATP-binding protein	5.6	29.7	99	28
36	gij15928275	2342	conserved hypothetical protein	5.3	37.5	188	33
37	gij15926178	2346	50S ribosomal protein L25	4.4	23.8	104	34
38	gij15926451	2353	triosephosphate isomerase	4.8	27.4	66	32
39	gij13701328	2374	Xaa-Pro dipeptidase	5.2	39.6	241	36

a) Theoretisch bzw. experimentell ermittelter Wert für das Molekulargewicht (kDa);

b) Theoretisch bzw. experimentell ermittelter Wert für den isoelektrischen Punkt (pI);

c) Maß für die Übereinstimmung zwischen experimentellen und theoretischen Peptidmassen;

d) Sequenzabdeckung im Verhältnis zu der Gesamtanzahl der Aminosäuren (%);

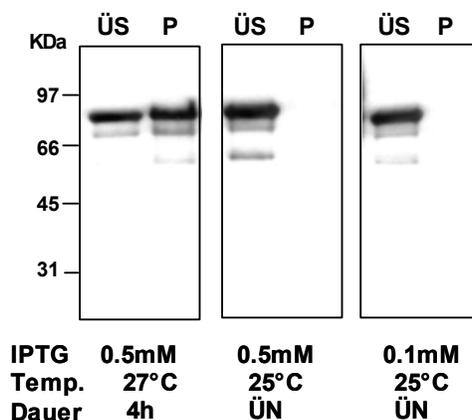
Neben vielen hypothetischen Proteinen, deren Funktion noch unbekannt ist, wurden bekannte Virulenzfaktoren sowie Komponenten der bakteriellen Zellwand identifiziert. Dazu gehören unter anderem Autolysin, Peptidoglykan-Hydrolase oder das immunodominante Antigen A (IsaA). Des Weiteren können der Kandidatenliste eine Reihe von Enzymen entnommen werden, die primär als zytoplasmatisch vorkommende Proteine bekannt sind, wie z. B. das glykolytische Protein Enolase, der Elongationsfaktor Tu (EF Tu) oder die ribosomalen Proteine L13 und L25. Sowohl für Enolase als auch für EF Tu existieren mittlerweile experimentelle Daten, welche die Lokalisation dieser Proteine an der bakteriellen Oberfläche belegen [20, 71].

### **3.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine**

Basierend auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Interaktion wurde mittels SUPRA eine Vielzahl von potentiellen Vakzinekandidaten identifiziert. Inwieweit das SUPRA-Verfahren zur Identifizierung von Proteinen geführt hat, die durch antikörperspezifische Opsonisierung eine protektive, antistaphylokokkale Immunantwort induzieren, sollte im nächsten Schritt untersucht werden.

Die Tauglichkeit von SUPRA, nicht nur immunogene, sondern auch protektive Vakzinekandidaten zu identifizieren, sollte anhand von drei aus der Kandidatenliste exemplarisch ausgesuchten Proteinen, Enolase (Eno), Oxoacyl-Reduktase (Oxo) und hp2160, ein hypothetisches Protein, in *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht werden. Dazu wurden die Gene von Eno (1305 bp), Oxo (741 bp) und hp2160 (921 bp) als GST-Fusionen kloniert (Kap. 2.2.10) und in dem *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert (Kap. 2.2.11/2.2.12). Durch vorangegangene Optimierung der Expressionsbedingungen, die Kultivierungsdauer, Temperatur und die eingesetzte IPTG-Konzentration betreffend, wurden für jedes der rekombinanten Proteine die besten Kultivierungsbedingungen ermittelt, um sie in nativer, löslicher Form zu exprimieren. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse ausgewertet, was Abb. 5 exemplarisch für die rEno-Expression zeigt. Während die Induktion mit 0,5 mM IPTG und einer Kultivierungsdauer von 4 h bei 27° nur partiell zur Expression von rEno in löslicher Form führte, war rEno bei Induktion mit 0,1 M bzw. 0,5 M IPTG und

einer ÜN-Kultivierung bei 27°C vollständig im ÜS und damit in löslicher Form vorzufinden. Unter diesen Bedingungen war außer rEno auch rhp2160 als lösliches Protein gut exprimierbar. Im Gegensatz dazu wurde für rOxo die beste Ausbeute an löslichen Protein mit 0,5 mM IPTG und einer Kultivierungsdauer von 4 h bei 27°C erzielt.

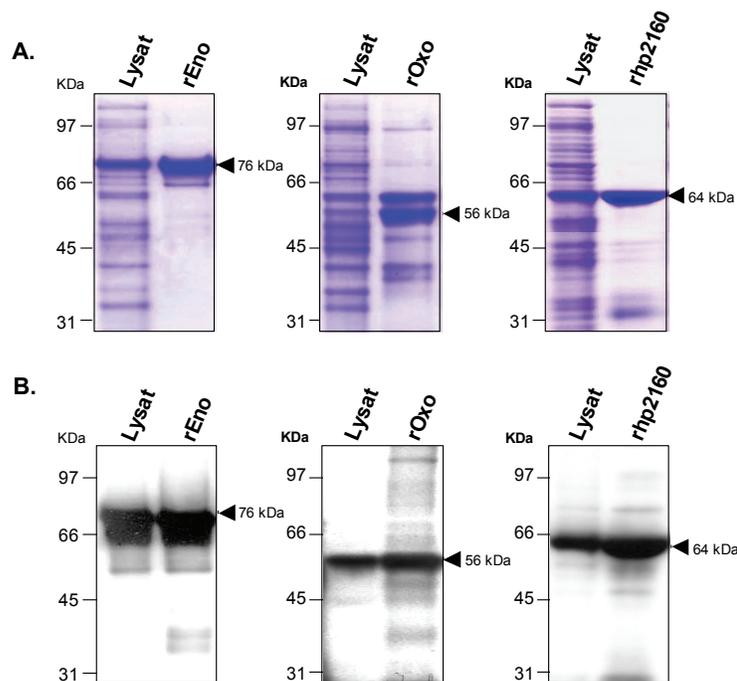


**Abb. 5** Optimierung von Expressionsbedingungen für das rekombinante Protein rEno. Nach Kultivierung unter unterschiedlichen Bedingungen wurden die rEno-*E. coli*-Kulturen mittels French Press aufgeschlossen und nach Zentrifugation Überstand (ÜS, 10 µg) und Pellet (P) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend geblottet und mit anti-GST Antikörper (1:2500) immungefärbt.

Diese anhand von kleinen Testansätzen etablierten Expressionsbedingungen wurden anschließend auf die Proteinexpression im großen Maßstab (3,2 l pro Expression) übertragen. Nach dem mechanischen Zellaufschluss wurden die rekombinanten Proteine aus den Überständen mittels Affinitätschromatographie unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Anschließend an die Proteinbestimmung wurde sowohl das Expressionsergebnis als auch der Reinheitsgrad der rekombinanten Expressionsprodukte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie- und Immunfärbung analysiert.

Die coomassiegefärbten Lysatfraktionen lassen eine Aussage über die Quantität der Expressionsausbeute der rekombinanten Proteine zu. Wie die Spuren, in denen die *E. coli*-Lysate aufgetrennt wurden, in Abb. 6 A zeigen, variiert die Expressionsrate abhängig vom jeweiligen Protein. Während sich in der Lysatspur von rEno und rhp2160 die erwarteten Expressionsbanden von rEno und

rhp2160 deutlich in ihrer Stärke von den anderen *E. coli*-Expressionsprodukten abheben, was auf die erwünschte Überexpression der Zielproteine hindeutet, zeigt die Abwesenheit solch einer dominanten Proteinbande in der rOxo-Lysatspur, dass rOxo mit einer niedrigeren Effizienz exprimiert wird.



**Abb. 6** Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Proteinen, Enolase (rEno), Oxoacyl Reduktase (rOxo) und hp2160 (rhp2160). *E. coli*-Gesamtlysate (10  $\mu$ g) und die daraus affinitätsaufgereinigten rekombinanten Proteine, rEno, rOxo und rhp2160 (2,5  $\mu$ g) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden **(A)** Coomassie-gefärbt oder **(B)** geblottet und mit anti-GST Antikörper (1:2500) immungefärbt.

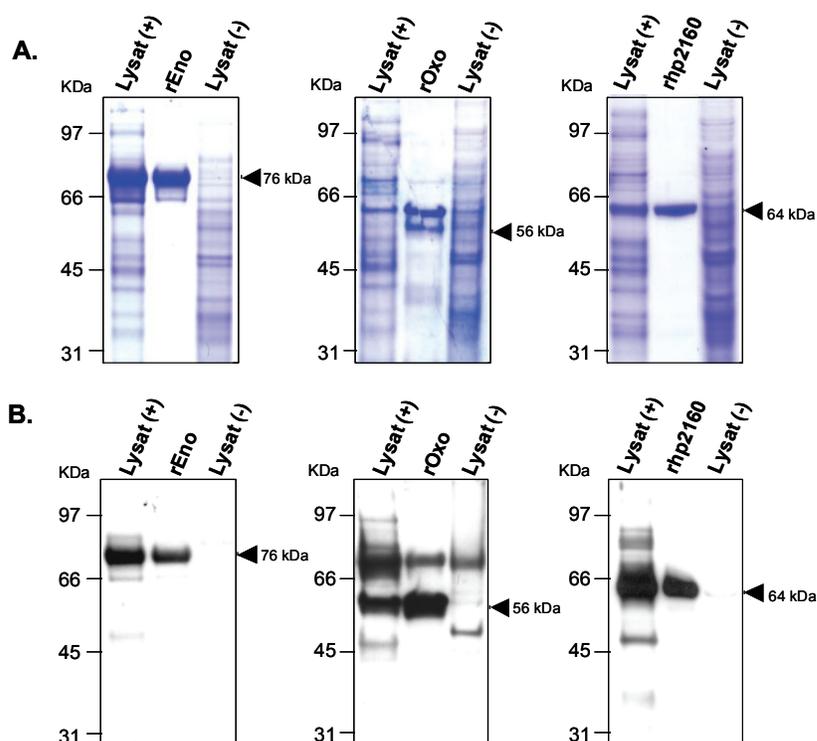
Die zweite Spur in Abb. 6 A zeigt das Ergebnis der Proteinaufreinigung aus dem *E. coli*-Gesamtlysate. Während die starke dominante Bande der rEno- (76 kDa) und rhp2160- (64 kDa) Aufreinigung auf eine gute Aufreinigungseffizienz hinweist, ist dagegen der Reinheitsgrad der rOxo-Fraktion (56 kDa) vergleichsweise niedrig. Neben der rOxo-Proteinbande ist ein weiteres Protein in der aufgereinigten rOxo-Proteinfraktion aufzufinden, das durch eine ca. 60 kDa Bande repräsentiert wird. Anzunehmen ist, dass es sich bei dieser Bande um ein *E.coli*-eigenes Protein handelt, das durch unspezifische Bindung als ein sog. Nebenprodukt mitaufgereinigt und wegen der schlechteren Expressionsausbeute von rOxo in größeren Mengen als bei rEno oder rhp2160 aufkonzentriert

wurde. Diese Vermutung wird durch die Immunfärbung mit einem spezifischen anti-GST Antikörper unterstützt, in der jeweils nur die spezifische Bande für die drei rekombinanten Proteine, rEno, rOxo und rhp2160 angefärbt wird, dagegen nicht das ca. 60 kDa große Nebenprodukt der rOxo-Proteinfraktion (Abb. 6 B).

### **3.4 Absorption und Aufreinigung antigenspezifischer Antikörper aus IVIG**

In *in vitro* Untersuchungen sollten die affinitätsaufgereinigten anti-Eno, anti-Oxo und anti-rhp2160 Antikörper daraufhin untersucht werden, ob sie eine opsonische Aktivität entfalten, die zur spezifischen Opsonophagozytose von *S. aureus* durch humane Neutrophile führt. Die spezifischen Antikörper wurden mittels Affinitätschromatographie aus IVIG (Kap. 2.2.14) aufgereinigt. Dazu wurden die rekombinanten, aufgereinigten Eno-, Oxo- und rhp216 -Proteine an NHS-aktivierte Säulen gekoppelt und die Säulen anschließend mit in PBS umgepufferten IVIG beladen. Die Elution von antigengebundenen Antikörpern erfolgte an einer ÄKTA-Purifier Anlage mittels eines pH-Shifts zu einem sauren pH.

Die Antigenspezifität der aufgereinigten Antikörper wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Immunfärbung nachgewiesen. Für jedes der drei Antigene wurde jeweils das Gesamtlysate von transformierten *E. coli*, das affinitätsaufgereinigte rekombinante Protein und das Gesamtlysate von *E. coli* vor der Transformation elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie gefärbt (Abb. 7 A) oder geblottet und mit den aufgereinigten Antikörperfraktionen immungefärbt (Abb. 7 B). Die Detektion von Signalen in den erwarteten Größenbereichen (76 kDa für rEno, 64 kDa für rhp2160, 55 kDa für rOxo) sowohl in der Spur der Gesamtlysate als auch in der Spur der aufgereinigten Proteinfraktionen weist auf die erfolgreiche Absorption und Elution von den zu den Antigenen korrespondierenden Antikörpern aus IVIG. Im Gegensatz dazu wurde keine Bande, die der Größe der Antigene entspricht, in der für die drei Antigene negativen Spur, in der das Gesamtlysate von *E. coli* vor der Transformation aufgetrennt wurde, detektiert.



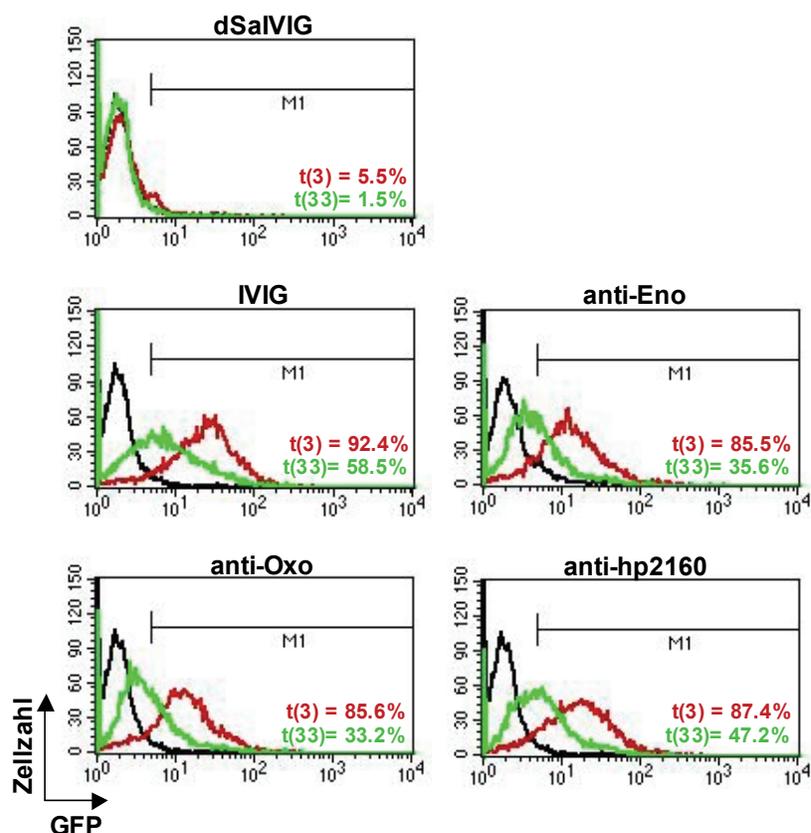
**Abb. 7** Kontrolle der Antigen-spezifität von affinitätsaufgereinigten Antikörpern aus IVIG. 10  $\mu$ g des Gesamtlisates aus *E. coli* nach Transformation (Lysat (+)), die affinitätsaufgereinigten rekombinanten Proteine, rEno, rOxo und rhp2160, (2,5  $\mu$ g) und 10  $\mu$ g des Gesamtlisates aus nicht-transformierten *E. coli* als Negativkontrolle (Lysat (-)) wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden **(A)** Coomassie-gefärbt oder **(B)** geblottet und mit affinitätsaufgereinigten anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160 Antikörpern (1  $\mu$ g/ml) immungefärbt.

Während mit der affinitätsaufgereinigten anti-Eno- und anti-hp2160-Fraktion jeweils die spezifische rEno bzw. rhp2160 detektiert wurde, ist in dem rOxo-Blot eine zusätzliche Bande von vergleichsweise hoher Signalintensität bei ca. 70 kDa in allen drei Spuren zu beobachten. Da diese Bande auch in der Spur der Negativkontrolle detektiert wurde, ist wahrscheinlich, dass es sich dabei um einen Antikörper gegen ein *E.coli*-eigenes Protein handelt, das ebenfalls in IVIG vorhanden ist und damit mitaufgereinigt wurde.

### 3.5 Die opsonisierende Wirkung von anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160

Die affinitätsaufgereinigten Antikörper gegen rEno, rOxo und rhp2160 sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, *S. aureus* effizient zu opsonisieren und damit eine neutrophilenvermittelte Opsonophagozytose einzuleiten, untersucht werden. Die opsonisierende Wirkung der Antikörper wurde daran gemessen, wie effektiv GFP-exprimierende Staphylokokken von humanen Neutrophilen in Gegenwart von den Antikörpern phagozytiert werden. Die quantitative Auswertung der phagozytischen Aktivität von neutrophilen Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Verglichen wurde dabei der prozentuale Anteil an GFP-positiven Neutrophilen direkt nach der Termination der Phagozytose (t3) und 30 min später (t33). Der Anteil an toten Zellen wurde durch Zugabe von Propidiumiodid detektiert. Neben der durch anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160 vermittelten Phagozytose wurde die phagozytische Aktivität in Gegenwart von dSalVIG (*S. aureus*-unspezifische IgGs) und in Gegenwart von IVIG (*S. aureus*-spezifische IgGs) gemessen.

Die phagozytische Aktivität der Neutrophile ist in Abb. 8 in FACS-Histogrammen dargestellt. In Gegenwart von allen drei affinitätsaufgereinigten Antikörpertypen, (anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160) wurde direkt nach der Termination der Phagozytose (t3) eine hohe Phagozytoseaktivität gemessen. Die durch die individuellen Antikörper induzierte Phagozytose entsprach einem Anteil von 85 % bis 89 % an GFP-positiven Neutrophilen und war mit der durch IVIG vermittelten phagozytischen Aktivität von 92,4 % GFP-positiven Zellen vergleichbar. Die Messung der GFP-positiven Neutrophile 30 min nach der Termination der Phagozytose (t33) wies wiederum einen signifikanten Rückgang der bakterienvermittelten Fluoreszenz der Zellen auf, der auf eine Elimination der Bakterien hindeuten könnte. Während der Anteil an GFP-positiven Zellen in Gegenwart von anti-Eno und anti-Oxo auf 33-36 % zurückgegangen ist, wurden in Gegenwart von anti-hp2160 47 % der Neutrophile, in Gegenwart von IVIG immer noch 58,5 % der Zellen als GFP-positiv detektiert.



**Abb. 8** *In vitro* Opsonophagozytose von GFP-exprimierenden *S. aureus* durch humane Neutrophile in Gegenwart von anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160 bzw. dSaIVIG und IVIG. Triplikate aus  $2.5 \times 10^6$  humanen Neutrophilen, *S. aureus* (MOI 10) und den affinitätsaufgereinigten Antikörpern bzw. dSaIVIG und IVIG wurden 3 min bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Termination der Phagozytose wurden überschüssige Bakterien und IgGs durch differentielle Zentrifugation eliminiert. Mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurde der GFP-positive Anteil an Neutrophilen direkt nach der Termination der Phagozytose (t3, rot) und nach weiteren Inkubation von 30 min bei 37°C (t33, grün) bestimmt. Der prozentuelle Anteil an GFP-positiven Neutrophilen repräsentiert Zellen mit intrazellulären GFP-exprimierenden Bakterien. Ansätze aus humanen Neutrophilen und *S. aureus* ohne Zusatz von IgGs dienen als Negativkontrolle (schwarz). Der als GFP-positiv definierte Bereich ist mit M1 gekennzeichnet.

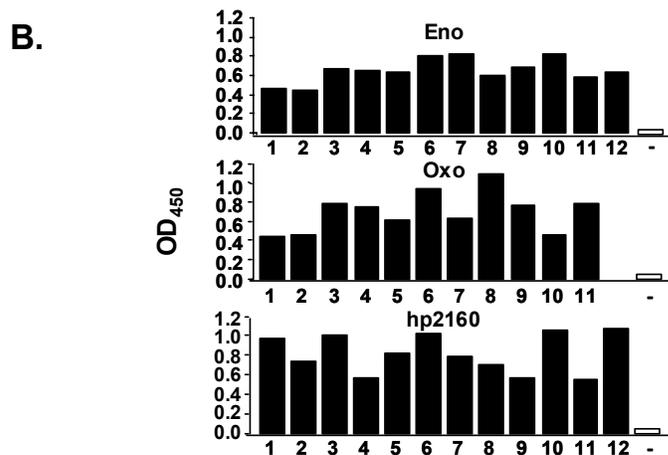
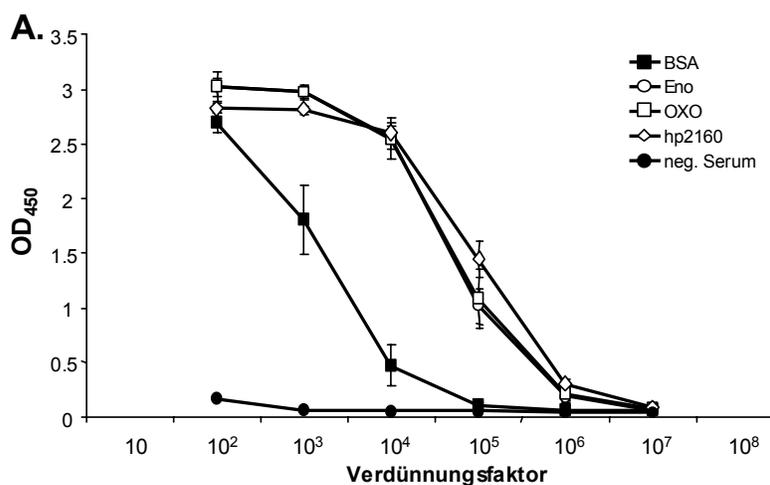
Im Gegensatz dazu wurden in Gegenwart von dSaIVIG, als Kontrolle von *S. aureus*-unspezifischen Antikörpern, nahezu keine Phagozytose sowohl zum Zeitpunkt t3 als auch zum Zeitpunkt t33 gemessen. Der Anteil an GFP-positiven Zellen von 5,5 % (t3) bzw. 1,5 % (t33) war vergleichbar mit dem GFP-positiven Anteil der Negativkontrolle ohne IgG-Zusatz, in der 6,3% der Zellen als GFP-positiv detektiert wurden.

Die *in vitro* Studien lassen darauf schließen, dass die antigenspezifischen Antikörper sowohl in der Lage sind, *S. aureus* durch Bindung an die spezifischen Antigene erfolgreich zu opsonisieren, als auch eine neutrophilenvermittelte Opsonophagozytose und die damit verbundene Elimination der Bakterien einzuleiten.

### **3.6 Induktion antigenspezifischer Antikörperproduktion durch Immunisierung mit rEno, rOxo und rhp2160**

Der *in vitro* durch affinitätsaufgereinigte Antikörper gegen rEno, rOxo und rhp2160 vermittelte antibakterielle Effekt sollte im weiteren unter Einbeziehung des gesamten Immunsystems in *in vivo* Immunisierungsstudien untersucht werden.

In Anlehnung an die vorangegangene *in vitro* Untersuchung der IgG-vermittelten Opsonophagozytose, sollte zunächst die Wirksamkeit der drei Vakzinekandidaten, eine Produktion von antigenspezifischen IgGs zu induzieren, analysiert werden. Die Immunogenität der Antigene wurde dabei durch die Bestimmung der Antikörpertiter im Serum der immunisierten Tiere mittels ELISA bestimmt (Kap. 2.2.19). Dazu wurden Gruppen von insgesamt 12 weiblichen C57/BL6 Mäusen mit dem jeweiligen Antigen, rEno, rOxo und rhp2160 bzw. BSA als Kontrolle nach dem in Kap. 2.2.17 beschriebenen Schema immunisiert. Während der gesamten Immunisierungsphase wurde bei den Versuchstieren kein abnormes Allgemeinbefinden beobachtet. Eine Woche nach der dritten Boosterimmunisierung wurde den Versuchstieren unter Ether-Anästhesie retro-orbital Blut entnommen und daraus das Serum präpariert (Kap. 2.2.18). Die Bestimmung der spezifischen Antikörpertiter erfolgte für jedes individuelle Versuchstier separat in Triplikaten. In Abb. 9. A ist der relative Antikörperspiegel, der für jede Immunisierungsgruppe durch die Bildung des Mittelwertes aus den Einzelergebnissen ermittelt wurde, dargestellt.



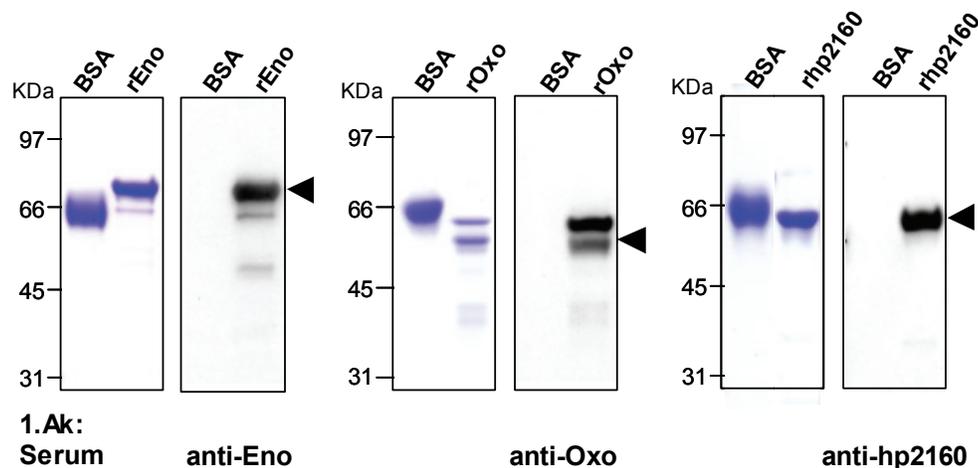
**Abb. 9** Bestimmung des Antikörpertiters im Serum von Mäusen nach Immunisierung mit rEno, rOxo, rhp2160 und BSA als Kontrolle. **(A)** Durchschnittlicher Antikörperspiegel in seriell verdünnten Mausseren. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen in Mausgruppen von 10-12 Tieren. **(B)** Verteilung des Antikörpertiters innerhalb der jeweiligen Immunisierungsgruppe. Dargestellt ist der Antikörpertiter in der 10<sup>5</sup> Verdünnung. Tiere wurden mit 100 µg Antigen (i.p.) initial und drei Mal mit 50 µg Antigen (s.c.) als Boost in Abständen von zwei Wochen immunisiert. 1:10 seriell verdünntes Mausserum wurde in einer mit 5 µg/ml Antigen vorbebeschichteten Maxisorp-Platte inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte unter Verwendung eines HRP-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörpers und des TMB-Substrats im ELISA-Reader bei einer OD von 450. Das Level des unspezifischen Hintergrundsignals wurde durch Inkubation der vorbebeschichteten Maxisorp-Platten mit dem Serum einer nicht-immunisierten Maus (neg. Serum) bestimmt.

Wie aus Abb. 9 A ersichtlich, wurde ein sehr hoher spezifischer Antikörpertiter im Serum von Mäusen gemessen, die sowohl mit rEno, rOxo als auch mit rhp2160 immunisiert wurden. Mit allen drei Antigenen wurde ein vergleichbar

hoher Antikörperspiegel induziert. Während sowohl spezifische anti-Eno, anti-Oxo als auch anti-hp2160 IgGs auch noch in der  $1:10^6$  Serumverdünnung detektierbar waren, war das Antikörpersignal im Serum von BSA-Kontrollmäusen bereits in der  $10^5$  Verdünnung nicht mehr messbar.

Aus Abb. 9 B ist der Antikörperspiegel, der im Serum jedes einzelnen Versuchstieres innerhalb einer Gruppe gemessen wurde, zu entnehmen. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Immunisierung ausnahmslos in jeder Maus zur Produktion von antigenspezifischen Antikörpern geführt hat. Des Weiteren lässt sich eine weitgehend gleichmäßige Verteilung des Antikörperspiegels innerhalb der Gruppen beobachten.

Mittels Western Blot Analyse wurde anschließend die Antigen-spezifität der in dem Mausserum vorliegenden, durch Immunisierung induzierten Antikörper ermittelt. Dazu wurde jeweils 2,5  $\mu$ g von rEno, rOxo bzw. rhp2160 und als Negativkontrolle BSA elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt und für die Immunodetektion geblottet. Die anschließende Immunfärbung erfolgte mit Seren der mit rEno, rOxo und rhp2160 immunisierten Mäuse.



**Abb. 10** Kontrolle der Antigen-spezifität von Antikörpern im Serum nach Immunisierung mit rEno, Oxo und rhp2160. Affinitätsaufgereinigtes rEno, rOxo und rhp2160 und BSA als Kontrolle (2,5  $\mu$ g) wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt, gefolgt von Coomassie-Färbung bzw. Western Blot und anschließender Immunfärbung mit Serum von immunisierten Mäusen (1:4000).

Wie aus der Immunodetektion in Abb. 10 ersichtlich, wurde mit jedem der drei Seren jeweils die entsprechende Antigenbande in der zu erwartenden Größe detektiert, während das als Negativkontrolle mitaufgetrennte BSA-Protein von keinem der Seren angefärbt wurde. Die Immunfärbung mit anti-Eno bzw. anti-rhp2160 Mausserum wies ein starkes spezifisches Signal für rEno bzw. rhp2160 auf, was auf einen entsprechend starken immunogenen Charakter der Antigene hindeutet. Die Immunfärbung mit anti-Oxo Serum führte hingegen zur Detektion einer zusätzlichen, ca. 60 kDa großen Bande, was daraufhin deutet, dass die Immunisierung mit dem affinitätsaufgereinigtem rOxo nicht nur die Induktion der anti-Oxo Antikörper vermittelt hat, sondern auch zur Produktion von Antikörpern gegen das 60 kDa Nebenprodukt geführt hat. Während das Nebenprodukt in dem Coomassie-gefärbten Gel farblich als eine untergeordnete Bande zu erkennen ist, wurde es bei der Immunfärbung mit einem deutlich stärkeren Signal als rOxo detektiert. Daraus lässt sich eine starke immunogene Aktivität des Nebenproduktes ersehen, die deutlich über der von rOxo liegt.

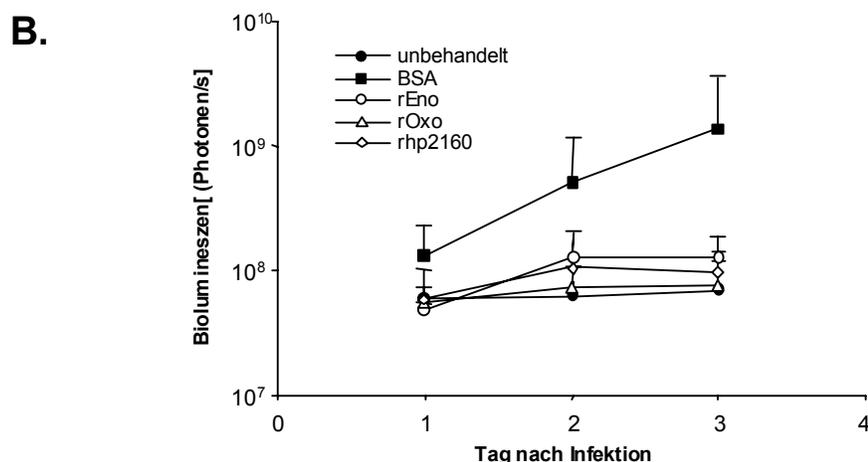
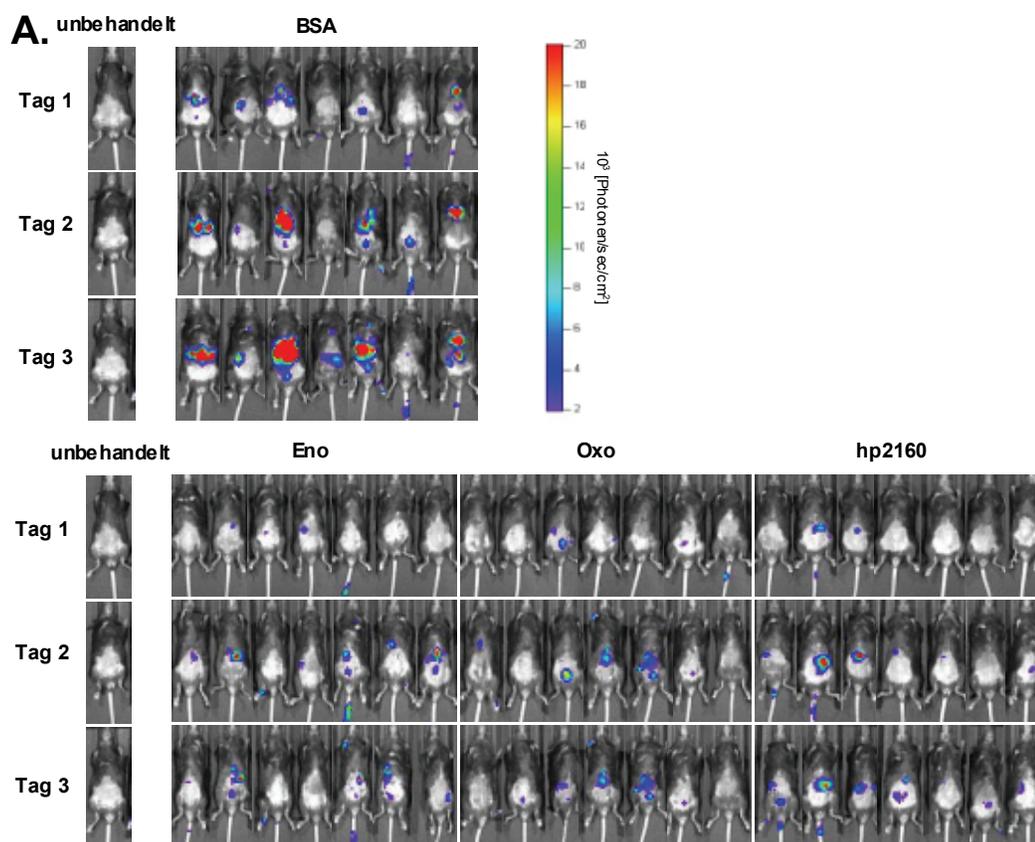
Bei der spezifischen BSA-Detektion, bei der ein BSA-Blot mit Serum von BSA-immunisierten Mäusen angefärbt wurde, konnte kein BSA-Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Wie schon die Titerbestimmung zeigte, hat die Immunisierung mit BSA zu einer deutlich schwächeren immunogenen Reaktion geführt, so dass der Antikörpertiter vermutlich zu niedrig ist, um in der Western Blot Analyse BSA mit dem anti-BSA-Serum in einer 1:4000 Verdünnung zu detektieren.

### **3.7 Einfluss der antigeninduzierten Immunantwort auf eine *S. aureus*-Infektion**

Die Immunisierung von Mäusen mit rEno, rOxo und rhp2160 führte zu einer erheblichen Induktion von antigenspezifischen Antikörpern und damit zum Aufbau einer *S. aureus*-spezifischen Immunantwort. Im nächsten Schritt der Arbeit sollte in *in vivo* Infektionsstudien der protektive Effekt der antigeninduzierten Immunantwort untersucht werden. Durch Infektion der immunisierten Mäuse mit einem virulenten *S. aureus*-Stamm sollte die Effizienz der Immunisierung mit dem jeweiligen Antigen verifiziert werden. Der protektive Effekt der Immunisie-

rung wurde mittels des sog. *in vivo* imaging Systems (IVIS) anhand eines murinen Sepsismodells untersucht. Durch Detektion und Messung von biolumineszenten Signalen ermöglicht IVIS, den Verlauf einer Infektion über einen längeren Zeitraum in einem individuellen Versuchstier zu verfolgen.

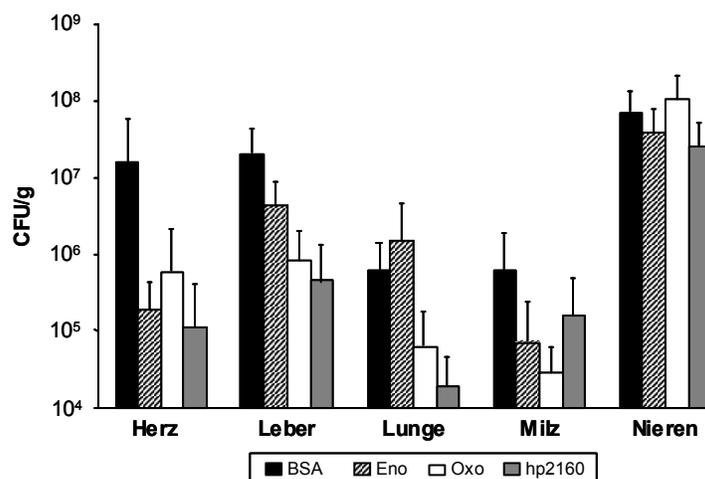
Um den Einfluss der Immunisierung auf eine *S. aureus*-Infektion zu untersuchen, wurden die immunisierten Mäuse eine Woche nach der Blutentnahme und zwei Wochen nach der letzten Boosterimmunisierung mit dem biolumineszenten *S. aureus*-Stamm Xen29 infiziert. Die verabreichte Bakterienmenge ( $1 \times 10^8$ ) wurde durch das Ausplattieren der seriell verdünnten Bakterienansätze und anschließende CFU-Bestimmung überprüft. Die Anzahl von  $1 \times 10^8$  Bakterien pro Infektion erwies sich in vorangegangenen Infektionstests als adäquat, um eine mittels IVIS messbare Biolumineszenz zu induzieren, ohne dabei das Leben der Mäuse zu gefährden. Die Testinfektionen zeigten des Weiteren, dass sowohl das schwarze Fell als auch die dunkle Pigmentierung der Haut der BL6 Mäuse die Emission des Lichts fast vollständig eindämmen. Aus diesem Grund wurde die Bauchseite der Mäuse 1-2 Tage vor den IVIS Aufnahmen rasiert und Mäuse, die eine stark ausgeprägte Bauchpigmentierung aufwiesen, aus dem Experiment ausgeschlossen. Die hier exemplarisch dargestellte *in vivo* Visualisierung erfolgte letztlich an einer Gruppe von insgesamt 7 Mäusen. Die Verbreitung der lumineszierenden Bakterien im Körper der immunisierten Mäusen wurde dabei an drei aufeinander folgenden Tagen mittels IVIS detektiert. Die erste Messung erfolgte 24 h nach der Infektion der Tiere. Abb. 11 A zeigt die *in vivo* Visualisierung von Mäusen, die entweder mit BSA oder mit den potentiellen Vakzinekandidaten rEno, rOxo und rhp2160 immunisiert wurden. Während in der BSA immunisierten Gruppe von Tag 1 bis Tag 3 nach der Infektion ein progressiver Anstieg der Biolumineszenz und damit der *S. aureus*-Kolonisation zu beobachten war, blieb die Bioluminszenzintensität in den mit rEno, rOxo und rhp2160 immunisierten Mäusen innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums nahezu unverändert, was deutlich am Fehlen der roten Detektionssignale zu erkennen ist.



**Abb. 11** *In vivo* Visualisierung des biolumineszenten *S. aureus* Xen 29 nach Infektion von immunisierten C57/BL6 Mäusen (n=7). **(A)** Die mit rEno, rOxo, rhp2160 und BSA als Kontrolle immunisierten Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  Bakterien durch Injektion in die laterale Schwanzvene (i.v.) infiziert. Der Prozess der Infektion wurde täglich über einen Zeitraum von 3 Tagen an der IVIS Anlage verfolgt. Die Detektion der Lumineszenzsignale erfolgte durch Messung der Biolumineszenz auf der Bauchseite der Mäuse für 5 min und ist in der Abbildung durch Ermittlung der Photonen/Sek/cm<sup>2</sup> farblich dargestellt. **(B)** Quantitative Datenanalyse der an der IVIS Anlage gemessenen Biolumineszenz von *S. aureus* Xen 29 nach Infektion von C57/BL6 Mäusen. Die Biolumineszenz wurde als Gesamtzahl der Photonen pro Sekunde innerhalb eines definierten Bereiches (ROI) mit Hilfe der IVIS Software berechnet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung für eine Gruppe von 7 Mäusen.

Die differentielle Ausbreitung der Staphylokokken in der BSA-Kontrollgruppe und in den antigenimmunisierten Gruppen wird durch die in Abb. 11 B dargestellte quantitative Datenanalyse der Biolumineszenzsignale untermauert. Während für die BSA-Gruppe ein nahezu exponentieller Anstieg der *S. aureus*-vermittelten Biolumineszenz im Verlauf der drei Detektionstage zu beobachten war, stieg die Biolumineszenz in den mit den Antigenen immunisierten Gruppen nach dem ersten Tag der Messung nur geringfügig an und blieb bis zum letzten Detektionstag unverändert. Am dritten Tag nach der Infektion führte die Immunisierung mit rEno, rOxo und rhp2160 zur Detektion einer 10-fach niedrigeren Biolumineszenz als die Immunisierung mit BSA.

Da die IVIS Analyse nur eine indirekte Detektion der Staphylokokken im Körper des Versuchstieres ermöglicht, wurden am dritten Tag direkt im Anschluss an die letzte IVIS Messung die Organe der Versuchstiere entnommen und auf die Besiedlung mit Bakterien hin untersucht.



**Abb. 12** Bestimmung der Bakteriendichte in Organen von immunisierten C57/BL6 Mäusen nach Infektion mit *S. aureus* Xen 29. Die mit rEno, rOxo, rhp2160 und BSA als Kontrolle immunisierten Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  Bakterien infiziert (i.v.). Drei Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und die Homogenisate auf MH-Platten zur Bestimmung der CFU-Zahl ausgestrichen. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung für eine Gruppe von insgesamt 7 Mäusen.

Die Bestimmung der Bakteriendichte in Herz, Leber, Lunge, Milz und Nieren der Versuchstiere zeigte einen deutlichen Unterschied in der Anzahl der CFUs zwi-

schen den BSA-Kontrolltieren und den mit rEno, rOxo und rhp2160 immunisierten Tieren. Wie Abb. 12 zeigt, ist die Bakteriendichte in den Organen der mit rEno, rOxo und rhp2160 immunisierten Mäuse deutlich niedriger im Vergleich zu der CFU-Zahl in den Organen der Kontrollmäuse. Die größten Unterschiede in der Kolonisationsrate im Vergleich zu der BSA-Gruppe sind in Herz, Leber und Lunge der Mäuse zu beobachten, wobei die Immunisierung mit rhp2160 in allen Organen, mit Ausnahme der Milz, die stärkste Reduktion der Kolonisationsrate zur Folge hatte. Während in der Leber der mit rhp2160 immunisierten Mäuse eine fast 100fach niedrigere Bakteriendichte detektiert wurde, war in der mit rOxo immunisierten Gruppe eine 10fache und in der mit rEno immunisierten Gruppe eine 5fache Reduktion der CFU-Zahl zu beobachten.

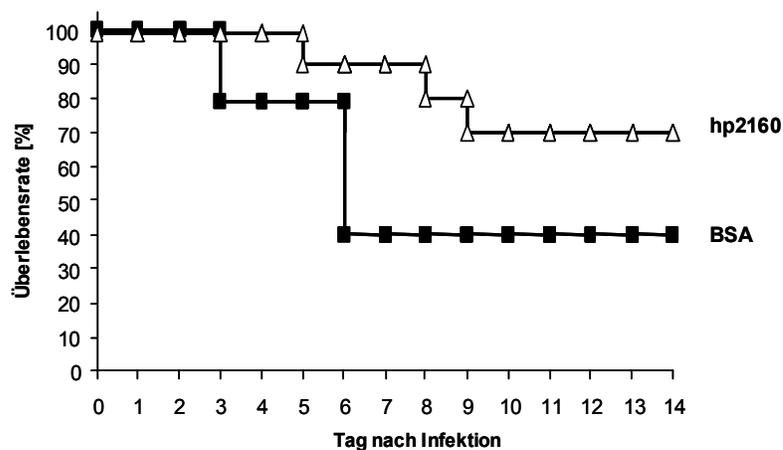
Die *in vivo* Daten zeigen deutlich, dass die Immunisierung mit den drei Vakzinekandidaten, Eno, Oxo und hp2160 einer progressive Ausbreitung von *S. aureus* entgegen wirkt und somit zur Induktion einer protektiven, antibakteriell wirkenden Immunantwort führt.

### **3.8 Überleben der immunisierten Mäuse nach Infektion mit *S. aureus***

Nachdem in dem vorangegangenen Kapitel mittels *in vivo* Visualisierung dargelegt werden konnte, dass die Immunisierung mit rEno, rOxo bzw. rhp2160 zu einer deutlichen Reduktion der bakteriellen Kolonisation führt, sollte hier untersucht werden, ob die Immunisierung einen positiven Einfluss auf das Überleben der Mäusen nach Infektion mit *S. aureus* hat. Exemplarisch für die drei Vakzinekandidaten wurde eine Gruppe von 10 weiblichen C57/BL6 mit rhp2160 immunisiert. Die Immunisierung verlief äquivalent zu der im Kap. 3.6 beschriebenen Vorgehensweise. Anschließend wurde die Gruppe mit dem höchst virulenten wt *S. aureus*-Stamm ATCC 29213 ( $3 \times 10^7$ ) infiziert und der Gesundheitszustand der Mäuse täglich kontrolliert und protokolliert. Die Menge der i.v. verabreichten Bakterien entsprach einem *S. aureus*-Titer, bei dem 50 % der Versuchstiere aufgrund der Infektion sterben ( $LD_{50}$ ).

Wie Abb. 13 zeigt, hatte die Immunisierung mit rhp2160 eine deutlich höhere Überlebensrate zur Folge als die Kontrollimmunisierung mit BSA. Während die mit rhp2160 immunisierten Mäuse die ersten fünf Beobachtungstage aus-

nahmslos überlebten, endete die Infektion der Kontrollgruppe bereits am dritten Tag nach der Infektion in 20 % der Fälle tödlich. Nach 14 Tagen war eine 40 %ige Überlebensrate in der Kontrollgruppe zu verzeichnen, während die Immunisierung mit rhp2160 zu einer Überlebensrate von 70 % führte.



**Abb. 13** Überleben von immunisierten C57/BL6 Mäusen nach Infektion mit *S. aureus* ATCC 29213. Mit rhp2160 bzw. BSA immunisierte Mäuse (n=10) wurden mit  $3 \times 10^7$  Bakterien ( $LD_{50}$ ) durch Injektion in die laterale Schwanzvene (i.v.) infiziert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Identifizierung zellwandassoziierter Vakzinekandidaten

*S. aureus* ist ein klinisch relevantes Pathogen, das mit Haut- und Wundinfektion aber auch mit schwersten systemischen Erkrankungen, wie Endokarditis, Bakteriämie und Sepsis assoziiert ist. Die weltweite, stetig zunehmende Prävalenz von multiresistenten Stämmen erschwert die Behandlung von *S. aureus*-assoziierten Erkrankungen massiv, mit der Folge einer noch höheren Morbiditäts- und Mortalitätsrate. Der wachsende Anteil von Risikopatienten, also älteren, immungeschwächten Patienten oder aber Patienten, die eines regelmäßigen Krankenhausaufenthaltes bedürfen (z. B. Dialysepatienten), weckte das Interesse an der Entwicklung alternativer Strategien für die Behandlung von *S. aureus*-Infektionen. Die Entwicklung einer effektiven Vakzine ist von besonderer medizinischer Bedeutung, da diese eine Prävention der staphylokokkalen Erkrankung ermöglicht. Gerade Patienten mit chronischen Erkrankungen, die einer dauerhaften Infektionsgefahr ausgesetzt sind, würden von einer prophylaktischen Behandlung entscheidend profitieren. Umfangreiche Vakzinierungsstudien mit bekannten staphylokokkalen Virulenzfaktoren als Angriffsziele brachten bis heute jedoch nur mäßige Erfolge in der Prävention von *S. aureus*-Infektionen. Zu den prominentesten Vakzinekandidaten gehören die Adhäsine der MSCRAMM-Familie, wie z. B. Fibronektin- (Fn), Fibrinogen- (ClfA) oder Kollagen-(Cna) bindende Proteine, gefolgt von den kapsulären Polysacchariden CP 5 und CP 8 [58, 72-75]. Die Immunisierung mit individuellen Adhäsinen konnte in experimentellen Tiermodellen zwar die Pathogenität von *S. aureus* senken, jedoch den Ausbruch der Erkrankung nicht verhindern. Darüber hinaus hing in vielen Fällen der protektive Effekt von dem jeweiligen Infektionsmodell ab. Während in einem Mastitis-assoziierten Infektionsmodell die Immunisierung mit Cna zu einer Reduktion der staphylokokkale Verbreitung führte, hatte sie auf eine septische Arthritis keinen messbaren Effekt [58, 62].

Die Vakzinierung mit den kapsulären Polysacchariden CP5 und CP8, die zu den am häufigsten vorkommenden Serotypen unter den *S. aureus*-Stämmen gehören ( $\approx 80\%$ ) [49], erzielte nicht minder enttäuschende Ergebnisse. Die Konjugatvakzine (StaphVAX™) führte zwar zu einer höheren Überlebensrate der immunisierten Mäuse [53], hatte jedoch in klinischen Studien keinen signifikanten Effekt auf das Auftreten einer Bakteriämie in Dialysepatienten. Die geringe protektive Effektivität der Vakzine führte schließlich zum frühzeitigen Abbruch der klinischen Studien [73]. Im Unterschied zu anderen pathogenen Bakterien wie *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae*, bei welchen die kapsulären Polysaccharide zu den Schlüsselfaktoren der bakteriellen Virulenz gehören und demzufolge die Vakzinierung mit diesen zu einer  $>90\%$ igen Protektion führte, spielen die CPs in der staphylokokkale Virulenz nur eine untergeordnete Rolle. Außerdem ist die Expression der CPs während einer *S. aureus*-Infektion variabel und optional [76].

Die mäßigen Erfolge in der Vakzinierung mit individuellen Virulenzfaktoren als Angriffsziele sind in Anbetracht der Vielzahl an weiteren für die staphylokokkale Pathogenese höchst relevanten Virulenzfaktoren nicht überraschend. Viele der Virulenzfaktoren üben redundante Funktionen aus und können mit vergleichbarer Affinität z. B. an Fibronektin oder Fibrinogen binden [19, 22, 77-79]. Alle bisherigen Vakzinierungsstudien lassen klar erkennen, dass eine monovalente Vakzine, zum einen aufgrund der stark ausgeprägten, funktionellen Redundanz der staphylokokkale Virulenzfaktoren, zum anderen aufgrund ihrer optionalen, individuell regulierbaren Expression, nur eingeschränkt tauglich ist, die staphylokokkale Pathogenität dermaßen zu senken, dass der Ausbruch einer *S. aureus*-Erkrankung vollständig verhindert wird. Die Entwicklung einer polyvalenten Vakzine, die nicht nur ein einziges, sondern multiple Virulenzfaktoren oder andere antigene Strukturen als Angriffsziele hat, bietet eine erfolgversprechende Alternative zu einer monovalenten Vakzine. Die Auswahl adäquater Angriffsziele spielt dabei eine herausragende Rolle. Dabei stellt die Identifizierung neuer, hoch immunogener Oberflächenstrukturen, die nach Möglichkeit nicht nur eine pathogenetische sondern optimalerweise für das Bakterium selbst essentielle Funktionen ausüben, einen entscheidenden Schritt in diese Richtung dar. Gerade Proteine, die entweder regulatorische, metabolische oder strukturgebende Funktionen an der Oberfläche des Bakteriums ausüben, wür-

den sich besonders als vielversprechende Angriffsziele anbieten; zum einen, weil das Bakterium nicht ohne weiteres auf deren Expression verzichten kann, zum anderen, weil sie meistens zu universell vorkommenden Proteinen gehören.

Die „Reverse Vakzinologie“ stellt ein neues Verfahren zur Identifizierung bakterieller Vakzinekandidaten dar. Sie beruht auf dem gezielten Einsatz gentechnisch hergestellter Proteine als Antigene, die zuvor mittels einer computergestützten Genomanalyse aufgrund eines konservierten Sequenzmotivs als vielversprechende Vakzinekandidaten vorhergesagt wurden. In dem Vorhandensein eines derartigen Sequenzmotivs liegt auch gleichzeitig die Einschränkung dieser Methode. Die „Reverse Vakzinologie“ kann nur dann zu einer erfolgreichen Kandidatenidentifizierung führen, wenn die Zielproteine ein solches Sequenzmotiv gemeinsam haben, und wenn aufgrund des Motivs oder anderer Sequenzmerkmale ihre Oberflächenlokalisierung gewährleistet ist. Bewährt hat sich die „Reverse Vakzinologie“ bereits in der erfolgreichen Identifizierung protektiver Antigene und der Entwicklung von Vakzinen gegen Gruppe A und B der Streptokokken [80, 81] und Gruppe B der Meningokokken [82]. Zur Identifizierung von staphylokokkalen Vakzinekandidaten wurde das bioinformatische Grundprinzip der „Reversen Vakzinologie“ erstmals von Roche *et al.* im Jahr 2003 eingesetzt [17], gefolgt von Stranger-Jones *et al.* im Jahr 2006 [83]. In beiden Fällen basierte die genomische Datenbankanalyse auf der Vorhersage von Proteinen, die sich durch das konservierte LPXTG-Motiv auszeichnen. Die meisten der prominenten Oberflächenadhäsine gehören zu der Familie der MSCRAMM-Proteine, die über das konservierte LPXTG-Motiv kovalent in der bakteriellen Zellwand verankert sind [14]. Zehn neue LPXTG-Proteine wurden mit Hilfe der Bioinformatik identifiziert [17, 83], darunter hauptsächlich Proteine, die aufgrund struktureller Homologien wahrscheinlich ebenfalls adhäsive Funktionen ausüben, aber auch Proteine, wie Isd (*iron-regulated surface determinant*) A und B, die an der Translokation von Häm-gebundenen Eisen ins Zytoplasma des Bakteriums beteiligt zu sein scheinen [84].

Allerdings zeigen neuere Studien, dass zahlreiche Oberflächenproteine als nicht kovalent gebundene Proteine an der bakteriellen Oberfläche vorkommen und sich nicht durch ein LPXTG-Motiv auszeichnen. Diese Proteine konnten und können daher nicht im Rahmen einer computergestützten Genomanalyse der „Reversen Vakzinologie“ erfasst und identifiziert werden. Diese zumeist

zellwandassoziierten Proteine repräsentieren allerdings vielversprechende Angriffsziele für eine Vakzinierung, da sie neben adhäsiven oder immunmodulatorischen gleichzeitig für das Bakterium selbst wichtige strukturelle und metabolische Funktionen ausüben. Ein prominentes Beispiel solcher bifunktioneller, zellwandassoziiierter Oberflächenproteine ist das bakterielle Autolysin. Neben seiner enzymatischen Rolle in der Zellteilung, speziell bei der Trennung von bereits geteilten Tochterzellen [18], zeichnet sich Autolysin durch adhäsive Eigenschaften bei der Bindung von Fibrinogen, Fibronektin und Vitronektin aus [19]. Zu weiteren LPXTG-losen Oberflächenproteinen, die in die Pathogenese und /oder in die bakterielle Biogenese bzw. Metabolismus involviert sind, gehören u. A. das Fibronektin- und Fibrinogen-bindende Isd A (*iron-responsive surface determinant*) [85], das Transferrin-bindende Protein Tpn [86], das Fibronektin-bindende Ebh (*extracellular matrix-binding protein homologue*) [78], die Enolase [21, 22] oder das immunmodulatorische Eap [22].

Ein prinzipiell anderes Verfahren wurde im Jahr 2002 von Vytvytska *et al.* erfolgreich zur Identifizierung immunogener staphylokokkaler Oberflächenproteine eingesetzt. Vytvytskas „Serologische Proteomanalyse“ (SERPA) basierte auf der 2D-Gelelektrophorese von Zellwandproteinen, die durch enzymatische Spaltung der Pentaglycinbrücken der Mureinschicht mit Lysostaphin aus der bakteriellen Zellwand extrahiert wurden. Die Detektion von Zellwandproteinen, die mit Seren von individuellen Patienten und gesunden Blutspendern immunreagierten, führte zu der Identifizierung von insgesamt 15 Vakzinekandidaten. Die protektive Funktionalität dieser Vakzinekandidaten ist aufgrund fehlender *in vivo* Untersuchungen unbekannt [87].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues, auf SERPA basierendes proteomanalytisches Verfahren namens SUPRA („Subtraktive Proteomanalyse“) entwickelt. SUPRA ermöglichte die gezielte Identifizierung von zellwandassoziierten Proteinen, die von *S. aureus*-spezifischen Antikörpern erkannt und gebunden werden. In Anlehnung an die Tatsache, dass sowohl Patienten als auch gesunde Menschen hohe, *S. aureus*-spezifische Antikörpertiter aufweisen, die einen gewissen Grundschutz gegen nachfolgende *S. aureus*-Infektion bieten [88], wurde der limitierende Faktor individueller Patienten- oder Spenderseren zur Detektion immunogener Proteine beseitigt, indem stattdessen eine intravenöse Immunglobulin G Präparation (IVIG) verwendet wurde. Die differentielle Im-

munodetektion von Proteinen unter Verwendung von IVIG und IVIG nach Depletion von *S. aureus*-spezifischen IgGs (dSaIVIG) und die anschließende subtraktive Auswahl von Proteinen, die nur von IVIG aber nicht von dSaIVIG gebunden werden, ermöglichte die Identifizierung von immunogenen Proteinen, welche von hochaffinen, spezifischen IgGs gebunden werden. Proteine, die sowohl mit IVIG als auch mit dSaIVIG immunreagierten, wurden dagegen aufgrund niedriger Antigenspezifität für die Verwendung als Vakzine ausgeschlossen. Die methodische Verknüpfung der Proteomanalyse mit der subtraktiven Western Blot Analyse führte zu der Identifizierung von 39 immunogenen, zellwandassoziierten Proteinkandidaten. Die Effektivität dieser Kandidaten als potentielle Angriffsziele für eine Vakzinierung wurde anschließend anhand von drei zufällig ausgewählten Proteinen, Enolase, Oxoacyl-Reduktase und dem hypothetischen Protein hp2160 exemplarisch untersucht.

#### **4.1.1 IVIG repräsentiert eine adäquate Quelle für opsonisierende, *S. aureus*-spezifische IgGs**

Die Identifizierung von *S. aureus*-Vakzinekandidaten mittels SUPRA setzte ein Repertoire an Antikörpern voraus, das sich durch ein breites Spektrum von IgGs mit einer hohen Diversität auszeichnete. Die für kommerzielle Zwecke hergestellte, intravenöse Immunglobulin G Präparation (IVIG) besteht aus IgGs, die aus Serum von mindestens 1000 Einzelspendern aufgereinigt wurden, und wird erfolgreich bei Patienten mit Antikörpermangelzuständen, wie Hypogamaglobulinämie oder Immundefektsyndrom, eingesetzt, um so ihre Anfälligkeit für bakterielle Infektionen zu senken. Auch in der direkten Therapie und Prävention von staphylokokkalen Infektionen gewinnt IVIG als Zusatztherapeutikum zu der klassischen Antibiotikabehandlung zunehmend an Bedeutung. Durch Neutralisation von *S. aureus*-Toxinen, wie dem TSST-1 oder dem PVL (*Panton Valentine Leukocidin*), konnte in Tierexperimenten eine Reduktion der Toxin-vermittelten *S. aureus*-Infektion gezeigt werden [89, 90]. Polyklonale IVIG Präparation, SA-IVIG bzw. INH-A21, wurden gezielt aus Seren hergestellt, die hohe Antikörpertiter gegen die staphylokokkalen Adhäsine Cif A (SA-IVIG) bzw. Cif A und Sdr G (INH-A21) aufwiesen. Beide Präparationen verstärkten den protektiven Effekt in der Elimination von *S. aureus* in experimentellen Infekti-

onsmodellen [91, 92]. Durch Bindung an bakterielle Oberflächenantigene bewirkt IVIG eine effektive Opsonisierung, Komplement-Aktivierung und die Induktion der bakteriellen Opsonophagozytose durch Zellen des Immunsystems. In einer Studie, in der IVIG auf seine opsonische Aktivität gegen zehn unterschiedliche bakterielle Pathogene, darunter 14 verschiedene gram-positive und 23 gram-negative Stämme, untersucht wurde, konnte für alle der untersuchten Stämme eine IVIG induzierte Opsonophagozytose beobachtet werden [93]. Die Effizienz der opsonischen Wirkung und damit die Pathogenspezifität der IVIGs kann jedoch zwischen unterschiedlichen Präparaten und sogar zwischen den Chargen stark variieren [94]. Letztendlich richten sich die IgG-Spezifitäten des jeweiligen Präparates danach, zu welchen Pathogenen die Blutspender Kontakt hatten, ob sie mit ihnen besiedelt oder infiziert waren. Aufgrund dieser in den IVIGs vorkommenden Antikörpervarianz, wurde deshalb die in dieser Arbeit verwendete IVIG Präparation (Octagam®, Octapharma) zunächst daraufhin untersucht, ob sie *S. aureus*-opsonisierende Antikörper enthält. Die opsonische Aktivität von IVIG wurde an der durch die Phagozytose von GFP-exprimierenden *S. aureus*-vermittelten Fluoreszenz der humanen Neutrophile im FACS gemessen. Eine hohe opsonische Aktivität konnte bei IVIG wie auch dem hitzeinaktivierten Kontrollserum gemessen werden. Diese opsonische, IVIG-vermittelte Aktivität wurde gänzlich aufgehoben, wenn IVIG vor der Opsonophagozytose mit *S. aureus* preinkubiert worden war, um *S. aureus*-spezifische IgGs zu depletieren (dSaIVIG). Die Induktion der Opsonophagozytose und ihre Aufhebung durch Depletion von *S. aureus*-spezifischen IgGs ließ eindeutig darauf schließen, dass das im Rahmen dieser Arbeit verwendete IVIG opsonische Antikörper gegen *S. aureus* enthielt.

#### **4.1.2 SUPRA ermöglicht die Identifizierung zellwandassoziiierter, immunogener *S. aureus*-Proteine**

In der vorliegenden Arbeit wurden immunogene, zellwandassoziierte *S. aureus*-Proteine mittels SUPRA identifiziert. Zur Gewinnung staphylokokkaler Oberflächenproteine wurden hier, im Gegensatz zu einer Lysostaphin-Behandlung, bei der durch enzymatische Spaltung der Zellwand-Quervernetzungen kovalent gebundene Proteine extrahiert werden, durch Behandlung mit hohen Salzkonzent-

rationen (1,5 M LiCl) gezielt zellwandassoziierte Proteine isoliert. Die LiCl-Extraktion von zellwandassoziierten Proteinen beruht dabei auf der Aufhebung von ionischen Wechselwirkungen, durch die das Protein in der Zellwand festgehalten wird. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich bei der Isolierung anderer staphylokokkaler, zellwandassoziiierter Proteine, wie z. B. Autolysin oder Eap, eingesetzt [95, 96]. Das so gewonnene Subproteom wurde anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese erfolgreich aufgetrennt und die Gele entweder mit IVIG bzw. dSalVIG immungefärbt oder mit Silber bzw. für die MALDI-TOF Identifizierung mit Coomassie gefärbt. Die Immunofärbung mit IVIG bzw. dSalVIG resultierte in der Detektion differentieller Proteinmuster. Die Färbung mit dSalVIG führte aufgrund der Depletion von *S. aureus*-spezifischen IgGs zur Detektion einer entscheidend niedrigeren Spotzahl als unbehandeltes IVIG. Es galten diejenigen Proteine als vielversprechende Vakzinekandidaten, die mit IVIG jedoch nicht mit dSalVIG anfärbbar waren. Auffällig bei der Immunofärbung waren zwei immunodominante Signalketten bei 66 kDa bzw. 30 kDa. Die obere Signalkette, die charakteristisch für das staphylokokkale Protein A ist, konnte wegen den ungünstigen Detektionsbedingungen, unter welchen das Protein als ein überexponiertes Signal detektiert wurde, nicht den Proteinspots auf dem Coomassie-Gel zugeordnet werden und damit im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Unter der Annahme, dass es sich dabei um Protein A handelt, ist bereits bekannt, dass sich Protein A nicht als Angriffziel für eine effektive Vakzinierung gegen *S. aureus* eignet [60]. Alle anderen differentiell detektierten Spots wurden nach Möglichkeit den Proteinen auf den Coomassie-gefärbten Gelen zugeordnet. Da sich die Coomassie-Färbung durch niedrige Sensitivität auszeichnet und viele der Proteinspots nur sehr schwach bis gar nicht sichtbar angefärbt waren, wurden die viel sensitiveren Silbergele bei problematischen Zuordnungsfällen als Hilfe genutzt, um die korrespondierenden Spots auf den Coomassie-gefärbten Gelen zu ermitteln. Die anschließende MALDI-TOF- und Datenbank Analyse führte zur Identifizierung von 39 potentiellen Vakzinekandidaten, die spezifisch von opsonisierenden IVIG-IgGs erkannt werden. Eine computergestützte Sequenzanalyse in Bezug auf konservierte Domänen und Sequenzmotive der Proteine ermöglichte eine Vorhersage bezüglich ihrer Funktionen. Wie erwartet, gehörten die meisten der identifizierten Proteine zu Enzymen, die an der bakteriellen Oberfläche in Prozesse der Zell-

teilung, Zellwandsynthese und Metabolismus involviert sind. Dazu gehörten Autolysin, das immundominante Antigen A (Isa A), Peptidoglykan-Hydrolase, Alanin-Dehydrogenase, sekretorisches Antigen Präkursor SsaA-Homolog, das hypothetischen Proteine mit Ähnlichkeit zu dem Anion-bindenden Protein und das hypothetische Protein mit Ähnlichkeit zu einem Autolysin-Präkursor. Weitere Enzyme, wie die Aldehyd-Dehydrogenase oder das Malat-Dehydrogenase-Homolog, sind vermutlich an Prozessen der Energieproduktion und -umwandlung beteiligt, während Oxoacyl-Reduktase, Phosphopentomutase, Triphosphat-Isomerase oder Enolase als zytoplasmatisch vorkommende Enzyme in metabolisch wichtige Prozesse, wie dem Lipid- oder Karbohydrat-Metabolismus, involviert sind. Zu weiteren, zytoplasmatischen Proteinen gehört der Elongationsfaktor TU (EF-Tu) und die ribosomalen Proteine L13 bzw. L25. Des Weiteren wurde eine Vielzahl von hypothetischen Proteinen mit unbekannt Funktionen identifiziert. Bei fast jeder bis dato existierender Proteomanalyse in Bezug auf Zellwandproteine von bakteriellen Pathogene, wie *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* oder *S. aureus*, wurden stets auch zytoplasmatische Proteine, wie z. B. die ribosomalen Proteine oder der EF-Tu identifiziert und dies jeweils unabhängig von der angewandten Extraktionsmethode der Zellwandproteine [97-101]. Kontrovers diskutiert wurde die Frage, ob die Identifizierung dieser Proteine als Folge einer Kontamination zustande kommt und es sich damit um Artefakte handelt. Das Vorkommen dieser Proteine in Zellwandextraktionen als Folge einer zytoplasmatischen Kontamination wurde jedoch in Frage gestellt, als für die ersten der „zytoplasmatischen“ Proteine sowohl die Oberflächenlokalisierung als auch eine pathogenetische Funktion experimentell bewiesen werden konnte. Ein prominenter Vertreter dieser Proteingruppe bei *S. aureus* ist die Enolase, die mit hoher Affinität Laminin und Plasminogen bindet [20, 21]. Auch bei anderen bakteriellen, grampositiven Pathogenen, wie *S. pneumoniae*, ist die Enolase an der Oberfläche präsent und als Adhäsion aktiv [102]. Vor kurzem wurde Enolase erstmals als potentiell Angriffsziel für Vakzinierung in Zusammenhang mit einer Immunisierungsstudie, in welcher der protektive Effekt von anti-Enolase Antikörpern gegen die Kolonisation mit *S. pyogenes* untersucht wurde, beschrieben. Die Immunisierung mit Enolase führte zu einer signifikanten Reduktion der Bakteriendichte in der Milz der murinen Versuchstiere [103]. In *Mycoplasma pneumo-*

*niae* und *Lactobacillus johnsonii* wurde die Oberflächenlokalisierung von EF-Tu mittels Immungoldfärbung und Elektronmikroskopie nachgewiesen. Des Weiteren konnte für EF-Tu eine adhäsive Aktivität festgestellt werden. Während das *M. pneumoniae*-spezifische EF-Tu eine hohe Affinität zu Fibronectin aufwies [71], konnte das *L. monocytogenes*-spezifische EF-Tu Plasminogen binden [98]. Verglichen mit der Liste der immunogenen *S. aureus*-Proteine, die von Vytvytska *et al.* mittels SERPA identifiziert worden sind, gehören zwei der hier identifizierten Proteine, IsaA und EF-Tu, zu bereits durch Vytvytska *et al.* beschriebenen Kandidaten. Abgesehen davon gibt es jedoch keine weiteren Übereinstimmungen mit den 15 mittels SERPA identifizierten Proteinen [87].

#### **4.2 Antibakterielle Aktivität der mittels SUPRA identifizierten Kandidaten**

Aus der Liste der mittels SUPRA identifizierten Vakzinekandidaten wurden drei immunogene Proteine, Enolase (Eno), Oxoacyl-Reduktase (Oxo) und das hypothetische Proteine 2160 (hp2160) ausgewählt, um sie in *in vitro* und *in vivo* Studien auf ihre antibakterielle Wirkung zu untersuchen. Nach Expression der drei Proteine als GST-Fusionsproteine wurden diese mittels Affinitätschromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Die Aufreinigungseffizienz wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Es zeigte sich, dass, während die rekombinanten Proteine, rEno und rhp2160 mit einem hohen Reinheitsgrad aufzureinigen waren, die Coomassie-gefärbte rOxo-Proteinfraktion zusätzlich zu rOxo weitere Banden aufwies. Neben einer schwachen ca. 70 kDa Bande stach ein ca. 60 kDa großes Nebenprodukt besonders hervor. Keines dieser Nebenprodukte, auch nicht das 60 kDa-Molekül, war jedoch mit dem spezifischen anti-GST Antikörper detektierbar, so dass es sich bei den Nebenprodukten vermutlich um endogene *E. coli*-Proteine handelt. Es ist allgemein bekannt, dass die Überexpression von GST-Fusionsproteinen zu einer Koaufrreinigung von endogenen bakteriellen Proteinen, wie dem DnaK ( $\approx 70$  kDa) oder GroEL ( $\approx 60$  kDa) Chaperonin, führen kann [104-106]. Durch Bindung an ungefaltete Proteine können Chaperonine Faltungsvorgänge zeitlich und räumlich kontrollieren sowie eine inkorrekte Faltung verhindern [107, 108]. Das ca. 60 kDa große GroEL gehört zu der Hsp60 Klasse der Hitze-

schockproteine und spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung von langsamfaltenden Proteinen mit der Tendenz zu Aggregation [109]. Die Koaufrreinigung dieses Proteins zusammen mit rOxo könnte demnach mit Schwierigkeiten in der korrekten Proteinfaltung des Fusionsproteins zusammenhängen. Mit Hilfe eines zusätzlichen Aufreinigungsschrittes, wie z. B. der Ionenaustauschchromatographie, hätte das koaufgereinigte GroEL aus der rOxo-Proteinfraktion eliminiert werden können. Da es sich aber um ein zytoplasmatisches *E. coli*-Protein handelt, wurde auf eine sekundäre Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie verzichtet.

Anschließend wurden die rekombinant exprimierten und affinitätsaufgereinigten Antigene dazu eingesetzt, mittels Affinitätschromatographie korrespondierende Antikörper über Ausbildung eines spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes aus IVIG aufzureinigen. Mittels Western Blot Analyse wurde anschließend die Antigenspezifität der anti-Eno, -Oxo und -hp2160 Antikörper erfolgreich nachgewiesen. Während die zusätzliche, ca. 70 kDa große Bande in der rOxo-Proteinfraktion vermutlich die Koaufrreinigung von anti-DnaK Antikörpern aus IVIG zeigt, deutet die fehlende Bande bei ca. 60 kDa darauf hin, dass IVIG scheinbar keine spezifischen IgGs gegen GroEL enthält.

#### **4.2.1 Anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160 Antikörper induzieren bakterielle Opsonophagozytose**

Die affinitätschromatographische Aufreinigung spezifischer Antikörper gegen rEno, rOxo und rhp2160 ermöglichte die darauffolgende Untersuchung der opsonischen Aktivität dieser in einem Opsonophagozytose-Assay. Der hohe Anteil an GFP-positiven Neutrophilen direkt nach Abbruch der Phagozytose wies daraufhin, dass alle drei *S. aureus*-spezifische Antikörpertypen in der Lage waren, eine effiziente Opsonophagozytose des GFP-exprimierenden *S. aureus* durch humane Neutrophile zu induzieren. Die Messung der GFP-positiven Neutrophile 30 min nach der Termination der Phagozytose resultierte wiederum in einer drastischen Reduktion des GFP-positiven Zellanteils. Eine plausible Erklärung für den zeitabhängigen Rückgang der *S. aureus*-vermittelten Fluoreszenz der Zellen könnte in der Elimination der phagozytierten Bakterien durch den phagosomalen Abbaumechanismus liegen. Dadurch, dass mittels der diffe-

rentiellen Zentrifugation überschüssige Bakterien aus den Reaktionsansätzen gewegewaschen worden sind, wurden in der FACS-Analyse nur GFP-exprimierende Bakterien detektiert, die innerhalb der initialen Inkubationszeit (3 min) von den Neutrophilen phagozytiert worden sind. Die Degradation von Bakterien und der damit verbundenen Termination der GFP-Produktion würde damit in der Messung einer niedrigeren Fluoreszenz resultieren. Eine andere Erklärung für die Reduktion der Zahl der GFP-positiven Zellen könnte das Sterben der Neutrophilen selbst sein. Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, dass, während der Anteil der GFP-positiven Zellen abgenommen hat, der Anteil der GFP-negativen Neutrophile proportional angestiegen ist. Auch die Vitalitätszählung der mit Trypan-Blau angefärbten Zellen wies nach 30 min keine verstärkte Sterberate der Neutrophile auf (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich daher vermuten, dass sowohl anti-Eno, anti-Oxo als auch anti-hp2160 Antikörper einen starken spezifischen opsonischen Effekt ausüben und damit zu Opsonophagozytose und gleichzeitiger Elimination von *S. aureus* führen.

#### **4.2.2 Immunisierung mit rEno, rOxo und rhp2160 führt zu einem protektiven Effekt gegen *S. aureus*-Infektion**

Der protektive Effekt von Eno, Oxo bzw. hp2160 als Angriffsziel für Vakzinierung gegen *S. aureus* wurde *in vivo* in einem murinen Sepsismodell untersucht. Die mit den individuellen Antigenen immunisierten C57/BL6 Mäuse entwickelten hohe Titer an spezifischen Antikörpern. Die anschließende Western Blot Analyse zeigte jedoch, dass, während die Immunisierung mit den affinitätsaufgereinigten rEno- und rhp2160-Proteinfraktionen ausschließlich zu Produktion von spezifischen anti-Eno bzw. anti-hp2160 Antikörpern geführt hat, die Immunisierung mit der rOxo-Proteinfraktion neben der Induktion von anti-Oxo Antikörpern die Produktion von Antikörper gegen das ca. 60 kDa große Nebenprodukt zufolge hatte. Auch wenn spezifische, höchstwahrscheinlich anti-GroEL IgGs im humanen Serum nicht natürlich vorzukommen scheinen, worauf die negative Immunofärbung mit IVIG schließen ließ, zeigte die Immunisierung mit der rOxo-Proteinfraktion, dass das 60 kDa Protein in höchstem Masse immunogen zu sein scheint. Ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt zur Elimination des Nebenproduktes aus der rOxo Proteinfraktion wäre damit von Vorteil gewesen, um ei-

ne Verfälschung der anti-rOxo Antikörpertiterbestimmung zu verhindern. Die anschließenden *S. aureus*-Infektionsstudien dürften jedoch von dem Vorhandensein *E. coli*-spezifischer Antikörper nicht negativ beeinflusst werden.

In der *S. aureus*-Infektionsstudie, in der der protektive Effekt der *S. aureus*-spezifischen IgGs ermittelt werden sollte, wurden die immunisierten Mäuse mit dem biolumineszierenden *S. aureus*-Stamm Xen29 infiziert und die Ausbreitung der Bakterien mittels *in vivo* Visualisierung (IVIS) durch Messung der Biolumineszenz an drei aufeinander folgenden Tagen analysiert. Im Gegensatz zu der traditionellen Bakteriendichte-Bestimmung, die nur eine punktuelle Aussage über eine Infektionsrate zulässt, ermöglicht IVIS die Analyse von Infektionsprozessen in einem individuellen Labortier in Echtzeit über einen längeren Zeitraum. Eigens dafür wurde der biolumineszente *S. aureus*-Stamm Xen 29 hergestellt, der sich durch die Integration eines modifizierten *Photobacterium luminescens lux* Operon auszeichnet. Damit ist das Bakterium sowohl in der Lage, das Luziferase Enzym als auch das Substrat zu exprimieren, was eine konstitutive Emission von Biolumineszenzsignalen ermöglicht, so lange das Bakterium metabolisch aktiv ist [110]. In einem Katheter-assoziierten Infektionsmodell konnte des Weiteren eine gute Korrelation zwischen den Biolumineszenzdaten und der Zahl der CFUs aus der Bakteriendichte-Bestimmung gezeigt werden [111].

In dieser Arbeit führte die Immunisierung mit den staphylokokkalen Antigenen zur Detektion von nur schwachen, über drei Tage gleichbleibenden Biolumineszenzsignalen mittels IVIS, während die Signalstärke in der Kontrollgruppe von Tag zu Tag kontinuierlich zunahm. Nach dem dritten Beobachtungstag wurde in der Kontrollgruppe eine um das 10fache höhere Biolumineszenz gemessen als in den Gruppen der mit den Antigenen immunisierten Mäuse. Da es sich bei einem Sepsis-Infektionsmodell um keine lokalbegrenzte Infektion handelt, sondern um einen bakteriellen Befall sämtlicher Organe und des Gewebes, basierte die indirekte Analyse der staphylokokkalen Infektionsrate auf der Messung der Gesamtbiolumineszenz, unabhängig von den jeweiligen Organen und ihrer Lage. Um zu untersuchen, ob die IVIS-Daten mit denen der Bakteriendichte-Bestimmung korrelieren, wurden im Anschluss an die letzte IVIS-Messung die Organe entnommen und die Bakteriendichte in Herz, Milz, Leber, Lunge und Niere mittels CFU-Auszählung bestimmt. Verglichen mit der Bakteriendichte in

den Organen der Kontrollmäuse, war auch bei der Bakteriendichte-Bestimmung in den Organen der mit den Antigenen immunisierten Mäuse eine deutliche Reduktion der CFU-Zahl zu beobachten. Die Reduktionsrate variierte jedoch stark abhängig von dem jeweiligen Organtyp. Während in bestimmten Organen, wie z. B. der Leber der rhp2160-Mäuse, ein bis zu 100facher Unterschied in der CFU-Zahl festzustellen war, wurde in der Niere der Mäuse eine 10fache Reduktion der staphylokokkalen Kolonisation beobachtet.

Sowohl IVIS als auch die Bakteriendichte-Bestimmung zeichnen sich durch bestimmte Vor- und Nachteile gegenüber der anderen Methode aus. Während IVIS die Verfolgung eines Infektionsprozesses in Echtzeit erlaubt, durch Messung der Biolumineszenz jedoch nur indirekt auf die Verbreitung der Bakterien und Besiedlung der Organe schließen lässt, ermöglicht die CFU-Bestimmung eine unmittelbare Aussage über die Kolonisationsrate in individuellen Organen. Die Kombination beider Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung des antibakteriellen Effektes von anti-Eno, -Oxo und -hp2160 Antikörpern zum Einsatz kam, ließ deutlich die Funktionalität der Antigene als potentielle Angriffsziele für Vakzinierung erkennen. Darüber hinaus führte die exemplarische Immunisierung mit rhp2160 zu einer deutlich höheren Überlebensrate der mit *S. aureus* infizierten Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Während 70% der mit rhp2160 immunisierten Mäuse die Infektion mit einer LD<sub>50</sub>-Dosis des stark virulenten *S. aureus* ATCC 29213 Stammes überlebten, war bei der Kontrollgruppe eine Überlebensrate von 40% zu beobachten. Eine Reproduzierbarkeit dieser exemplarischen Untersuchung muss allerdings noch gezeigt werden.

### **4.3 Impfstoff-Optimierung zur Prävention von *S. aureus*-Infektionen**

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer, staphylokokkaler Vakzine-kandidaten, die sich außer durch ihre Oberflächenlokalisierung gleichzeitig durch eine immunogene Wirkung auszeichnen. Mittels der hier durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Studien, konnte anhand der drei exemplarisch ausgewählten SUPRA-Kandidaten Eno, Oxo und hp2160, erfolgreich gezeigt werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit etablierte proteomanalytische Verfahren nicht nur

die Identifizierung immunogener sondern auch protektiver Vakzinekandidaten ermöglicht. Alle drei Proteinkandidaten induzieren spezifische Antikörper, die *in vitro* eine Opsonophagozytose von *S. aureus* vermitteln, und *in vivo* eine Reduktion der Kolonisationsrate und eine verringerte Mortalitätsrate der infizierten Mäusen erzielen. Allerdings, wie schon die vorangegangenen Vakzinierungsstudien, hauptsächlich mit LPXTG-Adhäsinen als Angriffsziel [58, 60-63], gezeigt haben, ist die Immunisierung mit einer monovalenten Vakzine nicht ausreichend, um eine staphylokokkale Infektion vollständig zu verhindern. Das Spektrum der *S. aureus*-Virulenzfaktoren, die sich häufig durch eine funktionelle Redundanz auszeichnen, ist zu groß, als dass das Ausschalten eines einzigen Virulenzfaktors die Pathogenität des Bakteriums entscheidend senken kann. Die Entwicklung einer polyvalenten Vakzine könnte die Lösung des Problems sein. Eine erst kürzlich erschienene Vakzinierungsstudie, in der erstmalig der protektive Effekt einer bivalenten Vakzine aus einer Fusion von Cna und FnBP untersucht wurde, zeigt jedoch deutlich, dass die Effektivität einer polyvalenten Vakzine nicht zuletzt von der Kombination der gewählten Vakzinierungsziele abhängt. Während die Immunisierung mit der Cna-FnBP-Fusion zu einer höheren Überlebensrate verglichen mit nicht-immunisierten Kontrollen führte, unterschied sich jedoch kaum von der Überlebensrate von Mäusen, die mit den individuellen Komponenten, Cna bzw. FnBP immunisiert wurden [75]. Wie von Lee *et al.* nachhaltig propagiert, liegt die Hoffnung in der Entwicklung einer effektiven Vakzine für die Prävention von *S. aureus*-Infektionen auf einer multivalenten Vakzine, die die Produktion von Antikörpern induziert, die gleichzeitig die bakterielle Adhäsion verhindern, Toxine neutralisieren sowie eine effektive Opsonophagozytose und damit die Elimination von Bakterien vermitteln [112]. Im Jahr 2006 erwies sich die Vakzinierung mit einem polyvalenten Kombipräparat von Stranger-Jones *et al.* als erfolgversprechender [83]. Von 19 LPXTG-Proteinen wurden die vier mit der höchsten immunogenen Aktivität ausgesucht (IsdA, IsdB, SdrD und SdrE) und zur Vakzinierung von Mäusen verwendet. Während SdrD und SdrE adhäsive Aktivität ausüben [113], sind Isd A und Isd B an der Translokation von Häm-gebundenem Eisen beteiligt [84]. Alle mit der polyvalenten Vakzine immunisierten Mäuse überlebten die anschließende Infektion mit *S. aureus*. Im Gegensatz dazu hatte die Immunisierung mit den individuellen Proteinen keinen nennenswerten Effekt auf das Über-

leben der Tiere. Die Infektion der vakzinierten Tiere mit dem am häufigsten auftretenden nosokomialen MRSA-Stamm, USA100, resultierte in einer 60%igen Überlebensrate der immunisierten Tiere, während die Kontrolltiere innerhalb von 36 h starben. Diese Studie zeigt deutlich, dass die Auswahl entsprechender Zielstrukturen zur Generierung einer polyvalenten Vakzine entscheidend zu deren Effektivität beiträgt.

Schon jetzt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass SUPRA ein neues, effektives Verfahren darstellt, um immunogene Vakzinekandidaten mit protektiver Wirkung zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels SUPRA 39, zum Teil neue Oberflächenkandidaten identifiziert, die als vielversprechende Vakzinekandidaten für die Entwicklung einer polyvalenten Vakzine angesehen werden können. Ferner ist die Anwendbarkeit von SUPRA nicht auf die Identifizierung von staphylokokkalen Vakzinekandidaten beschränkt, sondern kann auf andere bakterielle Spezies übertragen werden.

## 5. Zusammenfassung

*S. aureus* ist ein humanes, hauptsächlich nosokomial vorkommendes Pathogen, das aufgrund der stetig steigenden, weltweiten Prävalenz von multiresistenten Stämmen (MRSA) zunehmend an klinischer Relevanz gewinnt. Aufgrund der MRSA-Problematik ist die Entwicklung einer protektiven Vakzine für die Prävention von *S. aureus*-Infektionen von großer klinischer Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine intravenöse Immunglobulin G Präparation (IVIG) erfolgreich als Quelle für opsonisierende *S. aureus*-Antikörper eingesetzt, um neue, immunogene Vakzinekandidaten zu identifizieren. Zellwandassoziierte Proteine, die gezielt von IVIG erkannt werden, wurden mittels des hier etablierten Verfahrens der „Subtraktiven Proteomanalyse“ (SUPRA) identifiziert. Dabei galten Proteine als vielversprechende Vakzinekandidaten, die ausschließlich mit IVIG vor jedoch nicht nach der Depletion von *S. aureus*-spezifischen IgGs (dSaIVIG) immunreagierten. Die subtraktive Kandidatenauswahl führte schließlich zu der Identifizierung von 39 vielversprechenden Vakzinekandidaten. Drei der Proteinkandidaten, Enolase (Eno), Oxoacyl-Reduktase (Oxo) und das hypothetische Protein, hp2160 wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt und dienten zur Gewinnung von korrespondierende Antikörper aus IVIG mittels Affinitätschromatographie. Die affinitätsaufgereinigten anti-Eno, anti-Oxo und anti-hp2160 Antikörper zeigten eine ausgeprägte opsonische Aktivität, welche sowohl zur Phagozytose als auch zur Elimination von *S. aureus* durch humane Neutrophile führte. Die Immunisierung mit den rekombinanten Antigenen vermittelte die Produktion hoher Antikörpertiter. Nach Infektion mit *S. aureus* wurde mittels *in vivo* Visualisierung (IVIS) eine Reduktion der staphylokokkalen Ausbreitung in den immunisierten Mäuse beobachtet. Die Bakteriendichte-Bestimmung in den Organen infizierter Mäuse resultierte in einer 10-100fach niedrigeren CFU-Zahl in den Organen der immunisierten Mäuse. Die Immunisierung mit rhp2160 führte zu einer höheren Überlebensrate der Mäuse verglichen mit den Kontrollen. Die *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse zeigen, dass SUPRA ein geeignetes proteomisches Verfahren darstellt, um neue Angriffsziele für die Vakzinierung gegen *S. aureus* zu identifizieren.

## 6. Summary

*S. aureus* is an important human pathogen with an increasing clinical impact due to the extensive spread of antibiotic resistant strains. Therefore the development of a protective vaccine is of great clinical importance. An intravenous immunoglobulin G (IVIG) preparation was employed as a source of antibodies directed against *S. aureus* surface proteins for the identification of novel vaccine protein candidates. IVIG induced a strong opsonophagocytic activity of human neutrophils for *S. aureus*. In order to identify proteins that are targeted by IVIG, subtractive proteome analysis (SUPRA) of *S. aureus* cell wall-associated proteins was performed. Proteins solely reacting with IVIG, but not with IVIG depleted of *S. aureus*-specific opsonising antibodies (dSaIVIG), were assumed to serve as vaccine candidates. By this preselection method 39 promising vaccine candidates were identified using MALDI-TOF analysis. Three of these candidates, enolase (Eno), oxoacyl reductase (Oxo) and hypothetical protein (hp2160), were expressed as GST-fusion proteins, purified and used for the enrichment of corresponding IgGs from IVIG by affinity chromatography. Affinity purified anti-Eno, anti-Oxo and anti-hp2160 antibodies showed strong opsonising activity enabling uptake and killing of *S. aureus* by human neutrophils. High antibody responses were elicited in serum of mice immunised with recombinant antigens. After challenge with *S. aureus*, reduced staphylococcal spread was detected by *in vivo* imaging system. The recovery of *S. aureus* CFUs from organs of immunised mice was diminished by 10-100-fold. The immunisation with rhp2160 resulted in a higher survival rate in mice compared to the controlgroup. The results of this study suggest our approach to be a valuable tool for the identification of novel vaccine candidates.

---

## Referenzen

1. Laupland, K.B., et al., *Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections*. J Infect Dis, 2003. **187**(9): p. 1452-9.
2. Naimi, T.S., et al., *Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Jama, 2003. **290**(22): p. 2976-84.
3. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus infections*. N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 520-32.
4. Arvidson, S. and K. Tegmark, *Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol, 2001. **291**(2): p. 159-70.
5. Ladhani, S., et al., *Staphylococcal scalded skin syndrome: exfoliative toxin A (ETA) induces serine protease activity when combined with A431 cells*. Acta Paediatr, 1999. **88**(7): p. 776-9.
6. Tomita, T. and Y. Kamio, *Molecular biology of the pore-forming cytolysins from Staphylococcus aureus, alpha- and gamma-hemolysins and leukocidin*. Biosci Biotechnol Biochem, 1997. **61**(4): p. 565-72.
7. Micusan, V.V. and J. Thibodeau, *Superantigens of microbial origin*. Semin Immunol, 1993. **5**(1): p. 3-11.
8. Herman, A., et al., *Identification of the staphylococcal enterotoxin A superantigen binding site in the beta 1 domain of the human histocompatibility antigen HLA-DR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 9954-8.
9. Jin, T., et al., *Staphylococcus aureus resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1169-76.
10. Sieprawska-Lupa, M., et al., *Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-derived proteinases*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(12): p. 4673-9.
11. O'Riordan, K. and J.C. Lee, *Staphylococcus aureus capsular polysaccharides*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 218-34.
12. Crossley, K.B. and G.L. Archer, *The staphylococci in human disease*. 1997, Churchill Livingstone Inc. New York.
13. Foster, T.J. and M. Hook, *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol, 1998. **6**(12): p. 484-8.
14. Patti, J.M., et al., *MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 585-617.
15. Kronvall, G. and K. Jonsson, *Receptins: a novel term for an expanding spectrum of natural and engineered microbial proteins with binding properties for mammalian proteins*. J Mol Recognit, 1999. **12**(1): p. 38-44.
16. Uhlen, M., et al., *Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications*. J Biol Chem, 1984. **259**(3): p. 1695-702.
17. Roche, F.M., et al., *Characterization of novel LPXTG-containing proteins of Staphylococcus aureus identified from genome sequences*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 3): p. 643-54.

18. Foster, S.J., *Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of Staphylococcus aureus 8325/4*. J Bacteriol, 1995. **177**(19): p. 5723-5.
19. Heilmann, C., et al., *The multifunctional Staphylococcus aureus autolysin aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4793-802.
20. Carneiro, C.R., et al., *Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of Staphylococcus aureus*. Microbes Infect, 2004. **6**(6): p. 604-8.
21. Molkanen, T., et al., *Enhanced activation of bound plasminogen on Staphylococcus aureus by staphylokinase*. FEBS Lett, 2002. **517**(1-3): p. 72-8.
22. Palma, M., A. Hagggar, and J.I. Flock, *Adherence of Staphylococcus aureus is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity*. J Bacteriol, 1999. **181**(9): p. 2840-5.
23. Lee, L.Y., et al., *The Staphylococcus aureus Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1461-71.
24. Bohach, G.A., et al., *Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses*. Crit Rev Microbiol, 1990. **17**(4): p. 251-72.
25. Marrack, P. and J. Kappler, *The staphylococcal enterotoxins and their relatives*. Science, 1990. **248**(4959): p. 1066.
26. Patel, A.H., et al., *Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of Staphylococcus aureus isolated by allele replacement*. Infect Immun, 1987. **55**(12): p. 3103-10.
27. Portoles, M., et al., *Staphylococcus aureus Cap50 has UDP-ManNAc dehydrogenase activity and is essential for capsule expression*. Infect Immun, 2001. **69**(2): p. 917-23.
28. Wu, P.Z., et al., *Effects of alpha-toxin-deficient Staphylococcus aureus on the production of peripheral corneal ulceration in an animal model*. Curr Eye Res, 2005. **30**(1): p. 63-70.
29. Peacock, S.J., et al., *Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of Staphylococcus aureus to resting human endothelial cells*. Microbiology, 1999. **145** (Pt 12): p. 3477-86.
30. Darouiche, R.O., et al., *Role of Staphylococcus aureus surface adhesins in orthopaedic device infections: are results model-dependent?* J Med Microbiol, 1997. **46**(1): p. 75-9.
31. McElroy, M.C., et al., *Increased virulence of a fibronectin-binding protein mutant of Staphylococcus aureus in a rat model of pneumonia*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3865-73.
32. Jevons, M., *'Celebenin' resistant staphylococci*. British Medical Journal, 1961. **1**: p. 124 -125.
33. Acar, J.F., P. Courvalin, and Y.A. Chabbert, *Methicillin-resistant staphylococemia: bacteriological failure of treatment with cephalosporins*. Antimicrobial Agents Chemother, 1970. **10**: p. 280-5.
34. Shanson, D.C., J.C. Kensit, and R. Duke, *Outbreak of hospital infection with a strain of Staphylococcus aureus resistant to gentamicin and methicillin*. Lancet, 1976. **2**(7999): p. 1347-8.

- 
35. Aucken, H.M., et al., *A new UK strain of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics*. J Antimicrob Chemother, 2002. **50**(2): p. 171-5.
  36. Tenover, F.C., J.W. Biddle, and M.V. Lancaster, *Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(2): p. 327-32.
  37. Tenover, F.C., et al., *Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(4): p. 1020-7.
  38. Hiramatsu, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility*. J Antimicrob Chemother, 1997. **40**(1): p. 135-6.
  39. (CDC), C.f.D.C.a.P., *Staphylococcus aureus resistant to vancomycin--United States, 2002*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2002. **51**(26): p. 565-7.
  40. Chang, S., et al., *Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the vanA resistance gene*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1342-7.
  41. Tenover, F.C., et al., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from a patient in Pennsylvania*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1): p. 275-80.
  42. Hiramatsu, K., *Vancomycin resistance in staphylococci*. Drug Resist Updat, 1998. **1**(2): p. 135-50.
  43. Palavecino, E., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections*. Clin Lab Med, 2004. **24**(2): p. 403-18.
  44. *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004*. Am J Infect Control, 2004. **32**(8): p. 470-85.
  45. Cosgrove, S.E., et al., *The impact of methicillin resistance in Staphylococcus aureus bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2005. **26**(2): p. 166-74.
  46. Diekema, D.J., et al., *Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999*. Clin Infect Dis, 2001. **32** Suppl 2: p. S114-32.
  47. Greenberg, D.P., J.I. Ward, and A.S. Bayer, *Influence of Staphylococcus aureus antibody on experimental endocarditis in rabbits*. Infect Immun, 1987. **55**(12): p. 3030-4.
  48. Giese, M.J., et al., *The effect of Staphylococcus aureus phage lysate vaccine on a rabbit model of staphylococcal blepharitis, phlyctenulosis, and catarrhal infiltrates*. Am J Ophthalmol, 1996. **122**(2): p. 245-54.
  49. Poutrel, B., et al., *Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among Staphylococcus aureus isolates from cow, goat, and ewe milk*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(1): p. 38-40.
  50. Fattom, A., et al., *Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to Pseudomonas aeruginosa exotoxin A*. Infect Immun, 1990. **58**(7): p. 2367-74.
-

51. Nemeth, J. and J.C. Lee, *Antibodies to capsular polysaccharides are not protective against experimental Staphylococcus aureus endocarditis*. Infect Immun, 1995. **63**(2): p. 375-80.
52. Lee, J.C., et al., *Protective efficacy of antibodies to the Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats*. Infect Immun, 1997. **65**(10): p. 4146-51.
53. Fattom, A.I., et al., *A Staphylococcus aureus capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge*. Infect Immun, 1996. **64**(5): p. 1659-65.
54. Shinefield, H., et al., *Use of a Staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis*. N Engl J Med, 2002. **346**(7): p. 491-6.
55. Fattom, A., et al., *Safety and immunogenicity of a booster dose of Staphylococcus aureus types 5 and 8 capsular polysaccharide conjugate vaccine (StaphVAX) in hemodialysis patients*. Vaccine, 2004. **23**(5): p. 656-63.
56. Benjamin, D.K., et al., *A blinded, randomized, multicenter study of an intravenous Staphylococcus aureus immune globulin*. J Perinatol, 2006. **26**(5): p. 290-5.
57. Adlam, C., et al., *Effect immunization with highly purified alpha- and beta-toxins on staphylococcal mastitis in rabbits*. Infect Immun, 1977. **17**(2): p. 250-6.
58. Mamo, W., et al., *Vaccination against Staphylococcus aureus mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with S. aureus*. Vaccine, 1994. **12**(11): p. 988-92.
59. Menzies, B.E. and D.S. Kernodle, *Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from Staphylococcus aureus is protective in a murine model*. Infect Immun, 1996. **64**(5): p. 1839-41.
60. Greenberg, D.P., et al., *Protective efficacy of protein A-specific antibody against bacteremic infection due to Staphylococcus aureus in an infant rat model*. Infect Immun, 1989. **57**(4): p. 1113-8.
61. Schennings, T., et al., *Immunization with fibronectin binding protein from Staphylococcus aureus protects against experimental endocarditis in rats*. Microb Pathog, 1993. **15**(3): p. 227-36.
62. Nilsson, I.M., et al., *Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against Staphylococcus aureus-mediated septic death*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2640-9.
63. Hall, A.E., et al., *Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing Staphylococcus aureus MSCRAMM protein clumping factor A*. Infect Immun, 2003. **71**(12): p. 6864-70.
64. Weems, J.J., Jr., et al., *Phase II, randomized, double-blind, multicenter study comparing the safety and pharmacokinetics of tefibazumab to placebo for treatment of Staphylococcus aureus bacteremia*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(8): p. 2751-5.
65. Novick, R.P., *Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence*. Mol Microbiol, 2003. **48**(6): p. 1429-49.

- 
66. Novick, R.P., et al., *The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet, 1995. **248**(4): p. 446-58.
  67. Novick, R.P., et al., *Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule*. Embo J, 1993. **12**(10): p. 3967-75.
  68. Antelmann, H., et al., *Stabilization of cell wall proteins in Bacillus subtilis: a proteomic approach*. Proteomics, 2002. **2**(5): p. 591-602.
  69. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2): p. 368-79.
  70. Shevchenko, A., et al., *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. Anal Chem, 1996. **68**(5): p. 850-8.
  71. Granato, D., et al., *Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of Lactobacillus johnsonii NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2160-9.
  72. Brouillette, E., et al., *DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of Staphylococcus aureus*. Vaccine, 2002. **20**(17-18): p. 2348-57.
  73. Fattom, A.I., et al., *Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against S. aureus infection: from the lab bench to phase III clinical trials*. Vaccine, 2004. **22**(7): p. 880-7.
  74. Mamo, W., G. Froman, and H.P. Muller, *Protection induced in mice vaccinated with recombinant collagen-binding protein (CnBP) and alpha-toxoid against intramammary infection with Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol, 2000. **44**(5): p. 381-4.
  75. Zhou, H., et al., *An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against Staphylococcus aureus infections in a mice model*. Vaccine, 2006. **24**(22): p. 4830-7.
  76. Projan, S.J., M. Nesis, and P.M. Dunman, *Staphylococcal vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream?* Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(5): p. 473-9.
  77. Shannon, O. and J.I. Flock, *Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from Staphylococcus aureus binds to platelets and inhibits platelet aggregation*. Thromb Haemost, 2004. **91**(4): p. 779-89.
  78. Clarke, S.R., et al., *Analysis of Ehb, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6680-7.
  79. Corrigan, R.M., et al., *The role of Staphylococcus aureus surface protein SasG in adherence and biofilm formation*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 8): p. 2435-46.
  80. Maione, D., et al., *Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen*. Science, 2005. **309**(5731): p. 148-50.
  81. Mora, M., et al., *Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15641-6.
  82. Giuliani, M.M., et al., *A universal vaccine for serogroup B meningococcus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(29): p. 10834-9.

- 
83. Stranger-Jones, Y.K., T. Bae, and O. Schneewind, *Vaccine assembly from surface proteins of Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16942-7.
  84. Mazmanian, S.K., et al., *Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus*. Science, 2003. **299**(5608): p. 906-9.
  85. Clarke, S.R., M.D. Wiltshire, and S.J. Foster, *IsdA of Staphylococcus aureus is a broad spectrum, iron-regulated adhesin*. Mol Microbiol, 2004. **51**(5): p. 1509-19.
  86. Modun, B. and P. Williams, *The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Infect Immun, 1999. **67**(3): p. 1086-92.
  87. Vytvytska, O., et al., *Identification of vaccine candidate antigens of Staphylococcus aureus by serological proteome analysis*. Proteomics, 2002. **2**(5): p. 580-90.
  88. Dryla, A., et al., *Comparison of antibody repertoires against Staphylococcus aureus in healthy individuals and in acutely infected patients*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(3): p. 387-98.
  89. Gauduchon, V., et al., *Neutralization of Staphylococcus aureus Panton Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro*. J Infect Dis, 2004. **189**(2): p. 346-53.
  90. Schlievert, P.M., *Use of intravenous immunoglobulin in the treatment of staphylococcal and streptococcal toxic shock syndromes and related illnesses*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4 Suppl): p. S107-10.
  91. Vernachio, J., et al., *Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in an experimental model of infective endocarditis*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(11): p. 3400-6.
  92. Vernachio, J.H., et al., *Human immunoglobulin G recognizing fibrinogen-binding surface proteins is protective against both Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections in vivo*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(2): p. 511-8.
  93. Ono, Y., et al., *Opsonic activity assessment of human intravenous immunoglobulin preparations against drug-resistant bacteria*. J Infect Chemother, 2004. **10**(4): p. 234-8.
  94. Lamari, F., et al., *Monitoring of two intravenous immunoglobulin. Preparations for immunoglobulin G subclasses and specific antibodies to bacterial surface antigens and relation with their levels in treated immunodeficient patients*. J Pharm Biomed Anal, 2000. **22**(6): p. 1029-36.
  95. Komatsuzawa, H., et al., *Subcellular localization of the major autolysin, ATL and its processed proteins in Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol, 1997. **41**(6): p. 469-79.
  96. McGavin, M.H., et al., *Identification of a Staphylococcus aureus extracellular matrix-binding protein with broad specificity*. Infect Immun, 1993. **61**(6): p. 2479-85.
  97. Lopez, J.E., et al., *Identification of novel antigenic proteins in a complex Anaplasma marginale outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8109-18.
  98. Schaumburg, J., et al., *The cell wall subproteome of Listeria monocytogenes*. Proteomics, 2004. **4**(10): p. 2991-3006.
  99. Gatlin, C.L., et al., *Proteomic profiling of cell envelope-associated proteins from Staphylococcus aureus*. Proteomics, 2006. **6**(5): p. 1530-49.
-

- 
100. Vaughan, T.E., et al., *Proteomic analysis of Neisseria lactamica and Neisseria meningitidis outer membrane vesicle vaccine antigens*. Vaccine, 2006. **24**(25): p. 5277-93.
  101. Severin, A., et al., *Proteomic analysis and identification of Streptococcus pyogenes surface-associated proteins*. J Bacteriol, 2007. **189**(5): p. 1514-22.
  102. Bergmann, S., et al., *alpha-Enolase of Streptococcus pneumoniae is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface*. Mol Microbiol, 2001. **40**(6): p. 1273-87.
  103. Sellman, B.R., et al., *Identification of immunogenic and serum binding proteins of Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6591-600.
  104. Keresztessy, Z., et al., *Co-purification from Escherichia coli of a plant beta-glucosidase-glutathione S-transferase fusion protein and the bacterial chaperonin GroEL*. Biochem J, 1996. **314** (Pt 1): p. 41-7.
  105. Rohman, M. and K.J. Harrison-Lavoie, *Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins*. Protein Expr Purif, 2000. **20**(1): p. 45-7.
  106. Thain, A., et al., *A method for the separation of GST fusion proteins from co-purifying GroEL*. Trends Genet, 1996. **12**(6): p. 209-10.
  107. Hemmingsen, S.M., et al., *Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly*. Nature, 1988. **333**(6171): p. 330-4.
  108. Ellis, R.J. and S.M. van der Vies, *Molecular chaperones*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 321-47.
  109. Ewalt, K.L., et al., *In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system*. Cell, 1997. **90**(3): p. 491-500.
  110. Francis, K.P., et al., *Monitoring bioluminescent Staphylococcus aureus infections in living mice using a novel luxABCDE construct*. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3594-600.
  111. Kadurugamuwa, J.L., et al., *Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model*. Infect Immun, 2003. **71**(2): p. 882-90.
  112. Lee, J.C., *The prospects for developing a vaccine against Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol, 1996. **4**(4): p. 162-6.
  113. Josefsson, E., et al., *Three new members of the serine-aspartate repeat protein multi-gene family of Staphylococcus aureus*. Microbiology, 1998. **144** (Pt 12): p. 3387-95.

## Anhang

Vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der mittels SUPRA identifizierten Vakzinekandidaten von *S. aureus*.

### gi|15927930: hypothetical protein, similar to esterase (hp2160)

GeneID: [1125068](#)

```

1   ttgattagaa accgtgttat gaatagcggt gtcaataaat atttgcttca caatcgctcg
61  attatgttta aaaatgatca agatgttgaa agattttttt ataaaagaga aattgaaaat
121 agaaaaaac ataagcagcc ttcaacatta aatgttaaag caaatttaga aaaattatca
181 ttagatgata tgcaagtctt tcgctttaat ttcagacatc aaattgataa gaaaatttta
241 tatattcacg gtggattcaa tgcactacaa ccatcaccgt tccattggag attgttggat
301 aaaatcactt taagtacatt atatgaggtt gtactgccta tctatccaaa gaccaccagag
361 tttcatattg acgatacttt ccaagcgata caacgtgttt atgatcaatt agtatctgaa
421 gtaggacatc aaaatgtcgt agtcatgggt gatggttcag gtgggtgact ggcattatcc
481 tttgtacaat ctctttttaga taatcaacag ccattaccga ataaattgta tttaatctca
541 ccaattttag atgcaacact atctaataaa gatatttcgg acgccttaat cgaacaagat
601 cgggttctaa gtcagtttgg tgtcaatgag attatgaaaa aatggggcga tggcctacca
661 ttaacagata agcgcataat gccaattaat ggcacaatag aaggattgcc accagtttat
721 atgtttgggt gtggacgtga aatgacacat cctgatatga agctattcga acaaatgatg
781 ttgcaacatc atcaatacat tgagttttat gattatccta agatggtaca tgattttcca
841 atttatccaa ttagacaatc acataagct attaaacaaa ttgccaatc gatagatgag
901 gatgtaacac aaataacta a

```

ProteinID: [NP\\_375463.1](#)

MIRNRVMNSVVKYLLHNRSIMFKNDQDVERFFYKREIENRKKHKQPSTLNVKANLEKLSLDDMQVFRFRHQIDKK  
 ILYIHGGFNALQSPFFHWRLLDKITLSTLYEVVLPYIPKTPFEHIDDTFQAIQRVYDQLVSEVGHQNVVVMGDGSGGA  
 LALSFVQSLLDNQQLPNKLYLISPIILDATLSNKDISDALIEQDAVLSQFGVNEIMKKWANGPLPTDKRISPINGTIE  
 GLPPVYMFGGGREGMTHPDMKLFQMLLQHHQYIEFYDYPKMVHDFPIYPIRQSHKAIKQIAKSIDEDVTQNN

### gi|15926453: enolase (Eno)

GeneID: [1123539](#)

```

1   atgccaatta ttacagatgt ttacgctcgc gaagtcttag actctcgtgg taaccaact
61  gttgaagtag aagtattaac tgaaagtggc gcatttggtc gtgcattagt accatcaggt
121 gcttcaactg gtgaacacga agctgttgaa ttacgtgatg gagacaaatc acgttattta
181 ggtaaagtggt ttactaaagc agttgaaaac gttaatgaaa tcatcgcacc agaaattatt
241 gaaggtgaat tttcagtatt agatcaagta tctattgata aaatgatgat cgcattagac
301 ggtactccaa acaaaggtaa attagtgca aatgctattt taggtgtatc tatcgcagta
361 gcacgtgcag cagctgactt attaggtcaa ccactttaca aatatttagg tggatttaat
421 ggtaagcagt taccagtacc aatgatgaac atcggttaat gtggttctca ctacagatgct
481 ccaattgcat tccaagaatt catgatttta cctgtaggtg ctacaacggt caaagaatca
541 ttacgttggg gtactgaaat ttccacaac ttaaaatcaa tttaagcaa acgtggttta
601 gaaactgcag tagtgacga aggtggttcc gctcctaaat ttgaaggta tgaagatgct
661 gttgaaacaa ttatccaagc aatcgaagca gctggttaca aaccagggtga agaagtattc
721 ttaggatttg actgtgcac atcagaattc tatgaaaatg gtgtatatga ctacagtaag
781 ttcgaaggcg aacacgggtgc aaaacgtaca gctgcagaac aagttgacta cttagaacia
841 ttagtagaca aatcctcat cattacaatt gaagacggta tggacgaaa cgactgggat
901 ggttggaaac aacttacaga acgtatcggg gaccgtgtac aattagtagg tgacgattta
961 ttcgtaacaa aactgaaat tttagcaaaa ggtattgaaa acggaattgg taactcaatc
1021 ttaattaaag ttaacaaat cggtacatta actgaaacat ttgatgcaat cgaatggct
1081 caaaaagctg gttacacagc agtagtttct caccgttcag gtgaaacaga agatacaaca
1141 attgctgata ttgctgttgc tacaacgct ggtcaaatta aaactgggtc attatcacgt
1201 actgaccgta ttgctaaata caatcaatta ttacgtatcg aagatgaatt atttgaact
1261 gctaaatgat acggtatcaa atcattctat aacttagata aataa

```

ProteinID: [NP\\_373986.1](#)

MPIITDVYAREVLDSRGNPTVEVEVLTESGAFGRALVPSGASTGEHEAVELRDGDKSRYLGKGVTKAVENVNEIIAPE  
 IIEGEFVLDQVSIKMMIALDGTPNKKGKLGANAILGVSIAVARAAADLLGQPLYKYLGGFNGKQLPVPMMNIVNGGS  
 HSDAPIAFQEFMILPVGATTFKESLRWGTEIFHNLSILSKRGLETAVGDEGGFAPKFEGTEDAVETIIQAIIEAAGYK  
 PGEVFLGFDACSEFYENGVYDYSKFEGEHAKRTAAEQVDYLEQLVDKYPITITIEDGMENDWDGWKQLTERIGDR  
 VQLVGGDLFVNTTEILAKGIENGIENSILIKVNQIGTLETETFDIEMAQRAGYTAVVSHRSGETEDTTIADIIVATNA  
 GQIKTGSLSRDRIAKYNQLLRIEDELFEFETAKYDGIKSYFNLDK

**gi|15926814: 3-oxoacyl-reductase, acyl-carrier protein (Oxo)**GeneID: [1123905](#)

```

1   atgaaaatga ctaagagtgc tttagtaaca ggtgcatcaa gaggaattgg acgtagtatt
61  gcgttacaat tagcagaaga aggatataat gtagcagtaa actatgcagg cagcaaagag
121 aaagctgaag cagtagtoga aagaatcaaa gctaaagggtg ttgacagttt tgcgattcaa
181 gcaaatgttg ccgatgctga tgaagttaaa gcaatgatta aagaagtagt tagccaattt
241 ggttctttag atgttttagt aaataatgca ggtattactc gcgataattt attaatgcgt
301 atgaaagaac aagagtggga tgatgttatt gacacaaact taaaagggtg atttaactgt
361 atccaaaaag caacaccaca aatgttaaga caacgtagtg gtgctatcat caatttatca
421 agtgttggtg gagcagtagg taatccggga caagcaaact atggtgcaac aaaagcaggt
481 gttattgggt taactaaatc tgcggcgcgt gaattagcat ctcgtggtat cactgtaaat
541 gcagttgcac ctggttttat tgtttctgat atgacagatg cttaagtga tgagttaaa
601 gaacaaatgt tgactcaaat tccgtaggca cgttttggtc aagacacaga tattgctaata
661 acagtagcgt tcttagcatc agacaaagca aaatatatta cagggtcaaac aatccatgta
721 aatggtgga tgtacatgta a

```

ProteinID: [NP\\_374347.1](#)

MKMTKSALVTGASRIGRSIALQLAEEGYNAVNYAGSKEKAEAVVEEIKAKGVDSFAIQANVADADEVKAMIKEVVS  
 QFGSLDLVNNAGITRDNLLMRMKEQEWDDVIDTNLKGVFNCIQKATPQMLRQRSGAIINLSSVVGAVGNPQANYVA  
 TKAGVIGLTKSAARELASRGITVNAVAPGFIVSDMTDALSDELKEQMLTQIPLARFGQDIDIANTVAFLASDKAKYIT  
 GQTIHVNGMYM

**gi|15926530: hypothetical protein, similar to NADH dehydrogenase**GeneID: [1123617](#)

```

1   atggctcaag atcgtaaaaa agtacttgta cttggtgctg gttatgcagg tttacaaact
61  gtaactaaat tgcaaaaagc gatatcaaca gaagaagcag aaattacgct tattaataaa
121 aatgaatata actatgaagc aacatgggta catgaagcat cagcaggtag actaaactat
181 gaagatgtat tataatcctgt ggaaagtgtc ttgaagaaag acaaagtga ctttgttcaa
241 gcagaagtaa caaaaattga ccgtagtgct aaaaaggtag aaacaaatca aggtatttat
301 gactttgata ttttagtagt agcattaggt ttcgtagtag aaacattcgg catcgaaggt
361 atgaaagatc atgctttcca aattgaaaa gttatcacag cacgtgaatt atcacgtcat
421 atcgaagaca aatttgctaa ctatgcagca tcaaaaagaa aagatgataa cgatttatct
481 atcttagttg gtggtgctgg attcactggt gttgaattct taggtgaatt aacagacaga
541 atctctgaat tatgtagcaa atatggtggt gatcaaaaata aagttaaaat cacttgtggt
601 gaagcagcac ctaaaatggt accaatgttc tcagaagaat tagttaacca cgcagttagc
661 tacttagaag accgcggtgt tgaatttaaa attgctacac caatcgttgc ttgtaacgaa
721 aaaggttttg tagttgaagt agatggtgaa aaacaacaat taaatgcagg tacttcagta
781 tgggcagctg gtgtacgtgg tagtaaaata atggaagaat catttgaagg cgttaaacgt
841 ggacgtatcg ttacaaagca agatttaaca atcaatggtt acgacaacat tttgttatt
901 ggtgactggt cagcgtttat ccagctgga gaagaacgtc cattaaccaac taccagacaa
961 attgcaatgc aacaagggtga aagtgttgct aaaaacatta aacgcattct aaacggtgaa
1021 tcaactgaag aattcgaata tggtgatcgt ggaactggtt gttctttagg ttcacatgac
1081 ggtgtaggta tggtatttgg taaacctatc gctggtaaaa aagcagcatt catgaaaaaa
1141 gtgattgata cacgtgcggt attcaaaatc ggtggtatcg gtttagcatt caaaaagggt
1201 aaattctag

```

ProteinID: [NP\\_374063.1](#)

MAQDRKKVLVLGAGYAGLQTVTKLQKAISTEEAEITLINKNEYHYEATWLHEASAGTLNYEDVLYPVESVLKDKVNF  
 VQAEVTKIDRDAKKVETNQGIYDFDILVVALGFVSETFGIEGMDHAFQIENVITARELSRHIEDKFANYAASKEKDD  
 NDLSILVGGAGFTGVEFLGELTDRIPELCSKYGVDQNKVKITCVEAAPKMLPMFSEELVNHAVSYLEDGRGVEFKIATP  
 IVACNEKGFVVEVDGEKQQLNAGTSVWAAGVRGSKLMEESFEGVKGRIIVTKQDLTINGYDNIFVIGDCSAFIPAGEE  
 RPLPTTAQIAMQOGESVAKNIKRILNGESTEEFEYVDRGTVCSLGS HDGVMVFGKPIAGKKA AFMKKVIDTRAVFKI  
 GGIGLAFKKGKF

**gi|15926396: hypothetical protein, similar to anion-binding protein**GeneID: [1123481](#)

```

1   atgagttcac aaaaaaagaa aattagtctt tttgcgttct tcttattaac cgtaataacg
61  attaccttga agacgtatct ttcttattat gttgattttt ctttaggtgt taaaggttta
121 gtacaaaact taatattatt gatgaatcct tatagtttag tagcactggt ttaagtgtg
181 ttctattct ttaaaggcaa aaaagcattt tggttcatgt tcataggcgg cttcttattg
241 acgttcctat tataagccaa tgttgtgtac ttttagattct tctctgattt ttaacgtttt
301 agtactttaa accaagtagg taacgtagaa tctatgggtg gtgctggttag tgcattcattc
361 aaatggtagt actttgttta tttcattgat acgttagttt acttattcat ttaataattt
421 aaaacaaaat ggtagacac aaaagcattt agtaagaaat ttgttctgt cgtaatggca
481 gttcagtag cattattctt cttaaacctta gcttttgctg aaactgacag accagaatta
541 ttaacacgta catttgacca taaatattta gtgaaatatt taggacctta taactttaca
601 gtatacagat gtgttaaaac tatcgaaaat aatcaacaaa aagcgttagc atctgaagat

```

```

661 gacttaacaa aagtattaaa ttatacgaaa caacgtcaaa cagagcctaa cccagaatat
721 tatgggggtg caaagaagaa aaatattatt aagattcatt tagaaagttt ccaaacttc
781 ttaattaata aaaagggttaa tggtaaagaa gtaacaccgt ttttaacaa attatcaagt
841 gggaaagagc aattcacata cttccctaac tttttccatc aaacagggtca aggtaaaaca
901 tctgactctg aatttacaat ggataacagt ttatacgggt taccgcaagg ttctgccttt
961 tcattaaaag gagataatac gtatcagtc taccagcaa ttttagatca aaagcaaggg
1021 taaaaatctg atgtcatgca cggtgactat aaaacattct ggaacagaga ccaagtatat
1081 aaacactttg gtatcgataa attctatgat gcaacatact atgacatgtc agataaaaaac
1141 gttgtaaact taggcttgaa agacaaaatt ttctttaaag attctgctaa ttatcaagct
1201 aagatgaaat caccattcta ttctcattta attacattga ctaaccacta tccattcaca
1261 ttgatgaaa aggatgagc tattgagaag tcaaacacag gtgatgcaac agttgatggt
1321 tatattcaa cagcgcggtt tttagacgaa gcattagaag aatatattaa tgacttgaag
1381 aaaaaaggat tatatgacaa ttcagtgatt atgatttatg gtgaccacta tggatctct
1441 gaaaaccata acaatgccat ggaaaaacta ttaggtgaaa aaatcacacc agctaaattt
1501 acagatttaa acagaactgg tttctggatt aaaatccctg gtaaatctgg tggatcaat
1561 aatgaatag ctggtcaagt cgatgtaatg ccaacaattt tacatttggc tggatagat
1621 acgaagaatt atttaagtgt cggtagctat ttattctcta aaggtcataa tcaagtatgt
1681 ccattcagaa atggtgactt tataacaaaa gattataaat atgttaatgg taagatttat
1741 tctaataaaa ataatgaact cataactact caaccagctg atttcgaaaa gaataaaaag
1801 caagttgaaa aggatctcga aatgagtgc aacgtgctta atggtgattt gtttagattc
1861 taaaaaatc cagacttcaa aaaggtaaat ccttcgaagt ataaatatga aacaggacct
1921 aaagcaaac ctaaaaata a

```

ProteinID: [NP\\_373929.1](#)

MSSQKKKISLFAFFLLTVITITLKYFYSYVDFSLGVKGLVQNLILLMNPYSLVALVLSVFLFFKGGKAFWFMFIGGF  
LLTFLLYANVVYFRFFSDFLTFSTLNQVGNVESMGGAVSASFQWYDFVYFIDTLVYLFILIFKTKWLDTKAFSKKFPV  
VMAASVALFFLNLAFAETDRPELLTRTFDHKYLKYLGPYNFTVYDGVKTIENNQKALASEDDLTKVLYNTKQRQT  
EPNPEYGVAKKNI IKIHLESFQTFLINKVNGKEVTFPLNKLSSGKEQFTYFPNFHQGTGKTSDEFTMDNSLY  
GLPQGSASFSLKGDNTYQSLPAILDQKQGYKSDVMHGDYKTFWNRDQVYKHFIDKFYDATYYDMSDKNVNVLGLKDKI  
FFKDSANYQAKMKS PFYSHLITLTHNYPFTLDEKDATIEKSNTGDATVDGYIQTARYLDEALEEYINDLKKKGLYDNS  
VIMIYGDHYGISENHNNAMEKLLGEKITPAKFTDLNRGTGFWIKIPGKSGGINNEYAGQVDVMPITLHLAGIDTKNYLM  
FGTDLFSKGNQVVPFRNGDFITKDYKYVNGKIYSNKNNELITTPADFEKNKKQVEKLEMSDNVNLGDLFRFYKNP  
DFKKVNP SKYKYETGPKANSK

#### gi|2239274: peptidoglycan hydrolase

GeneID: [3236682](#)

```

1 atggagatg tttatacat gaaaaaatta acagcagcag cgattgcaac gatgggcttc
61 gctacattta caatggcgca tcaagcagat gcagcagaaa cgacaaacac ccaacaagca
121 catacaciaa tgtcaacaca atcacaagac gtatcttatg gtacttatta tacaattgat
181 tctaattggg attatcatca cacacctgat ggtaactgga atcaagcaat gtttgataat
241 aaagaatata gctatacatt cgtagatgct caaggacata cgcattattt ttataactgt
301 tatccaaaaa atgcaaatgc caatggaagc ggccaaacat atgtgaatcc agcaacagca
361 ggagataaca atgactacac agcgagtcaa agccaacagc atattaatca atatggttat
421 caatcaaatg taggtccaga cgcgagctat tattcacata gtaacaacia ccaagcgtat
481 aacagccatg atggtaatgg aaagggtcaat tatcctaata gcacatctaa tcaaatggtt
541 cgatcagcaa gtaaagcgac agctagtggt catgcaaaa acgcaagctg gtaacaagt
601 gtaaaacac tacaaccata tggcaatat cacggtggtg gtgcgcatta cgggtgcgac
661 tatgcaatgc ctgaaaattc accagtttac tcattaactg atggtacagt agtacaagca
721 ggttgagta actatggtgg cggcaatcaa gtaacgatta aagaagcgaa cagtaatac
781 taccaatggt atatgataa taatcgttta actgtttcag ctggtgataa agtcaagct
841 ggtgacaaa ttgcatattc aggtagtacg ggtaattcaa cagcgctca cgtacactc
901 caacgtatgt ctggtggcat cgtaaatcaa tatgcagtag acccaacgct atacttgcga
961 agtagataa

```

ProteinID: [AAB62278.1](#)

MEDVLYMKKLTAAA IATMGFATFTMAHQADAAETTNTQQAHTQMSTQSQDVSYGTYTIDSNGDYHHTPDGNWNQAMF  
DNKEYSYTFVDAQGHYFYNCYPKNANANGSGQTYVNPATAGDNDYDASQSQHINQYGYQSNVGPDASYSYSHSN  
NQAYNSHDGNGKVNYPNGTSNQNGGSASKATASGHAKDASWLSRKLQPYGQYHGGGAHYGVDYAMPENSPVYSLTD  
GTVVQAGWSNYGGGNQVTIKEANSNNYQWYHNNRLTVSAGDKVKAGDQIAYS GSTGNSTAPHVHFQRMSSGGIGNQYA  
VDPTS YLQSR

#### gi|15926560: hypothetical protein

GeneID: [1123647](#)

```

1 atgcaaccac atttaatatg tctagactta gacggaacat tattaacga taacaagaa
61 atttcatcat atactaaaca agtattaaat gaattacaac aacgtggaca ccaaatatg
121 attgcgactg gcagacctta tcgtgcaagt caaatgtatt atcatgaatt aaatttaacg
181 acaccaattg ttaattttaa tggcgcttac gtacatcacc ctaaagataa aaacttcaa

```

```

241 acttgccatg aaatthttaga ttttaggcacg gcacaaaaca ttattcaagg attacaacaa
301 tatcaagtat cgaatattat agcagaagtg aaagattatg ttttcattaa caatcatgat
361 ccaagattat ttgaaggttt ttcaatgggt aatccaagaa ttcaaaactgg taatttactt
421 gtccacttga aagaatcccc tacctcaatt ttaattgaag ccgaagaaag taaaatacct
481 gaaatcaaaa atatgcttac tcattttttat gccgatcata ttgagcatcg acgctggggc
541 gcaccattcc ctgtcattga aattgtaaaa cttggtatta ataaagcaag aggcatgag
601 caagttagac aatthtttaa tattgaccga aataatatta ttgcattcgg tgatgaagat
661 aatgatattg aaatgattga gtacgcccgc catggtggtg ctatggaaaa tggtttgcaa
721 gaacttaaa atgtagcgaa caatattaca ttcaacaata atgaagatgg cattggtcga
781 tatttgaatg atttctttaa tttaaatatt agatattact gtaa

```

ProteinID: [NP\\_374093.1](#)

MQPHLICLDLDGTLNDNKEISSYTKQVLNELQQRGHQIMIATGRPYRASQMYHELNLTTPIVNFNGAYVHHPKDKN  
FKTCHIELDLGIQNI IQGLQQYQVSNI IAEVKDYVF INNHDPRLFEGFSGMGNPRIQTGNLLVHLKESPTSILIEAEE  
SKIPEIKNMLTHFYADHIEHRRWGAPFPVIEIVKLGINKARGIEQVRQFLNIDRNNI IAFGDEDNDIEMIEYARHGVA  
MENGLQELKDVANNITFNNNEDGIGRYLNDFFNLNIRYYC

#### gi|15928148: immunodominant antigen A

GeneID: [1125284](#)

```

1 atgaaaaaga caattatggc atcatcatta gcagtgccat taggtgtaac aggttacgca
61 gcaggtacag gacatcaagc acacgctgct gaagtaaagc ttgatcaagc acacttagtt
121 gactttagcgc ataatacaca agatcaatta aatgcagctc caatcaaaaga tgggtcatat
181 gacatccact ttgtaaaaga tggtttccaa tataacttta cttcaaatgg tactacatgg
241 tcatggagct atgaagcagc taatggtcaa actgctggtt tctcaaacgt tgcaggtgca
301 gactacacta cttcatacaa ccaaggttca gatgtacaat cagtaagcta caatgcacaa
361 tcaagtaact caaacgttga agctgtttca gtcccaactt accataacta cagcacttca
421 actacttcaa gttcagtgag attaagcaat ggtaactctg caggtgctac tggttcatca
481 gcagctcaaa tcatggctca acgtactggt gtttcagctt ctacatgggc tgcaatcatc
541 gctcgtgaat caaatggtca agtaaatgct tacaacccat caggtgcttc aggtttattc
601 caaactatgc caggttgggg tccgacaaac actggttgacc aacaaatcaa cgcagctggt
661 aaagcataca aagcacaagc tttaggtgct tggggattct aa

```

ProteinID: [NP\\_375681.1](#)

MKKTIMASSLAVALGVTGYAAGTGHQAHAEEVNVDDQAHVLVDLAHNHQDQLNAAPIKDGAYDIHFVKDGFQYNFTSNGT  
TWSWSYEAANGQTAGFSNVAGADYTTSYNQGSVDVQSVSYNAQSSNSNVEAVSAPTYHNYSTSTSTSSSVRLSNGNTAGA  
TGSSAAQIMAQRTGVSASTWAAI IARESNGQVNAYNPSGASGLFQTMPGWGPTNTVDQQINA AVKAYKAQGLGAWGF

#### gi|14247692: aldehyde dehydrogenase

ProteinID: [NP\\_372444.1](#)

MNIIEQKFYDSKAFFNTQQTKDISFRKQDLKLSKAIKSYESDILEALYTDLGKKNVEAYATEIGITLKS IKNARKEL  
KNWTKTKNVDTPLYLFPKTSYIKKEPYGTVLI IAPFNYPFQLVFEPLIGATAAGNTAI IKPSELTPNVARVIKRLINE  
TFDANYIEVIEGGIEETQTLIHLFPDYVFTGSENVGKIVYQAAENLVPVLTLEMGGKSPVIVDETANIKVASERICF  
GKFTNAGQTCVAPDYILVHESVKDDLITALSKTLEFYGQNIQQSPDYGRIVNLKHYHRLTSLLSNAQMNIVFGGHS  
EDERYIEPTLLDHVTSDSAIMQEEIFGPILPILTYQSLDEAIAFIHQRPKPLSLYLFSEDENATORVINELSFGGGAI  
NDTLMHLANPKLFFGGV GASMGRYHGKYSFDTFTHEKSYIFKSTRLESGVHLPPYKGFYKKAFFKN

#### gi|21205110: truncated beta-hemplysin

GeneID: [1124703](#)

```

1 attagggact ccaaacccea taaatactgt tgttacaagg tttctatgta tccaaactgg
61 ggacaatata aacgcgctga tttaatcgga caatcttctt atattaataa taatgatgct
121 gtaatatcca atgaagcatt tgataatggt gcatcagaca aattattaag taatgtgaaa
181 aaagaatata cttaccaaac acctgtactc ggtcgttctc aatcaggttg ggacaaaact
241 gaaggtagct actcatcaac tgttgctgaa gatggtggcg tagcgattgt aagtaaatat
301 cctattaaag aaaaaatcca gcatgttttc aaaagcgggt gtggattcga taatgatagc
361 acaaaaggct ttgtttatc aaaaatagag aaaaatggta agaacttca cgttatcgg
421 acacatacac aatctgaaga ttcacgttgt ggtgctggac atgatcgaaa aattagagct
481 gaacaaatga aagaaatcag tgactttggt aaaaagaaaa atatccctaa agatgaaacg
541 gtatatatag gtggcgacct taatgttaat aaaggcactc cagagttcaa agatatgctt
601 aaaaacttga atgtaaatga tgttctatat gcaggtcata atagcacatg ggaccctcaa
661 tcaaatcaa ttgcgaaata taattaccct aatggtaaac cagaacattt agactatata
721 tttacagata aagatcataa acaacaaaa caattagtca atgaagttgt gactgaaaaa
781 cctaagccat gggatgata tgcgttccca tattactacg tttacaatga tttttcagat
841 cattaccaa tcaaagccta tagtaaatag

```

ProteinID: [NP\\_375112.1](#)

MRDSKPNKYCCYKVSMPNWGQYKRADLIGQSSYIKNNNDVVI FNEAFDNGASDKLLSNVKEYPYQTPVLGRSQSGWD  
KTEGYSSTVAEDGGVAIVSKYPIKEKIOHVFKSGCGFDNDSNKGFFVYTKIEKNGKNVHVIGTHTOSEDSRCGAGHDR

KIRAEQMKEISDFVKKKNI PKDETVYIGGDLNVNKGTPPEFKDMLKLNLVNDVLYAGHNSTWDPQSNSIAKYNYPNGKP  
EHLDIYIFTDKDHKQPKQLVNEVVTEKPKPVDVYAFPPYYVYVNFSDHYPIKAYSK

**gi|15927879: secretory antigen precursor SsaA homolog**

GeneID: [1125017](#)

```

1   atgaagaaaa tcgctacagc tactatcgca actgcaggat tcgctacaat cgcaattgca
61  tcaggaaatc aagctcatgc ttctgagcaa gataactacg gttataatcc aaacgacca
121 acatcatata gctatactta cactattgat gcacaaggta actaccatta cacatggaaa
181 ggtaactggc atccaagtca attaaaccaa gataatggct actacageta ttactactac
241 aatggctaca ataactaca caattacaac aatgggtata gctacaataa ttacagcgt
301 tacaacaact actcaaataa taatcaatca tataactaca ataactataa tagttacaac
361 acaaacagct accgtactgg tggtttaggt gcaagctaca gcacttcaag caacaatggt
421 caagtaacta caactatggc tccatcatca aatggccggt caatctcaag tggttatact
481 tcaggacgta acttatacac ttctgggtcaa tgtacatact acgtatattga tcgtgtaggt
541 ggtaaaaatcg gttcaacttg gggcaatgca agtaactggg ctaacgcagc tgcaagagct
601 ggttacacag tgaacaatac accaaaagct ggtgcaatta tgcaaacac tcaaggtgca
661 tacggtcacg ttgcatacgt tgaagtggt aacagcaatg gttcagtaag agtttcagaa
721 atgaactatg gttatggccc aggtgttgta acttcacgta caatctcagc tagccaagct
781 gctgggtata acttcattca ctaa

```

ProteinID: [NP\\_375412.1](#)

MKKIATATIATAGFATIAIASGNQAHASEQDNYGYNPNPDTSSYSYTYTIDAQGNHYHTWKGWHPSQLNQDNGYYSYY  
YYNGYNNYNNYNGYSYNNYSRYNNYSNNNQSYNNYNSYNTNSYRTGGLGASYSSTSSNNVQVTTTMAPSSNGRSIS  
SGYTSGRNLYTSGQCTYVFDVGGKIGSTWGNASWNAARAGYTVNNTPKAGAIMQTTQAGYGHVAVVESVNSNG  
SVRVSEMNHYGYPGVVTSRTISASQAAGYNFIH

**gi|15927798: 50S ribosomal protein L13**

GeneID: [1124936](#)

```

1   atgcgtcaaa catttatggc aatgaatca aacattgagc gcaaattgta tgttatcga
61  gctgaaggcc aaacattagg tcgtttatca tcagaagtag catctatctt acgcggtaaa
121 aataaagtaa cttacacacc acacgttgat actggtgatt atgtaatcgt tattaatgca
181 tcaaaaatcg aatttactgg taacaaagaa actgacaaag ttactaccg tcaactcaat
241 catccaggtg gtatcaaatc aatcaactgct ggtgaattaa gaagaactaa cccagaacgt
301 ttaattgaaa actcaattaa aggtatgta ccaagcactc gtttaggcga aaaacaaggt
361 aaaaaattat ttgtatatgg tggcgctgaa catccacacg ctgcacaaca accagaaaac
421 tacgaattac gtggttaa

```

ProteinID: [NP\\_375331.1](#)

MRQTFMANESNIERKQWVIDAEGQTLGRLSSEVASILRGKKNVYTPHVDTG DYVIVINASKIEFTGNKETDKVYYRH  
SNHPGGIKSITAGELRRTNPERLIENSIGMLPSTRLEKQGGKLFVYGGAEHPHAAQQPENYELRG

**gi|15926780: hypothetical protein**

GeneID: [1123871](#)

```

1   atggagactt atgaatttaa cattacagat aaagaacaaa caggatgagc tgtagataag
61  ttgctgcctg aattaaataa tgattggctc cgtaaccaga tacaagattg gattaaagca
121 ggttttagtc tgcaaacga taaagtgttt aaatctaatt ataaagtgaa acttaatgat
181 catatagttg tcaactgaaa agaagtgggt gaagctgata ttctacctga aaatttaaat
241 ttagatattt attatgaaga tgacgatggt gcagttgtat ataaaccgaa aggcattgta
301 gtccatccat caccaggcca ttataccaat acattagttt atggtttaat gttacaaatt
361 aaaaatttgt caggatttaa tggagaaatt cgtccaggta ttggtcaccg tatagatag
421 gataactctg gtttattaat gttgctaaa aatgatattg ctcactcgtg gctgtgtaga
481 caattaatgg ataaatctgt taaaagaaaa tatatcgctt tagttcacgg gaatattcct
541 catgattacg gtacaatcga tgcgccaatt ggtagaacaa aaaatgatcg tcaatctatg
601 gctgtgtgtg atgatggtaa ggaagcagtg acacatttta acgtactaga acattttaaa
661 gattatacgc ttgttgaatg tcaacttgaa acaggacgta cgcatacaat ccgtgtgac
721 atgaaaatata ttggcttccc attagttggt gatccaaagt atggaccgaa aaagacattg
781 gatattggtg gtcaagctct acatgctgga cttattggat tcgaacatcc agtaacaggt
841 gaatatattg aaagacatgc tgaattacca caagactttg aagatttatt agatacaatt
901 cgaaaaagag atgcataa

```

ProteinID: [NP\\_374313.1](#)

METYEFNITDKQETGMRVDKLLPELNNDWSRNQIQDWIKAGLVVANDKVVKSNYKVKLNDHIVVTEKEVVEADILPEN  
LNLDIYYEDDDVAVVYKPKGMVVHSPGHYTNLTVNGLMYQIKNLSGINGEIRPGIVHRIDMDTSGLLMVAKNDIHR  
GLVEQLMDKSKVRKYIALVHGNI PHDYGTIDAPIGRNKNDRQSMVAVDDGKEAVTHFNVLEHFKDYTLVECQLETGRT  
HQIRVHMKYIGFPLVGDPKYGPCKTLDIGGQALHAGLIGFEHPVTGEYIERHAELPQDFEDLLDITKRDA

**gi|15926226: elongation factor Tu**GeneID: [1123311](#)

```

1   atggcaaaag aaaaattcga tcgttctaaa gaacatgcca atatcggtac tatcggtcac
61  gttgaccatg gtaaaacaac attaacagca gcaatcgcta ctgtattagc aaaaaatggt
121 gactcagttg cacaaatcata tgacatgatt gacaacgctc cagaagaaaa agaactgggt
181 atcacaatca atacttctca cattgagtac caaactgaca aacgtcacta cgctcacggt
241 gactgccag  gacacgctga ctacgtttaa aacatgatca ctggtgctgc tcaaatggac
301 ggcggtatct tagtagtatac tgctgctgac ggtccaatgc cacaaactcg tgaacacatt
361 cttttatcac gtaacgttgg tgtaccagca ttagtagtat tcttaaacia agttgacatg
421 gttgacgatg aagaattatt agaattagta gaaatggaag ttcgtgactt attaagcgaa
481 tatgacttcc caggtgacga tgtacctgta atcgctggtt cagcattaa agctttagaa
541 ggcgatgctc aatacgaaga aaaaatctta gaattaatgg aagctgtaga tacttacatt
601 ccaactccag aacgtgattc tgacaaacca ttcacatgatc cagttgagga cgtattctca
661 atcactggtc gtggtactgt tgctacaggg cgtggtgaac gtggtcaaat caaagttggt
721 gaagaagttg aaatcatcgg tttacatgac acatctaaaa caactgttac aggtgttgaa
781 atgttccgta aattattaga ctacgctgaa gctggtgaca acattggtgc atttattacgt
841 ggtgttgctc gtgaagacgt acaacgtggt caagtattag ctgctcctgg ttcaattaca
901 ccacatactg aatttaaagc agaagtatac gtattatcaa aagacgaagg tggacgctac
961 actccattct tctcaaacta tcgtccacaa ttctatctcc gtactactga cgtaactggt
1021 gttgttcact taccagaagg tactgaaatg gtaatgcctg gtgataacgt tgaatgaca
1081 gtagaattaa tcgctccaat cgcgattgaa gacggtactc gtttctcaat ccgcaagggt
1141 ggacgtactg taggatcagg cgttgttact gaaatcatta aataa

```

ProteinID: [NP\\_373759.1](#)

MAKEKFRSKEHANIGTIGHVDHGKTTLTAAIATVLAKNGDSVAQSYDMIDNAPEEKERGITINTSHIEYQTDKRHYA  
HVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGGILVVSAAADGMPMPQTRHEILLRSNVGVPALVVFVFNKQVMDVDELELLELVEVEMVRD  
LLSEYDFPGDDVPIAGSALKALEGDAQYEEKILELMEAVDTYIPTPERDSKPFMPVDFVFSITGRGTVATGRVER  
GQIKVGEEVEIIGLHDTSKTTVTGVEMFRKLLDYAEAGDNIGALLRQVAREQVQGLAAPGSIPTPHTEFKAEVVYL  
SKDEGGRHTPFSSNYRQFYFRRTDVTGTVHLPEGTEMVMPGDNVEMTVELIAPIAIEDGTRFSIREGGRVTVGSGVVT  
EIIK

**gi|15924043: autolysin**GeneID: [1121030](#)

```

1   atgttaggag taataaatag aatggcgaaa aaattcaatt acaactacc atcaatggtt
61  gcattaacgc ttgtaggttc agcagtcact gcacatcaag ttcaagcagc tgagacgaca
121 caagatcaaa ctactaataa aaatgtttta gatagtaata aagttaaagc aactactgaa
181 caagcaaaaag ctgaggtaaa aaatccaacg caaaacattt ctggcactca agtatatcaa
241 gaccctgcta ttgtccaacc aaaaacagca aataacaaaa caggcaatgc tcaagtaagt
301 caaaaagttg atactgcaca agtaaatggt gacactcgtg ctaatcaatc agcactaca
361 aataatacgc agcctgttgc aaagtaacaa agcactacag cacctaaaac taacataat
421 gttacaaaatg ctggttatag tttagttgat gatgaagatg ataattcaga acatcaaatt
481 aatccagaat taattaaatc agctgctaaa cctgcagctc ttgaaacgca atataaagcc
541 gcagcaccta aagctaaaaac tgaagcgaca cctaaagtaa ctacttttag cgcttcagca
601 caaccaagat cagttgctgc aacaccaaaa acgagtttgc caaaatataa accacaagta
661 aactcttcaa ttaacgatta cattcgtaaa aataacttaa aagcacctaa aattgaagaa
721 gattatacat cttacttccc taaatacgc taccgtaacg gcgtaggtcg tcctgaagggt
781 atcgtagttc atgatacagc taatgatcgt tcgacgataa atggtgaaat tagttatag
841 aaaaataact atcaaacgc attcgtacat gcatttgttg atggggatcg tataatcgaa
901 acagcaccia cggattactt atcttggggt gtcggtgcag tcggtaaccc tagattcatc
961 aatggtgaaa tcgtacacac acacgactat gcttcatttg cacgttcaat gaataactat
1021 gctgactatg cagctacaca attacaatat tatggtttaa aaccagacag tgctgagat
1081 gatggaaatg gtacagtatg gactcactac gctgtaagta aatatttagg tggtagcgac
1141 catgccgatc cacatggata tttagaagat cataattata gttatgatca atttatatgac
1201 ttaattaatg aaaaatattt aataaaaatg ggtaaagtgg cgccatgggg tacgcaattt
1261 acaactaccc ctactacacc atcaaaaacca acaacaccgt cgaaaccatc aactggtaaa
1321 ttaacagttg cagcaaaaaa tgggtgctgca caaatcaaac caacaaatag tggtttatat
1381 actactgttt acgcaaaaac tggtaaagca actaatgaag ttcaaaaaaac atttgctgta
1441 tctaaaacag ctacattagg taatcaaaaa ttctatcttg ttcaagatta caattctggt
1501 aataaatttg gttgggttaa agaaggcagat gtggtttaca acacagctaa acacctgta
1561 aatgtaaatc aatcatattc aatcaaatct ggtacgaaac tttatacagt atcttggggt
1621 acatctaac aagttgctgg tagcgtgtct ggctctgtaa accaaacatt taaggcttca
1681 aagcaacaac aaattgataa atcaatttat ttatatgct ctgtgaatgg taaatctggt
1741 tgggtaagta aagcatattt agttgatact gctaaaccta cgcctacacc aatacctaag
1801 ccatcaacac ctacaacaaa ctataaatta acagtttcat cattaacggt tgttgcctca
1861 attaatgcta aaaaacaatg tttattcact acagtttatg acaaaaactg taagcaaacg
1921 aaagaagttc aaaaacattt tgctgtaaca aaagaagcaa gtttaggtgg aaacaaattc
1981 tacttagtta aagattacaa tagtccaact ttaattggtt gggttaacaa aggtgacggt

```

```

2041 atttataaca atgcaaaatc acctgtaaat gtaatgcaaa catatacagt aaaaccaggc
2101 actaaattat attcagttacc ttggggcact tataaacaag aagctgggtgc agtttctggt
2161 acaggtaacc aaacttttaa agcgactaag caacaacaaa ttgataaatc tatctattta
2221 tttggaactg taaatggtaa atctggttgg gtaagtaaag catatttagc tgtacctgct
2281 gcacctaaaa aagcagtagc acaaccacaaa acagctgtaa aagcttatac tgttactaaa
2341 ccacaaacga ctcaaacagt tagcaagatt gctcaagtta aaccaaacaa cactgggtatt
2401 cgtgcttctg tttatgaaaa aacagcgaaa aacgggtcga aatatgcaga ccgtacgttc
2461 tatgtaacaa aagagcgtgc tcatggtaat gaaacgtatg tattatthaaa caatacaagc
2521 cataacatcc cattaggttg gttcaatgta aaagacttaa atgttcaaaa cctaggcaaa
2581 gaagttaaaa cgactcaaaa atatactggt aataaatcaa ataacggctt atcaatgggt
2641 ccttggggta ctaaaaacca agtcatttta acaggcaata acattgctca aggtacattt
2701 aatgcaacga aacaagtatc tgtaggcaaa gatgtttatt atacggctact attaataacc
2761 gcactggttg gtaaaagcaaa agatttaccg caccaactcg gaaaccaact acatcagctg
2821 ccaaagattt aa

```

ProteinID:[NP\\_371577.1](#)

MLGVINRMAKKFNYKLPMSVALTLVGSVTAHVQVAAETTQDQTTNKNVLDNSNKVKATTEQAKAEVKNPTQNISGTQV  
YQDPAIVQPKTANNKTGNAQVVSQKVDTAQVNGDTRANQSATTNNTQPVAKSTSTTAPKTNTNVTNAGYSLVDEDDNS  
EHQINPELIKSAAKPAALETQYKAAAPKAKTEATPKVTTFSASQPRSVAAATPKTSLPKYKPKQVNSSINDYIRKNNLK  
APKIEEDYTSYFPKYAYRNGVGRPEGIVVHDTANDRSTINGEISYMKNNYQNAFVHFVVDGDRILETAPTDLVSWGVG  
AVGNPRFINVBIHVTHDYASFARSMNNYADYAATQLQYGLKPDSAEYDNGTVMWTHYAVSKYLGGTDHADPHGYLRS  
HNYSYDQLYDLINKEYLIKMGKVPWGTQFTTPTTPSKPTTSPKSTGKLTVAANNQVAQIKPTNSGLYTTVYDKTG  
KATNEVQKTFVSKTATLGNQKFLYLVQDYNNGKFGWVEKGDVYNTAKSPVNVNQSYSIKSGTKLYTPWGTSKQVA  
GSVSGSNQTFKASKQQQIDKSIYLYGVSNGKSGWVSKAYLVDTAKPTPTPIPKPSTPTTNNKLTVSSLNGVAQINAK  
NNGLFTTVYDKTGKPTKEVQKTFAVTKEASLGGNKFYLVKDYNSTPLIGWVKQGDVIYNNAKSPVNVMTYTTVKPGTK  
LYSVPWGTYKQEAGAVSGTGNQTFKATKQQQIDKSIYLFQTVNGKSGWVSKAYLAVPAAPKKAVAQPKTAVKAYTVTK  
PQTQTVSKIAQVKPNNTGIRASVYEKTAKNGAKYADRTFYVTKERAHGNETYVLLNNTSHNIPLGWFNVKDLNVQNL  
GKEVKTTQKYTVNKSNNGLSMVPWGTKNQVILTGNNIAQGTFNATKQVSVGKDVYYTVLLITALVKGAKDLPHQLGNQ  
LHQLPKI

#### gi|21205078: hypothetical protein (Phage Terminase)

GeneID:[1004022](#)

```

1 atgactgatt atgttactaa atacgcaaaa aaggtagttt caggagaaat tttggcaagt
61 ttgagaataa ttcaagtatg caaacgtcac ctatctttta tggagaaccc gccgaatggt
121 tgccattggg ataatcattt gtctaacaaa gcaattaaat ttgtggaaat gcttccagac
181 cctaaaacaa accagcccat gcctcttatg gagtttcaga aattcattgt tgggagctta
241 tacggctggc gtagagggtca atacagaatg ttactataag cttatataag tatggctaga
301 aagcaaggta agtctctaag cgtatcggga atgtccgta acgaactgtt gtttggacaa
361 taccctaaat ttaatagaca aatttatgta gcttcatcta cttataagca agcgcaacaa
421 atattcaaga tggcaagcca acaagtaaac ctaatgcaa gtaaaagcaa gtttatccgt
481 gaaaaaacag acgtaagaaa gacagacatt gaagatgat taagtagttc agtgtttgca
541 cctctttcca ataaccaga tgcggttgat ggtaaagatc ctacagttgc tattttggac
601 gaattggcaa gtagcctga tgatgatgat tactcaaggt ttaaacagag tagtacaata
661 caaaaaaatc ctttaaccct acttgtttca acggcggag acaattthaaa tagtcaaatg
721 taccaagagt ataagtatat taaacgtatt ttaaatgaag aagtaagagc tgataattac
781 ttgtatatt gtgctgaaat ggattcacia gaagaagt c aagatgaaac aaagtggatt
841 aaagcaatgc cgcttttaga atcaaaaaga catagaaaaa ctatacttca aaatgtaaaa
901 gctgatatac aagacgaatt agaaaaagg acatcgtatc ataagatttt gattaaaaac
961 ttcaatttat ggcaagcgca aagagaagat agcttgtag atatttcaga ttgggaacaa
1021 gtaataacgc ctatgcctaa tatcaatggt aaagatgtgt atataggtgt cgacttatcg
1081 agattggatg acttaacatc tgtagggttt atttcccta acgacgataa aaaagtgttt
1141 ttacatagtc attctttcat tggattaaga acaaacctag acaaaaaatc taagagagac
1201 aaaataaatt atgaattagc gattgaacgt ggagaagctg agactacaca atcagatagc
1261 ggcattgatt attataaaca agttatcgat ttatagtgta aatttataac gacgcatgac
1321 ctgaatgtac aggtctgttg ctatgacctt tggaaatgagc aaagttttat aacaacaatc
1381 gaatcaatgg ctttagattg gccactcatt gaagtgggac aaagttttaa ggcgttatca
1441 caatctatta aagaatttag aatgtgggtt gcagatgaaa gaatacagca taaccgataat
1501 atgttactta caacatcagt taataatgcc gttttgattc gtgacggaga agacaatgtg
1561 aaaataaata aaaaaatgaa tcgtcaaaaa atagatccga ttatttcgat tatcacgct
1621 ttcactgaag ctagaatgca cgaattccaa gaaaattgga cggagaataa tgaaagcgaa
1681 gaattcggat tttaa

```

ProteinID:[NP\\_646725.1](#)

MTDYVTKYAKKVVSGEILASLKNIQVCKRHLSFMENPPNGCHWDNHLNKAIKFVEMLPDPKTNQPMPLMEFQKFIG  
SLYGWRRGQYRMFTKAYISMARKQKSLIVSGMSVNELLFGQYKPKFNRQIYVASSTYKQAQTFKMASQQVNLMRSKS  
KFIREKTDVRKTDIEDVLSVVFAPLSNNDPAVDGKDPVAI LDELASMPDDEMYSRFTKGMTLQKNPLLLVSTAGD  
NLNSOMYOEYKYIKRILNEVRADNYFVYCAEMDSOEVEODETKWIKAMPLLESKEHRKTI LONVKADIODELEKGTG

YHKLIKLNFNWQAQREDSLLDISDWEQVITPMPNINGKDVIYIGVDLSRLDDLTSVGFIFPNDKVKVFLSHSFI GLR  
 TNLEQKSKRDKINYELAIERGEAETTQSDSGMIDYKQVIDFIVKFI TTHDLNVQAVCYDPWNAQSFITTI ESMALDWP  
 LIEVGQSFKALSQS I KEFRMWVADERIQHNDNMLLTTSVNNAVLIRDGEDNVKINKKMNQRKIDPI I S I I TAFTEAM  
 HEFQENWTEKYESEEFGE

**gi|14247604: protoporphyrinogen oxidase**

GeneID: [1121814](#)

```

1   gtgactaaat cagtggctat tataggagcg gggataacag gtttatcaag tgcataat
61  ttaaacacgc aagatcctaa tattgatgta accatctttg aagcatcgaa tcgctccggg
121 ggaagatttc aatcgtatcg taaagatggt tatatgattg aactagggcc tgaatcttat
181 ttaggtagaa aaacgattat gacagaatta gcgaaagata ttggattaga acaagatatt
241 gttacaaata cgactggaca atcatatatt ttgcgaaaa ataaattata tccgattoca
301 ggtggttcaa ttatgggtat tccaacagat attaaacat ttgttactac aaaattaata
361 tcgccacttg gtaaattaag agcaggatta gatttaataca aaaagcctat acaaatgcaa
421 gatggtgaca tttctgttgg tgcatttttc agagcaagat taggtaatga ggtacttgag
481 aacttaattg agcctttaat ggggtgtatt tatgggtaccg atattgataa attaagtttg
541 atgagtagct ttcctaattt taaagaaaaa gaagaggcat tcggaagtcg gataaaagtg
601 atgaaggatg agaaaaataa gcgtctgaaa caaagacaat tatacctg cgcacaaaaa
661 ggacaattca aacaatttaa gcatggttta agctcattta ttgaagcatt agaacaagat
721 gtgaaaaata aagtggtgac aatacgtcac aatacgtcag tggatgatat tattacatct
781 caaaagcaat ataaaattgt ttacagtaat caacaagaag atgtattcga tgggggtatta
841 gtgacaacac cgcatcaagt ctttttgaat tggttcggac aagatccagc atttgattac
901 tttaaaacga tggatagtag gactgttgca actggttgat tggcatttga tgaaaaagac
961 attgaaaata cttatgatgg tactggcttc gtgattgcga gaacgagtga tacagacatt
1021 accgcatgta cttggacatc gaaaaaatgg ccatttacta caccagaagg taaggttttg
1081 attcgtgctg atgtaggtaa accaggtgat actgtggttg atgatcatac agataatgaa
1141 ttagtatcga ttgtacgtag agatttaagt caaatgatga catttaaagg tgatcctgaa
1201 tttacaattg tcaatcgttt gccgaaaagt atgccacagt accatgtcgg tcatattcaa
1261 caaattagac agattcaagc acatattaaa caaacatata cactgactag agtaactggt
1321 gcatcttttg aagcggtttg actacctgat tgtattacac aaggtaaagt tgctgctgaa
1381 gaagtaatcg cagagttgta a

```

ProteinID: [NP\\_372356.1](#)

MTKVAIIGAGITGLSSAYFLKQQDPNIDVTIFEASNRPFGKIQSYRKDGYMIELGPESYLRKRTIMTELAKDIGLEQ  
 DIVTNTTQGSYIFAKNKLYPIPGGSMIGIPTDIKPFVTTKLI SPLGKLRAGLDLIKPIQM QDGDISVGAFFRARLGN  
 EVLENLIEPLMGGIYGTIDDKLSLMSTFPNFKEKEEAFGLIKGMKDEKNKRLKQRQLYPGAPKQGFQFKHGLSSFI  
 EALEQDVKNKGV TIRYNTSVDDIITSQKQYKIVYSNQ QEDVFDGVLVTTPHQVFLNWFQDPAFDYFKTMDSTTVATV  
 VLA FDEKDIENTYDGTGFVIARTSDTDITACTWTSKKWPFTTPEGKVLIRAYVGKPGD TVVDDHTDNLVSVIVRRDLS  
 QMMTFKGDPEFTIVNRLPKSMPQYHVGHIIQQIRQIQAHIKQTYPRLRVTGASFEAVGLPDCITQGVKAAEEVIAEL

**gi|15927580 hypothetical protein, similar to synergohymenotropic toxin precursor**

GeneID: [1124704](#)

```

1   atgattaaac aattatacaa aaacatcaca atttgtagtt tagcaatata tactgcatta
61  actgtatttc cggaacttc ttatgcaaaa attaattctg aaattaaagc tgtttctgag
121 aagaatcttg atggtgatac taaaatgtat acacgtacag ctacaacaag tgatagtc
181 aaaaatatta ctcaaagctt acaatttaat ttcttaactg aacctaatga tgataaagaa
241 acagtattta ttaaagcaa aggtacaatt ggtagtggtt tgagaatttt agaccaaat
301 ggttattgga atagtagcatt aagatggcct ggatcttatt cagtttcaat tcaaaatg
361 gatgacaaca acaatacaaa tgtgactgac tttgcaccaa aaaatcagga tgaatcaaga
421 gaagttaaat atacgtatgg ttataaaaca ggtggagatt ttcgattaa tcgtggaggc
481 ttaactggaa atattacaaa agagagtaat tattcagaga cgattagtta tcaacaacca
541 tcatatcgta cttacttga tcaatctacg tcacataaag gtgtaggttg gaaagtagaa
601 gcacatttga taaataatat gggacatgac catacgagac aattaactaa tgatagtgat
661 aatagaacta aaagtgaat cttttcttta acacgaaatg gaaatttatg ggcgaaagat
721 aatttcacac ctaaagacaa aatgcctgta actgtgtctg aagggtttaa tccagaattt
781 ttagctgta tgtcacatga taaaaagac aaaggtaaat cacaatttgt tgttcattat
841 aaaagatcaa tggatgagtt taaaatagat tggaaatgcc atggtttctg gggctattgg
901 tctggtgaaa accatgtaga taaaaagaa gaaaaattat cagcattata tgaagttgat
961 tggagacac atgatgtgaa gtttgaataa gtacttaatg ataatgaaa gaaataa

```

ProteinID: [NP\\_375113.1](#)

MIKQLYKNITICSLAISTALTVPATSYAKINSEIKAVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYD  
 KETVFIKAKGTIGSGLRILDPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKGGDFSI  
 NRGGLTGNITKESNYSETISYQQPSYRTLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINMGHDHTRQLTNDSDNRKSEIFSLTRNG  
 NLWARDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVM SHDKKDGKGSQFVVHYKRSMDFEKIDWNRHGFVGYWSGENHVDKKEEK  
 LSALYEVDDWKTHDVKFKVVLNDNEKK

**gi|15927474: glutamyl-tRNAGln amidotransferase subunit A**

GeneID: [1124600](#)

```

1   ttataat tttt ccataaacgt catgtaaatt gtattgtgtt tcatattgat aagcgacacg
61  atataacg tttt ttttcatcga atgggtttacc aatgaactgt aaaccgattg gtcggccatt
121 tgattgtcca caaggaacag aaataaccagg taatccagct aagtttactg gtggtgttaa
181 taaatcattg gcatacattg ttaatggatc atcaat tttct tcaactaaat taaacgcagt
241 tgtaggcgct gttggaccaa ctactacatc ataatttttcg aatactttat caaagtcatt
301 tttaatcaat gttcctaact tttgagattt tttatagtaa gcatcgtagt aacctgaact
361 taatgcaaat gtacctaaga aaatacgacg ttttacttct taccgaaac cttcagatct
421 tgacatttta tataattcctt ctaatgaatg agcttcttta gaatgataac catacgaat
481 tccgtcaaaa cgagaaaggt ttgacgaagc ttctgatgat gcaatcacgt aatatgatgg
541 aataccaaat ttagtatttg gcaatgatac ttccctcaacg acagcaccta aagattttaa
601 agtttctaca gcgttttgaa ctgcttcttt tacgtcatca gctacacctt cacctaagta
661 ttcttttagt aatgcaactt ttaatccttt aatatcttta ccaatttcag atgtaaagtc
721 tacatcatca actggtgcac ttgtagagtc attaacatct gcaccagaaa tagcttctaa
781 tacgattgca ttatctttta catttcgagt caatggacca atttggctca atgaagatgc
841 aaaagcaact aatccaaatc gagatacacg accgtagtgt ggtttcatac cgacaacgcc
901 acaatatgca gccggtttgtc taattgaacc acctgtgtct gaacctaacg taagtggtag
961 taagccagct gcaactgctg ctgcagatcc acctgatgaa ccacctggta ctgctttatg
1021 gcaaatggg ttaactgttt ttttgaata agatgtttct gttgaaccac ccattgcaaa
1081 ctcatccata ttttaatttac cgattaaaac ggcatttctt ttatgtagtt tttccattac
1141 agtagattcg taaattggca caaaaccttc taacatttta cttgcacatg ttgtttctaa
1201 tccgtttgta ataagtttat cttttatacc cattggaata ccaaataatt tgccatccat
1261 ttgatctttt gcttghtaatt catccaattc ttgctgtttt ttgattgcat tttctttatc
1321 cagcgctaga aaagacttaa ttggtggatc agtctcttca attgcatcat atatatcttt
1381 aacaacatca gatggtttga tttttttgct ttttattaaa gttaataaat tctcaaccga
1441 ttcgtagcga atgctcat

```

ProteinID: [NP\\_375007.1](#)

```

MSIRYESVENLLTLIKDKKIKPSDVVKDIYDAIEETDPTIKSFLALDKENAIKKAQELDELQAKDQMDGKLFGIPMGI
KDNIITNGLETTCAASKMLEGFVPIYESTVMKHLKENVLIGKLNMFDEFAMGGSTETSIFYFKKTVNPFVDFHKAVPPGSSG
GSAAVAAGLVPLSLGSDTGGSSIRQPAAYCGVVGMKPTYGRVSRFGLVAFASSLDQIGPLTRNVKDNAIVLEAISGAD
VNDSTAPVDDVDFTSEIGKDIKGLKVALPKEYLGEVADDVKEAVQNAVETLKLSLGAUVVEEVS L PNTKFGIPSYVVI
ASSEASSNLSRFDGIRYGYHSKEAHSLEELYKMSRSEGFGEVKKRRI FLGTFALSSGYDAYYKKSQKVRTLKNDFD
KVFENYDVVVGPTAPTTFANLGEIIDDPLTMYANDLLTTPVNLAGLPGISVPCGQSNRPIGLQF IGKPFDEKTLYRV
AYQYETQYNLHDVYEKL

```

**gi|15926504 : aminotransferase NifS homologue**GeneID: [1123591](#)

```

1   gtggccgaac actcatttga cgттаатгаа gтаатсаагг атттссгат аттагатсаа
61  aaagtcaatg gcaaacgttt agcatatctt gattcaacag cgacaagtca aacgcctatg
121 caagtgttaa atgttttaga ggattactac aagcgttata attcaaactg tcatcgtggt
181 gttcatacat taggatcatt ggcactgatg ggttatgaaa atgcccgta aaccgttcgt
241 cgttttatta atgcaagta ttttgaagaa atcattttca cacgcggaac aactgcgtcg
301 attaacctg tagcacatag ctatggtgat gcaaatgttg aagagggcga tgaattgtt
361 gtcactgaaa tggagcatca tgccaatatt gttccttggc aacagttagc aaagcgtaaa
421 aatggacat tgaaatttat accaatgaca gctgacggtg aattaaacat cgaagatatt
481 aagcaaacga ttaatgataa acaaaagatc gttgctatg cacatatttc taatgtactc
541 ggtacaatta atgatgttaa aaccattgca gaaatagctc atcaacatgg cgcaattatc
601 agtgttgatg gggcgcaagc agcaccacat atgaaacttg atatgcaaga aatgaatgct
661 gatttttata gtttttagtg tcataaaatg cttggaccaa caggtattgg cgtattattt
721 ggtaaacgtg agttactaca aaaaatggaa ccgattgagt tcggtgggta catgattgat
781 tttgtaagta agtatgatgc aacatgggct gatttaccta ctaaatttga ggcgggtact
841 ccattaattg ctcaagcaat tgggcttgca gaagctattc gctatttga acgcataggt
901 tttgatgcaa ttcataaata tgaacaagaa ttaacgatat atgcttatga gcaaatgtct
961 gcaattgaag gaattgaaat ttatggcccg cctaaggatc gtcgtgcagg tgtaataacg
1021 ttttaatttac aagatgtaca tccacacgat gttgctacag ccgtagatac agaaggtgta
1081 gcggttagag ctgggcatca ttgtgcgcaa ccgттаатгаа aatggttaaa tgtgtcttca
1141 acagctagag cgagttttta tatatacaac acgaaagaag acattgatca gttaataaat
1201 gccttgaaac aaacgaagga gtttttctct tatgaatttt aa

```

ProteinID: [NP\\_374037.1](#)

```

MAEHSFDVNEVIKDFPILDQKVNKRLAYLDSTATSQTPMQVLNVLEDYKRYNSNVHRGVHTLGLSLATDGYENARET
VRRFINAKYFEEIIFTRGTTASINLVAHSYGDANVEEGDEIVVTEMEHHANIVPWQQQLAKRKNATLKFIPMTADGELN
IEDIKQTINDKTKIVIAIAHISNVLTINDVKTIAEIAHQHGAIISVDGAQAAPHMKLDMQEMNADFYSFSGHKMLGPT
GIGVLF GKRELLQKMEPIEFGGDMIDFVSKYDATWADLP TKFEAGTPLIAQAIGLAEAIRYLEIRIGFDAIHKYEQELT
IYAYEQMSAIEGIEIYGPPKDRRAGVITFNLQDVHPHDVATAVDTEGVAVRAGHHCAQPLMKWLNVSSTARASFYIYN
TKEDIDQLINALKQTKEFFSYEF

```

**gi|15926226 elongation factor Tu**GeneID: [1123311](#)

```

1   atggcaaaag aaaaattcga tcgttctaaa gaacatgcc aatcgggtac tatcggtcac
61  gttgaccatg gtaaaacaac attaacagca gcaatcgcta ctgtattagc aaaaaatggt
121 gactcagttg cacaaatcata tgacatgatt gacaacgctc cagaagaaaa agaactggtt
181 atcacaatca atactttctca cattgagtac caaactgaca aacgtcacta cgctcacggt
241 gactgccccag gacacgctga ctacgtttaa aacatgatca ctggtgctgc tcaaatggac
301 ggcgggtatct tagtagtatc tgctgctgac ggtccaatgc cacaaactcg tgaacacatt
361 cttttatcac gtaacgttgg tgtaccagca ttagtagtat tcttaaacia agttgacatg
421 gttgacgatg aagaattatt agaattagta gaaatggaag ttcgtgactt attaagcgaa
481 tatgacttcc caggtgacga tgtacctgta atcgctggtt cagcattaa agctttagaa
541 ggcgatgctc aatacgaaga aaaaatctta gaattaatgg aagctgtaga tacttacatt
601 ccaactccag aacgtgattc tgacaaacca ttcattgatgc cagttgagga cgtattctca
661 atcactggtc gtggtactgt tgctacaggc cgtggtgaaac gtggtcaaat caaagttggt
721 gaagaagttg aaatcatcgg tttacatgac acatctaaaa caactgttac aggtgttgaa
781 atgttccgta aattattaga ctacgctgaa gctggtgaca acattggtgc atttattacgt
841 ggtgttgctc gtgaagacgt acaacgtggt caagtattag ctgctcctgg ttcaattaca
901 ccacatactg aatttaaagc agaagtatac gtattatcaa aagacgaagg tggacgtcac
961 actccattct tctcaaacta tcgtccacaa ttctatctcc gtactactga cgtaactggt
1021 gttgttcact taccagaagg tactgaaatg gtaatgcctg gtgataacgt tgaatgaca
1081 gtagaattaa tcgctccaat cgcgattgaa gacggtactc gtttctcaat ccgcaagggt
1141 ggacgtactg taggatcagg cgttgttact gaaatcatta aataa

```

ProteinID: [NP\\_373759.1](#)

MAKEKFRSKEHANIGTIGHVDHGKTTLTAAIATVLAKNGDSVAQSYDMIDNAPEEKERGITINTSHIEYQTDKRHYA  
HVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGGILVVSAAADGMPMQTREHILLSRNVGVPALVVFVFNKQVMDVDELELLELVEVEMVRD  
LLSEYDFPGDDVPIAGSALKALEGDAQYEEKILELMEAVDTYIPTPERDSKPFMPVDFVFSITGRGTVATGRVER  
GQIKVGEEVEIIGLHDTSKTTVTGVEMFRKLLDYAEAGDNIGALLRQVAREQVQVLAAPGSIPTPHTEFKAEVYVL  
SKDEGGRHTPFSSNYRPFYFRRTDVTGTVHLEPTEGTEMVMPGDNVEMTVELIPIAIEDGTRFSIREGGRVTVGSGVVT  
EIIK

**gi|15923845: hypothetical protein**GeneID: [1120830](#)

```

1   atgcaagcat tacaacatt taatthtgaa gaattaccag taagaacatt agaggttgac
61  ggagaacat atthtatagg aaaagatggt gctgacattt taggatatgc aaacggacga
121 gatgctttgt caaacatgt tgatgaagac gacaagaaag ttctaactgc gcgaaatagc
181 actttagaaa atthaccaaa tcgaggactt actgcagtca acgaatcggg ttatatacagc
241 ctaatcttct catcaaaact agaatcagct aaacgattca aacgctgggt aacatcagat
301 gtcctaccag ccattcgcaa atatggtatc tacgcaacgg acaacgtaa tgaacaaaca
361 ttaaaaagatc cagactacat cattacagtg ttgactgagt ataagaaaga aaaagagcaa
421 aacttacttt tgcaacaaga aatcggagag ctaaaaccca aagcagatta tgttgatgaa
481 atcttaaaat caactggcac attagctaca actcaaatcg cggcagacta cggtatatca
541 gcacaaaagt taaacaaact actacacgaa gctagactac aacgaaaagt aaataaacag
601 tgggtgcttt actcagaaca catgggcaag agttacacag attcagacac tataacaatt
661 tgcgcttctg atggcagaga agacacagtt ttacaaacta gatggacaca aaaagcgaga
721 ttgaaaatac atgaaatcat gactgaattc gggtatgaag ctaatthtagg gggagcgtaa

```

ProteinID: [NP\\_371379.1](#)

MQALQTFNFEELPVRTLVDGEPYFIGKDVADILGYANGRDALSKHVEDDDKKVLTSRNTTLENLNRGLTAVNESGL  
YSLIFSSKLESKRFRWVTSVLPVPAIRKYGIYATDNVIEQTLKDPDYIITVLTLEYKKEQNLQLQEIIGELKPKAD  
YVDEILKSTGTLATTQIAADYGISAQKLNKLLHEARLQRKVNKQWVLYSEHMGSYTDSDTITIVRSDGREDTVLQTR  
WTQKGRLLKIHEIMTEFGYEANLGA

**gi|15928148: immunodominant antigen A**GeneID: [1125284](#)

```

1   ttagaatccc caagcaccta aaccttgtgc tttgtatgct ttaacagctg cgttgatttg
61  ttggtcaaca gtgthtgcg gacccaac tggcatagtt tggataaac ctgaagcacc
121 tgatgggttg taagcattta cttgaccatt tgattcacga cggatgattg cagccatgtt
181 agaagctgaa acaccagtac gttgagccat gatttgagct gctgatgac cagtagcacc
241 tgcagtatta ccattgctta atctcactga acttgaagta gttgaagtgc tgtagttatg
301 gtaagttgga gctgaaacag cttcaacggt tgagttactt gattgtgcat tgtagcttac
361 tgattgtaca tctgaacctt gttgtatga agtagttag tctgcacctg caacgtttga
421 gaaaccagca gtttgacct tagctgcttc atagctccat gaccatgtag taccatttga
481 agtaaaagtta tattgaaac catcttttac aaagtggatg tcatatgac catctttgat
541 tggagctgca ttttaattgat cttggtgatt atgcgctaag tcaactaagt gtgcttgatc
601 aacgtttact tcagcagcgt gtgcttgatg tcctgtacct gctgcgtaac ctgttacacc
661 taatgccact gctaattgat atgccataat tgtctttttc at

```

ProteinID:[NP\\_375681.1](#)

MKKTIMASSLAVALGVTGYAAGTGHQAHAEEVNVDAQHLVDLAHNDQDLNAAPIKDGAYDIHFVKDGFQYNFTSNGT  
 TWSWSYEAANGQTAGFSNVAGADYTTSYNQSDVQSVSYNAQSSNSNVEAVSAPTYHNYSTSTSSSVRLSNGNTAGA  
 TGSSAAQIMAQRTGVSASTWAAI IARESNGQVNAYNPSGASGLFQTMPGWGPTNTVDQQINAAVKAYKAQGLGAWGF

**gi|15927677: ATP synthase subunit B**GeneID:[1124806](#)

```

1   ttatacttca acacccatat ctttagcttt tgcaataaca tcatccatgc taccaactaa
61  acggaatgca tcttctggaa tatggtcata tttaccatct aagatatctt taaagtttgc
121 aactgttgtc ttaacaggta cataagaacc tttttgacca gtaaattggt cgcgtacgtg
181 gaagttttga gataagaaga attgaattct acgtgctcgt tcaactgttt gtttatcttc
241 atcagataat tcgtccatac ctaagatagc aatgatatct tgcaattcac ggtatttttg
301 aagtgttgat tgtacatcac gagctacttc ataatgttct tgacctaca ttgatggttc
361 caatgctctt gatgtagacg ctaatggatc cacggctgga taaataccca tttcagttaa
421 ttacgttct aagttagtag ttgcatctaa atgggcaaac gctgtgcag cgcgtgggtc
481 agtatagtca tcggcaggta cgaataccgc ttgaatagaa gtaactgac ttttggttgt
541 agacgtaata cgttcttgta attgtcccat ttcagtagca agtggtgggt ggtaacctac
601 tgcaagaagc atacgacctc ataatgcaga tacctcagaa ccagcttggt taaatctgaa
661 aatgttatcg atgaataata atacgtcttg accttggttcg tcacggaaa attcagccat
721 tgttaaacca gataatgcaa cagcctacgc tgcaccaggt ggctcattca tttgcccga
781 taccatggct gtttctttaa ttacaccact gtcactcatt tcgaagtata aatcgttacc
841 ttcacgagta cgttcacct caccggcgaa tacagaaata ccaccgtgct cttgagcgat
901 gttgttaatt aattcttggg ttaatactgt tttacctaca ccggcaccac cgaacaatcc
961 gattttacca cctttaatat aaggtgctag taaatctact actttaatac ctgtttctaa
1021 aatttgaact tctgttgaat gttcatcgaa tgctgggtgct tgacgatgga taggatcgcg
1081 gcgaacagaa tcactaattt cttctttaag gtcaattggt tcacctagta cattaatac
1141 acgacctaat gtttcgtcac caacaggtac actaatttct ttgcctgcat cttttacatc
1201 catgcctctt tggacaccat cagttgaatc catcgcaatt gtacgaacaa cgtcgtcacc
1261 taattgcagc gcaacttcta atgttagttg tattgtacct tcttctttag gcacatcaat
1321 aaccaaggcg ttattaattt taggaacttc gttatgttca aatcgaacat caattacagg
1381 acccataact tgagttacac ggccaattcc cat

```

ProteinID:[NP\\_375210.1](#)

MGIGRVTVQMGVPIVDRFEHNEVPKINNALVIDVPKEEGTIQLTLEVALQLGDDVVRTIAMDSTDGVQRGMVMDKDTGK  
 EISVPVGETLGRVFNVLGETIDLKEEISDSVRRDPIHRQAPAFDELSTEVQILETGIKVVDLLAPYIKGGKIGLFGG  
 AGVGVKTVLIQELINNIQAHEHGGISVFAGVGERTREGNDLYFEMSDSGVIKKTAMVFGQMNEPPGARMRVALSGLTMAE  
 YFRDEQGDVLLFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRMPSAVGYQPTLATEMGQLQERITSTTKGSVTSIQAVFVPADDYTD  
 PAPATAFAHLDATTNLERKLTLEMGIYPVDPPLASTSRALEPSIVGQEHYEVARDVQSTLQKYRELQDI IAILGMDELS  
 DEKQTVERRARIQFFLSQNFHVAEQFTGQKGSYVPVKTIVANFKDILDGKYDHIPEDAFRLVGSMDVVIKAKDMGV  
 EV

**gi|21204821/gi:15927286: alanine dehydrogenase**GeneID:[1124376](#)

```

1   ttataattgt aatgcttctt ctacagatt atattccatt tcaaatgcct ctgcaacgcc
61  tttattggtt acgtgacctt tgtaagtatt taaacctaat gataatggtt gatttgattt
121 aaatgcttct ctataccctt tattagctag catgagcgca taaggtagcg tagcattatt
181 taagctaac gtcgaagtac gcggtactgc acctggcata tttgcaactg cataatgaac
241 cacaccatgc ttaatatatg taggatcatc atgtgtcgtg attttatcag ttgtttcaaa
301 aataccgctt tgatcaatag caatgtcaat aataactgac ccatttttca tttgtttaat
361 catgtcttct gttacaagtc ttggcgcttt agcacctgga attaaaactg cacctattac
421 taaatcactt tgtttaacat acaactcaat attcaacgga tttgacataa ttgtatgtac
481 acgtccaccg aataaatcat ctaattggtt taaacgctt ggattaacat ctaaaatcgt
541 aacatctgca cctagtccta gtgcaatttt agctgcattt gttcctgctt gaccaccacc
601 gataatagtt actttaccct taggtactcc tgggacacca cctagtagaa ttcccatacc
661 accattaagt tttttagtag actctgcgcc aacttgagct gacattcttc ctgctacctc
721 actcattggt gataacaatg gtaaagatcg gtctggtaac tgcacagtct catatgcaat
781 actaattact tttctatcta tcaaagcttg tgttaatttt tcttcatttg ctaaatgaag
841 ataagtgaat aatacaagcc cttctttaaa atatggatat tcagattcaa gtggttcttt
901 aactttaata accatatcca catcccaaac ttttctgtg tcagcaacaa tctcagcacc
961 tgccttcttg taatctacat ctccaagaa tgatcctgaa cccgcatttg tttccactaa
1021 aacagtatgc ccactttcta ctaaagcgtg cacaccactt ggtgataaac caacacgatt
1081 tcattattt ttaatctccc ttggtatacc aattttcat

```

ProteinID:[NP\\_374819.1](#)

MKIGIPREIKNNENRVGLSPSGVHALVESGHTVLVETNAGSGSFFEDVDYKEAGAEIVAEQAKVWDVDMVIVKKEPLE  
 SEYPYFKEGLVLFYTLHLANEKLTQALIDRKVISIAYETVQLPDRSLPLLSMSEVAGRMSAQVGAELQKLNNGMG  
 ILLGVVPGVPKGVVTIIGGOAGTNAKIALGLGADVITILDVNPKRLOOLDDLFGGRVHTIMSPLNIELYVKOSDLV

IGAVLIPGAKAPRLVTEDMIKQMKNGSVIIDIAIDQGGIFETTDKITTHDDPTYIKHGVVHYAVANMPGAVPRTSTLA  
LNNATLPYALMLANKGYREAFKSNQPLSLGLNNTYKGVHTNKGVAEAFEMEYKSVEEALQL

**gi|15925843: phosphopentomutase**

GeneID: [1122909](#)

```

1   atgacaagac cattaatcg tgtacattta atcgtaatgg attcagtagg tattgggtgaa
61  gcgccagacg cagctgattt taaagatgaa ggttcacata cttaagaca taccttagaa
121 ggtttcgac aaactttacc aaaccttgaa aagttaggtc tagggaacat cgataaatta
181 ccagtagtaa atgcagttga acaaccagaa gcatactata ctaaattgag tgaagcttca
241 gttgggtaaag atacaatgac tggctactgg gaattatgg gattaaatat tatgcaacct
301 tttaaagtat accctaattg attccctgaa gagttaattc acaaaattga agaaatgaca
361 ggtcgtaaag ttgttgctaa caaacggca tcgggtacgc aaattatcga tgagtggggc
421 gagcaccaaa tgaaaactgg tgacttaatt gttatacaa gtgcagaccc agtattgcaa
481 attgctgcac atgaagacat tatcccatta gaagagtatt atgatatttg tgaaaaggtt
541 cgtgagttga caaaagacc taaatattta attggctcgt tttatcgacg tccatattgtt
601 ggtgaaccag gaaactttac acgtacatct aatcgacatg actatgctgtt aaaaccattt
661 ggtaaaactg tcttagatca ttgaaagac ggtggttatg atgttattgc catcggttaa
721 ataatgaca tttatgatgg tgaagtgta acagaagcgg ttcgtacgaa gagtaacatg
781 gacggtatgg atcaattgat gaaaattggt aagaaagatt tcacaggtat tagcttctta
841 aacttagtag actttgatgc attatacggg catcgctcgtg ataaaccagg ttatgcacaa
901 gcaattaaag atttcgatga tcgcttgcca gaactgttta gcaacttaaa agaagacgat
961 ttagtaatta ttacagcaga ccatggtaat gaccgcagc cggcaggtac ggaccatagc
1021 agagaatata tcccagtaat tatgtacagt ccgaaattta aaggtggtca tgcactagaa
1081 agtgatacta cattcagttc tatcggtgca actatagcag ataatttcaa cgtaacatta
1141 ccagagttcg gtaaaagtta tttaaaggaa ttgaaatag

```

ProteinID: [NP\\_373376.1](#)

MTRPFNRVHLIVMDSVIGIAPDAADFKDEGSHTLRHTLEGFDQTLNLEKLGNGIDKLPVNAVEQPEAYYTKLSE  
ASVGKDTMTGHWEIMGLNMQPFKVPNGFPEELIQQIEEMTGRKVVANKPASGTQIIDEWGEHQMKTGDILIVYTSAD  
PVLQIAAHEDIIPLEELYDICEKVRELTDPKYLIGRIIARPYVGEPEGNFRTRSNRHDYALKPFKTVLHDLKGGYD  
VIAIGKINDIYDGEVTEAVRTRKSNMDGMDQLMKIVKDKFTGISFLNLVDFDALYGHRRDKPGYAQAIKDFDDRLPEL  
FSNLKEDDLVITADHGNDPTAPGTDHTREYIPVIMYSFKFKGGHALESDTTFSSIGATIADNFVNTLPEFGKSYLKE  
LK

**gi|15926547: NAD-specific glutamate dehydrogenase**

GeneID: [1123634](#)

```

1   atgactgaga acaataattht agtaacttct actcaaggaa ttattaaaga agcattgcat
61  aaattgggat ttgacgaagg aatgtacgat ttaattaaag aacctttaag aatgttacia
121 gtgcgtatcc ctgtacgaat ggatgatggc acagttaaaa cattcacagg ttaccgtgcg
181 caacataatg atgctgttgg accaacaanaa gggggcgtgc gtttccaccc agatgttgat
241 gaagaagaag taaaagcatt atcaatgtgg atgactttga aatgtggcat tgtaactta
301 ccatacggtg gtgtaaggg tggtatcgtt tgtgatccac gtcaaatgag cattcatgaa
361 gttgaacggt tatcacgagg atatgtaaga gcaatttcac aattcgtagg tccgaacaaa
421 gatattccag caccagatgt atttacaac tcacaaatta tggcttggat gatggatgaa
481 tatagtgcac tagataaatt taattacca ggtttcatca caggtaaacc aattgtattg
541 ggtggttctc atggacgcca cagatcaact gcaactaggg tagttattgc aattgaacaa
601 gctgcaaaac gtcgtaatat gcaaatgaa ggtgccaagg ttgttattca aggttcggt
661 aatgccggaa gtttcttagc taaattctta tatgatttag gtgcaaaaat tgtaggtatc
721 tctgatgctt acggtgcatt acacgatcca aatggcttag atatagatta tttattagac
781 cgtcgtgata gttttggtac ggtaacaaa tttattgaa aaacaatctc aaataaagaa
841 ttgtttgaat tagattgtga catttttagt ccagcggcta tttcaacaa aattacagaa
901 gacaatgcac atgatattaa agctagtatc gttgttgaag ctgctaattg acctacaaca
961 ccagaagcaa cacgtattht aactgaacgt ggtatattat tagttccaga cgtattagca
1021 agtgctggtg gtgtaacggt ttcttacttc gaatgggtac aaaataatca aggttattat
1081 tggctcgaag aagaagtaaa tgaaaagcta cgtgaaaaat tagaagcggc atttgacacg
1141 atttacgaat tgtctcaaaa tcgaaaaata gatatgagac ttgcagcata tatcataggt
1201 attaaacgta cagcagaagc agctagatat cgtggttggc cataa

```

ProteinID: [NP\\_374080.1](#)

MTENNNLVSTQGIKEALHKLGFDEGMYDLIKEPLRMLQVRIIPVRMDDGTVKFTFTGYRAQHNDVAVGPTKGGVRFHPD  
VDEEVKALSMWMTLKCIVNLPYGGGKGIIVCDPRQMSIHEVERLSRGYVRAISQFVGNPKDIPAPDVFTNSQIMAW  
MMDEYSALDKFNSPGFITGKPIVGGSHGRDRSTALGVVIAIEQAARRNMQIEGARVVIQGFNAGSFLAKFLYDLG  
AKIVGISDAYALHDPNGLDIDYLLDRRDSFGTVTNLFEETISNKELFELDCDILVPAAISNQITEDNAHDIKASIVV  
EAANGPTTPEATRILTERGILLVDPVLAAGVTVSYFEWVQNNQGYWSEEEVNEKLEKLEAAFDTIYELSQNRKI  
DMRLAAYIIGIKRTAEARYRGWA

**gi|15928230: hypothetical protein, similar to autolysin precursor**

GeneID: [1125366](#)

```

1   atgcctaaaa ataaaaat tttt attttatttg ctatcaacta cgctcgtatt acctacttta
61  gttttcaccta ccgcttatgc tgatacacct caaaaagata ctacagctaa gacaacatct
121 catgattcaa aaaaatctaa tgacgatgaa acttctaagg atactacaag taaagatact
181 gataaagcag acaacaataa tacaagtaac caagacaata acgacaaaaa attttaaact
241 atagacgaca gcacttcaga ctctaacaat atcattgatt ttatttataa gaatttacca
301 caaaccaata taaaccaatt gtaacacaaa aataaatagc atgataatta ctcattaaca
361 actttaatcc aaaacttatt caatttaaat tccgatatatt ctgattacga acaacctcgt
421 aatggcgaaa agtcaacaaa tgattcgaat aaaaacagtg acaatagcat caaaaatgac
481 actgatacgc aatcatctaa acaagataaa gcagacaatc aaaaagcacc taaatcaaac
541 aatacaaac caagtacatc taataagcaa ccaaatcgc caaagccaac acaacctaat
601 caatcaaaata gtcaaccagc aagtgcagat aaagcaaatc aaaaatcttc atcgaaagat
661 aatcaatcaa tgtcagattc ggctttagac tctattttgg atcaatacag tgaagatgca
721 aagaaaacac aaaaagatta tgcattctca tctaaaaaag acaaaaatga aaaatctaat
781 acaagaatc cacagttacc aacacaagat gaattgaaac ataatctaa acctgctcaa
841 tcattcaata acgatgttaa tcaaaaggat acacgtgcaa catcattatt cgaacagat
901 cctagtatat ctaacaatga tgatagcggc caatttaacg ttgttgactc aaaagataca
961 cgtcaatttg tcaaatcaat tgctaaagat gcacatcgca ttggtcaaga taacgatatt
1021 tatgctctg tcatgattgc ccaagcaatc ttagaatctg actcaggtcg tagtgcttta
1081 gctaaagtc caaacataa tttattcggg atcaaagtg cttttgaagg gaattctggt
1141 ctttttaaca cattagaagc tgatggtaat aaattgtata gtattaatgc tggattccga
1201 aatatccaa gcacgaaaga atcactaaaa gattactctg acctattaa aaatggtatt
1261 gatggcaatc gaacaattta taaaccaaca tggaaatcgg aagccgattc ttataaagat
1321 gcaacatcac acttatctaa aacatatgct acagatccaa actatgctaa gaaattaaac
1381 agtattatta aacactatca attaactcag ttgacgatg aacgcatgcc agatttagat
1441 aaatatgaac gttctatcaa ggattatgat gattcatcag atgaattcaa acctttccgc
1501 gaggtatctg atagtatgcc atatccacat ggccaatgta cttggtacgt atataaccgt
1561 atgaaacaat ttggtacatc tatctcaggt gatttaggtg atgcacataa ttggaataat
1621 cgagctcaat accgtgatta tcaagtaagt catacaccia aacgtcatgc tgctgttgta
1681 ttgaggctg gacaatttgg tgcagatcaa cattacggtc atgtagcatt tgttgaaaaa
1741 gttaacagtg atggttctat cgttatttca gaatccaatg ttaaaggatt aggtatcatt
1801 tctcatagaa ctatcaatgc agctgccgct gaagaattat catatattac aggtaaata

```

ProteinID: [NP\\_375763.1](#)

MPKNIKILYLLSTTLVLVPTLVSPAYADTPQKDTTAKTTSHDSKKSNDDETSKDTTSDKTDKADNNTSNQDNNDKFK  
KTIDSTSDSNIIIDFIYKNLPQTNIQLLTKNKYDDNYSLTTLIQNLFNLNSDISDYEQPRNGEKSTNDSNKNSDNS  
IKNDTDTQSSKQDKADNQKAPKSNNTKPKSTSNKQPNPKPTQPNQSNQSPASDDKANQKSSSKDNQSMDSALDSILD  
QYSEDAKKTQKDYASQSKDKNEKSNTKNPQLPTQDELKHKSKPAQSFNNVDVQKDRATSLFETDPSISNNDGSGQF  
NVVDSKDRQFVKSIAKDAHRIGQDNDIYASVMIAQAILESDSGRSALAKSPNHNLFGIKGAFFEGNSVFPNTLEADGN  
KLYSINAGFRYPSTKESLKDYSDLIKNGIDGNRTIYKPTWKSEADSYKDATSHLSKTYATDPNYAKKLNLSIKHYQL  
TQFDDERMPDLKDYERSIKDYDDSSDEFKPFREVSDSMPYPHGQCTWYVYNRMKQFGTSSISGDLGDHNWNNRAQYRD  
YQVSHTPKRHAADVFEAGQFGADQHYGHVAFVEKVNDSGSIIVISESNVKGGLGII SHRTINAAAAEELSYITGK

[gij14247509/gij15927314](#): chorismate mutase homolog

GeneID: [1124404](#)

```

1   ttattttaac tttttagcgt tatataaatc agctaaagcc ttttaattcat cataaaatgc
61  ttggaattca tctaaatcca tttgttgacc cgcactacta agtgaacag atggatctgg
121 atgcacctca gccataactc catcagcacc aactgctaata gctgctttcg cagttggtaa
181 catgatattc ttacgacctg tactatgcgt aacatctacc atgactggta agtgtgtacc
241 ttgttttaaa attggtactg ctgaaatata taaagtgtta cgtgtgcgct tttcataagt
301 tcggattcca cgttcacata aaataatggt ttgattacct tgtgaagcaa tgtattcagc
361 tgcataaaca aactcttcga ttgtagcaga taaaccacgt tttaatagaa taggcttttt
421 cgtacggcca gcttctttta ataactcgaa gttttgcata ttacgtgcac caatttgtaa
481 tacgtctaaa tactcatcag ccacttcaaa atcatttggc tttacgattt cgctgacaac
541 atttaaatca tatttatctt taatctgttt aagtatttta agtcttcaa cacctaggcc
601 ttggaatca tatggtgatg tacgtggttt aaatgcaccg ccacgaataa atttttcacc
661 tttagcatgt aagttttttag caacagcttc aactgttca aatgattcaa ctgaacatgg
721 cccaaataca aatgatttat tgccgtctcc aataatgccc ccattatcaa atgttacaat
781 cgtatcttca ggtttcaact tacgtgatac gtataagtgt ttttcatttt cagatttttg
841 taaatctgta gaggctttaa aaatttcttt aaataattgc ttaattgtat tatcgttaaa
901 tggctctttg ttgctatcaa ttaagtcggt aagcatttct ttttcgctgt gtggatcata
961 gatcagtgta cctgttttta attttctctc cccaattttt tgtgctagtt caccagttt
1021 agataataaa tctaaaat ttt gatgattcag tgagacaatc tcacttctgt atgattctaa
1081 tttattactc at

```

ProteinID: [NP\\_374847.1](#)

MSNKLESYRSEIVSLNHQILDLLSKRGELAQKIGEEKLKQGTRIYDPQREKEMLNLDLSDSNKGFNDNTIKQLFKEIF  
KASTDLOKSENEKHLVSRKLPEDTIVTFDNGGIIGDGNKSFVFGPCSVESFEVEAVAKNLHAKGKFIIRGGAFKP

RTSPYDFQGLGVEGLKILKQIKDKYDLNVVSEIVNPNDFEVADEYLDVFIQIARNMQNFELLKEAGRTPKPIILLKRL  
 SATIEEFVYAAEYIASQGNQNIILCERGIPTYEKATRNLTLDISAVPILKQGTHTLPVMVDVTHSTGRKDIMLPTAKAAL  
 AVGADGVMAEVPDPSVALSDAGQQMDLDEFQAFYDELKPLADLYNAKKLK

### gi|15927670: hypothetical protein, similar to SceD precursor

GeneID: [1124799](#)

```

1   ttatgcagta acccaatgtc cagcgcacc agtgttatat aatthtactg ctgcggcatc
61  ttgaacactt tcaggagcat ttgctggtga tacaccttta tatttagcag gtgctactga
121 atcccaagtt gattgtaaga attgatactt accagctgca cctgatgttg gatttacagc
181 atgaatattg ccacctgatt cacgttgagc aatttgtttt agatgagcat tcacatttac
241 tgatgaacct tctgatgctt ttgattcagt tgggtgtgca gtaacttvtg aattgtttga
301 tgttgatgct tgtggttggt gagtttgagc atthtvtggt gtttcaactt ctvtgtgattg
361 tacttgatta gcttgaacag ctgatggttc aacattatta gttgcagvtg ctvtgtgact
421 catgtttgct ccatttagcag ctgttgcatg gtaattccaa gcaaagvtg taccatctga
481 ttcaaagvtg taagtaaac ctcatagtc aaatgtataa ttataagccc cagcttcaat
541 tggthtttga tttaatgttt gatcatttga ttgvcgcaat tgcgctaaag atgctthtatt
601 taagtccgct tcaactvtgat gggctvtgvt acvtgcaatt ctvtgctaca ttcttaaac
661 tactgctaat gatgatgca gtaatgtttt ctvtat

```

ProteinID: [NP\\_375203.1](#)

MKKTLASSLAVGLGIVAGNAGHEAHASEADLNKASLAQMAQSNQTLNQKPIEAGAYNYTFDYEGFTYHFESDGTHTF  
 AWNYHATGANGANMSAQAPATNNVEPSAVQANQVQSQEVEAPQNAQTQQPQASTSNNSQVTATPTESKASEGSSVNVN  
 AHLKQIAQRESGNIHAVNPTSGAAGKYQFLQSTWDSVAPAKYKGVSPANAPESVQDAAAVKLYNTGGAGHWVTA

### gi|15923892: hypothetical protein

GeneID: [1120877](#)

```

1   atggacatag aattaacaaa aaaagatggt actgtaatca aattaagtga atacgggttt
61  atcgthaacg atatagtaat tgatagtatg caaatcaaca caaagvtaca agataaagaa
121 aatataaacg gtcgtatatt aatggggagc aattatatca gtagagatat agthgttctt
181 tgtthttvtg tggtaaaaaa tvcgttcagac atthgtttata tvcgagatat gthgtattvcg
241 ttaacgacag acatagaacc tatgtatttg cgagaaataa gaagaaaaga agagthtaag
301 tacagthtta ctcaaccaat thctgatgat tacgtgaaat tagataaaaa caacttcccg
361 gattatgaaat attcaagaca cgatcaacaa aattatgtaa atggtaaaaa gtataaagth
421 atthtttaacg gagthtataa ccctaaacaa aaagthtaata aagthttcttt tgaactaaaa
481 ttcgaaacta cagaattacc atacggtgaa agtatthgaa caagcctaga gthtagaagaa
541 aacaaaaaggt thggattvtg gtcgthvtgat thtaatatthg atthggcatgc agcgggagac
601 aaaaagaaggt atacattthg aaattthgagc aaagthtacag thtactatca thgtagthgt
661 cctaacgacc aattcaacat gtataaaaaa ataacaatta ththtagcga agatacagaa
721 tvcgthvtgat ggaatttaac gcatgctgaa ataathgaaa tvcgaaggtat caaactaaaa
781 actggagaca gaattthtta tgatagcttc cvagthttata aaaacggtgt tgaataaagth
841 accgaaacga atatagccca accaaaattt aaatacggag ctaataaatt thgattthaat
901 caaacggtac aaaaagthca gththgatttg aaattthatt athagthg

```

ProteinID: [NP\\_371426.1](#)

MDIELTKKDGTVIKLSEYGFIVNDIVIDSMQINTKYQDKENMNGRILMGSNYISRDIVVPCFCVVKNRSDIAYMRDML  
 YSLTLDIEPMLREIRRKEELNYRFTQPIISDDYVKLDKNNFPDYEYSRHDQQNYVNGKQYKVFNGVINPKQKGNKVS  
 FELKFETELPYGESIGTSLELEENKVGWLSDFDNIWDHAGGDKRKYTFENLSKGTVYYHGSAPNDQFNMYKKITII  
 LGEDTESFVWNLTHAEIMKIEGILKLTGDRIVYDSFRVYKNGVEISTETNIAQPKFRYGANKFEFNQTVQKQVFDLKF  
 YYK

### gi|15926841: uridylate kinase

GeneID: [1123932](#)

```

1   atggctcaaa tttctaaata taaacgtgta gthttgaaac taagtgtgta agcgttagct
61  ggagaaaaag gattthgcat aaatccagta attattaaaa gtgttgctga gcaagthgct
121 gaagthgcta aaatggactg tgaatvcgca gtaatvcgtg gtggcggaaa cattthggaga
181 ggtaaaaacg gtagthgactt aggtatggac cvgtggaactg ctgattacat gggthgctt
241 gcaactgtaa tgaatvcctt agcattacaa gatagthtag aacaattgga thgtgataca
301 cvagthttaa catctattga aatgaagcaa gtggctgaa cttatattvcg thgtvcgtgca
361 attagacact tagaaaagaa acgvcgtagth atthttgctg caggtattgg aaaccatac
421 thctctacag atactacagc ggcattacgt gctgcagaag thgaagcaga thgtattthta
481 atgggcaaaa ataathgtaga thgtgtatatt thctgcagatc ctaagthtaa caaagthgcv
541 gtaaatatg aacattthaac gcatattcaa atgctthcaag aagthttaca agthaatggt
601 tcaacagcat cctcattthg thgtgataat aacattvcgt thactgthtt ctctattthg
661 gaagaaggtg atattaaacg thgtgtthtag ggtgaaaaa taggtacgtt aattacaaaa
721 taa

```

ProteinID: [NP\\_374374.1](#)

MAQISKYKRVVLKLSGEALAGEKGFGINPVIKSVAEQVAEVAKMDCIEIAVIVGGGNIWRGKTGSDLGMDRGTADYMG  
MLATVMNALALQDSLEQLDCDTRVLTSIEMKQVAEPYIRRRAIRHLEKKRVVIFAAGIGNPYFSTDTTAAALRAAEVEA  
DVILMGKNNVDGVYSADPKVNKDAVKYEHLETHIQMLQEQGLQVMDSTASSFCMDNNIPLTVFVIMEEGNIKRAVMGEKI  
GTLITK

**gi|15926838: transcriptional repressor CodY**GeneID: [1123929](#)

```

1   atgagcttat tatctaaaac gagagagtta aacacgttac ttcaaaaaaca caaaggtatt
61  gcggttgatt ttaaagatgt agcacaaaacg attagtagcg taactgtaac aaatgtattt
121 attgtatcgc gtcgaggtaa aattttaggg tcgagtctaa atgaattatt aaaaggtcaa
181 agaattattc aaatgttga agaaagacat attccaagtg aatatacaga acgattaatg
241 gaagttaaac aaacagaatc aaatattgat atcgacaatg tattaacagt attcccacct
301 gaaaacagag aattattcat agatagtcgt acaactatct tcccaatttt aggtggagga
361 gaaagattag gtacattagt acttggtcga gtacatgatg attttaatga aaatgatttg
421 gtactaggtg aatatgctgc tacagttatt ggtatggaaa tcttacgtga gaagcatagt
481 gaagtagaaa aagaagcgcg cgataaagct gctattacaa tggcaattaa ttcattatct
541 tattctgaaa aagaagcgat tgaacatatt tttgaagaac tggcggtac ggaaggccta
601 ttaatcgcat caaaagttgc agatagagtt ggtattacta gatctgtaat tghtaaatgca
661 ctacgtaaat tagaaagtgc tgggtgaatt gaatcacggt ctttaggaat gaaaggtact
721 ttcattaag   ttaaaaaaga   aaaattctta   gatgaattag   aaaaaagtaa   ataa

```

ProteinID: [NP\\_374371.1](#)

MSLLSKTRELNLLQKHKGIAVDFKDVAQTISSVTVTNVFIIVSRGKILGSSLNELLSQRIQMLEERHIPSEYTER  
LMEVKQTESNIDIDNVLTVFPENRELFIDSRTTIFPILGGGERLGTLLVLRVHDDFNENDLVLGEYAATVIGMEILR  
EKHSEVEKEARDKAAITMAINSLSYSEKEAIEHIFEELGGTEGLLIASKVADRVGITRSVIVNALRKLESAGVIESRS  
LGMKGTFIKVKKEKFLDELEKSK

**gi|14247601/gi:15927403: enterotoxin SEM**GeneID: [1124490](#)

```

1   tcaactttcg tccttataag atatttctac atctaaatgg aatttttcag ttcgacagt
61  tttgttgatc ttatatattt ttaagaaact ttcagcttgt cctgttccag tatcaaaaaa
121 gtcataagaa aatgatgaac catcattcaa atgaaataat atttttcctg cattaatcct
181 agaactaaat tttgacttat taccataatt tcttctttta tttgtatcat taaagccata
241 aatattatat tcttcttgta gatattctct taatttagta tcaatttctt gagctgttac
301 taacttttta ttagttgata cttgtgcagt agatataagt tgatgttctc catcaacca
361 aagattaata ggaatacgtc tagatttctc taataaatca cctgctaatag taactccacc
421 gtatatatat ttgtttttca acaaatatcc actataactt agaccatata catctacagc
481 atgatttttg aatttcttta catcatcaac gttcttaaat tcagctgta cgtcgaatt
541 atccatagaa aaaactaatt gatgcgaaag atgattattt tcaggattaa tactttgggt
601 gtcttcaatt gtagagctac cataatagtt cctaagattc aaaactccga catcagcgg
661 tgcgatatga tttgccaat agcaaaaaca taaaacaaca atgataagta ttcttttcat

```

ProteinID: [NP\\_374936.1](#)

MKRILIIIVLFLFCYSQNHAIATADVGLNLRNYYGSYPEDHQSIINPENNHLSHQLVFSMDNSTVTAEFKNVDDVKFK  
NHAVDVYGLSYSGYCLKNKIYGGVTLGADYLEKSRRIPIINLWVNGEHQTISTDKVSTNKKLVTAQEIDTKLRRYLQE  
EYNIYGFNDTNKGRNYGNKSKFSSGFNAGKILFHLNDGSSFSYDLFDTGTGQAESFLKIYNDNKTVETEFHLDVEIS  
YKDES

**gi|15926324: ferrichrome transport ATP-binding protein**GeneID: [1123409](#)

```

1   atgaatcggt tgcattgaca acaagttaaa attggttacg gggataaac gattataaat
61  aaattagatg ttgaaatacc agatggcaaa gtgacgtcaa tcattggtcc taacggctgc
121 gggaaatcta ctttgctaaa ggcattgtca cgtttattgg cagttaaaga aggcgaagta
181 tttttagatg gtgaaaatat tcatacacia tctacgaaag agattgcaaa aaaaatagcc
241 attttacctc aatcacctga agtagcagat ggcttaactg ttggggaatt agtttcatat
301 ggtcgttttc cacatcaaaa aggatttggg agattaactg ctgaggataa gaaagaaatt
361 gattgggcaa tggaaagttac aggaactgat acattccgac accgttcaat caatgattta
421 agtgggtggtc aaagacaacg tgtttggatt gcaatggcat tagcacaag aactgatatt
481 atctttttag acgaaccaac aacatattta gatattctgc atcaattaga aatactagaa
541 ttagttcaga agctaaatca ggaacaaggt tgtacaattg tcatggttct tcatgatatt
601 aaccaagcga ttcgtttctc agatcatctt attgcatgga aagaagggga tatcatcgct
661 acaggttcaa cagaagacgt attaacacag gaaatattag aaaaagttt taatattgat
721 gttgttttta gtaaagatcc taaaactgga aaacctttac tggtactta tgacttatgt
781 cgcagagctt attcttaa

```

ProteinID:[NP\\_373857.1](#)

MNRLHGQOVKIGYGDNTIINKLDVEIPDGKVTSTIIGPNGCGKSTLLKALSRLAVKEGEVFLDGENIHTQSTKEIAKK  
IAILPQSPEVADGLTVGELVSYGRFPHQKGFRLTAEDKKEIDWAMEVTGTDTRFRHSINDLSGGQRQRVWIAMALAQ  
RTDIIIFLDEPTTYLDICHQLEILELVQKLNQEQGCTIVMVLHDINQAIRFSDHLIAMKEGDIATGSTEDVLTQETLE  
KVFNIDVVLKDPKTKGPLLVTYDLCRAYS

**gi|15928275: hypothetical protein**GeneID:[1125411](#)

```

1   atgaactatc aagttctttt atattataaa tatacgcaga ttgatgacc  tgaacagttt
61  gtcaggatc  acttagcgtt ttgcaaagca caccatttaa aaggtagaat tcttgtttct
121 acagaagga  ttaacggcac attatctggt acaaaagaag aaaccgaaca atatatggca
181 catatgcatg ccgatgaacg attcaaagat atgggtttaa aaattgatga agctgaagga
241 catgctttaa agaaaatgca tgtacgtcct cgaaaagaaa tcggttgctt agatttagaa
301 gatgacgtcg atccaagaca cacaactggc caatatttat cacctgtaga atttagaaaa
361 gctcttgaag atgatgacac agtcattatt gatgcacgta atgattatga atttgattta
421 ggtcatttcc gaggtgcaat tcgcccagac atcacacgct ttagagattt acctgactgg
481 attaaagaga ataaagcgtt atttacagat aaaaaagtgg ttacgtactg tacagggtggc
541 attcgatgtg aaaaattttc tggatggcct ttaaaagaag gtttcgaaga tgtagcgcag
601 cttcacggcg gtatagctac atatggtaaa gaccctgaaa caaaaggcca atattgggac
661 ggtaaaatgt atgtatttga tgcgtatc agtgttgata tcaaccaagt tgaaaaaaca
721 attattggta aggattgggt tgatggcaaa ccatgtgaac gttatattaa ttgctgtaac
781 ccagaatgta ataaacaaat attagtttct gaagaaaacg aactaaata tttagggtgca
841 tgctcttatg aatgtgctaa acatgagcgt aatcgttatg tcaagcaaa taatattagt
901 gataatgagt ggcaacaacg ttaacaacac tttgatgatt tacatcaaca tgcttag

```

ProteinID:[NP\\_375808.1](#)

MNYQVLLYYKYTTIDDPQFAQDHLAFCKAHLKGRILVSTEGINGTSLSGTKEETEQYMAHMHADERFKDMVFKIDEA  
EGHAFKMHVRPRKEIVALDLEDDVDPRHRTGQYLSVPEFRKALEDDDTVIIDARNDYEFDLGHFRGAIRPDITRFRD  
LPDWIKENKALFTDKKVVYCTGGIRCEKFSGWLLKEGFEDVAQLHGGIATYKDPETKQYWDGKMYVFDRIISVDI  
NQVEKTIIGKDFWDGKPCERYINCANPECNKQILVSEENETKYLGACSYECAKHERNRYQANNISDNEWQORLTNFD  
DLHQHA

**gi|15926178: 50S ribosomal protein L25**GeneID:[1123250](#)

```

1   atggcttcat taaagtcaat catccgtcaa ggtaaaacaaa cacgttcaga tcttaacaaa
61  ttaagaaaat ctggtaaagt accagcagta gtatacgggt acggtactaa aaacgtgtca
121 gttaaagttg atgaagttag attcatcaaa gttatccgtg aagtaggtcg taacgggtgtt
181 atcgaattag gcgttggttc taaaactatc aaagttatgg ttgcagacta ccaattcgat
241 ccacttaaaa accaaattac tcacattgac ttcttagcaa tcaatagag tgaagaactg
301 actggtgaag taccagttca attagttggt gaagcagtag gcgctaaaga aggcggcgta
361 gttgaacaac cattattcaa cttagaagta actgctactc cagacaatat tccagaagca
421 atcgaagtag acattactga attaaacatt aacgcagatt taactgttgc tgatgttaaa
481 gtaactggcg acttcaaaat cgaaaacgat tcagctgaat cagttgtaac agtagttgct
541 ccaactgaag aaccaactga agaagaatc gaagctatgg aaggcgaaca acaactgaa
601 gaaccagaag ttgttgcgca aagcaagaa gacgaagaaa aaactgaaga gtaa

```

ProteinID:[NP\\_373711.1](#)

MASLKSIIIRQKQTRSDLKQLRKSGKVPVAVYGYGTKNVSVKVDVEFEIKVIREVGRNGVIELVGVGSKTIKVMVDYQ  
FDPLKNQITHIDFLAINMSEERTVEVPVQLVGEAVGAKEGGVVEQPLFNLEVTATPDNIPEAIEVDITELNINDSLTV  
ADVKTGDFKIENDSAESVVTVAPTEEPTEEEIEAMEGEQQTEPEVVGESKEDEEKTEE

**gi|15926451: triosephosphate isomerase**GeneID:[1123537](#)

```

1   atgagaacac caattatagc tggtaactgg aaaatgaaca aaacagtaca agaagcaaaa
61  gacttcgtca atgcattacc aacattacca gattcaaaag aagtagaatc agtaatttgt
121 gcaccagcaa ttcaattaga tgcattaact actgcagtta aagaaggaaa agcacaaggt
181 ttagaaatcg gtgctcaaaa tacgtatttc gaagataatg gtgcttccac aggtgaaacg
241 tctccagttg cattagcaga tttagcgttt aaatacgttg ttatcggtca tctgaaactg
301 cgtgaattat tccacgaaac agatgaagaa attaacaacaa aagcgcacgc tattttcaaa
361 catggaatga ctccaattat ttgtgttggt gaaacagacg aagagcgtga aagtggtaaa
421 gctaacgatg ttgtaggtga gcaagttaag aaagctgttg caggtttatc tgaagatcaa
481 cttaaatcag ttgtaattgc ttatgagcca atctgggcaa tcggaactgg taaatcatca
541 acatctgaag atgcaaatga aatgtgtgca tttgtacgtc aaactattgc tgacttatca
601 agcaagaag  tatcagaagc aactcgtatt caatatggtg gtagtggttaa acctaacaac
661 attaaagaat acatggcaca aactgatatt gatggggcat tagtaggtgg cgcatacatt
721 aaagttgaag atttcgtaca attgtagtaa ggtgcaaaat aa

```

ProteinID:[NP\\_373984.1](#)

MRTPIIAGNWKMNKTVQEAKDFVNALPTLPDSKEVESVICAPAIQLDALTTAVKEGKAQGLEIGAQNTYFEDNGAFTG  
 ETSPVALADLVKYVVIHGSERRELFHETDEEINKKAHAIFKHGMPTPIICVGETDEERESGKANDVVGEQVKKAVAGL  
 SEDQLKSVVIAYEPIWAIGTKSSTSEDANEMCAFVRQTIADLSKEVSEATRIQYGGSVKPNNIKEYMAQTDIDGAL  
 VGGASLKVEDFVQLLEGAK

**gi|13701328/gi|15927110: Xaa-Pro dipeptidase**

GeneID: [1124200](#)

```

1   ttatggttaa actataaggt cttttgtgca tttagtaaag acttgacaac cttttctgt
61  aattaaata tcatcttcta ttcttatacc gcccaaacct tctatataaa caccaggttc
121 tactgtaaca cagttggttaa cttgaaagttt atcttgatc gtacgagcca gcattggccc
181 ttcattggatt tctaaaccaa taccatgtcc tagtgaatgt ccaaattctt ttccataacc
241 ttttgactct aaatagtttc ttgaaatggc atcagcttct gcaccagtca tgccaggctc
301 aatctcatta attgctttca tttgagattc aagtactatt tgatatattt ctttcagttt
361 aggatctggt tctccaatag caaatgttct agtaatatct gaacaatagc cgttataata
421 cgcgccaaaa tctaagttaa tcatgtcgcc tttttcaata attttatcac ttgcaacacc
481 atgtggtaat gcacctctat gaccagatgc tacaatcgta tcaaatgatg gtccatctgc
541 tcctaattct agcattttac tttctaatat tgcctttaat tctttttcag tcataacctgc
601 ttttacaaca gttaaaatat attcatatgt ttcatcaaca atattagctg ctttttgaat
661 taaagcaatt tcgcaacat ctttgacgtc tctaatttta tctacagtat tagaaatgct
721 tattaatgat atacggcttt tatttaattc aaggtagtga tcataactta catgatgccc
781 ctcaaaacct atattttcaa aattttcttg gtgtagcaat tctttaatct caccaataat
841 agtagattta cgattaataa tttcataatt tggcgcctgc ttagttgctt gatcaatata
901 tctaaagtct gttatcaaat attgtttatc tttagatatg ataagtgtc cactggtacc
961 agtaaacct gataaatatc ttctattgta atccgaaaga atgataatcg catctaaatg
1021 tttttgttct aaaatacgat gcacttgtgt tattctgctc at

```

ProteinID: [NP\\_374643.1](#)

MSRITQVHRILEQKHLDAIIILSDYNRRYLSGFTGTSGALIIISKDKQYLITDFRYIDQATKQAPNYEIIINRKSTIIGE  
 IKELHQENFENIGFEGHHVSYDTYPELNLKSRIISLISISNTVDKIRDVKDVDEIALIQKAANIVDETYEYLLTVVKAG  
 MTEKELKAILESKMLELGADGPSFDTIVASGHRGALPHGVASDKIIIEKGMITLDFGAYYNGYCSDIITRTFAIGEPDP  
 KLKEIYQIVLESQMKAINIIRPGMTGAEADAI SRNYLESKGYGKEFGHSLGHGIGLEIHEGPM LARTIQDKLQVNNCV  
 TVEPGVYIEGLGGIRIEDDILITENGCVFTKCTKDLIVLT

## Lebenslauf

### Eva Glowalla

geboren 13.09.1976  
in Groß-Strehlitz  
deutsche Staatsangehörigkeit

### Hochschulbildung

- seit 2002 Promotionsstudium am Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der Universität zu Köln  
Thema: „Proteomanalytische Identifizierung protektiver Vakzinekandidaten von *Staphylococcus aureus*“
- 1996-2002 Studium der Biologie an der Universität zu Köln;  
Studienschwerpunkte: Genetik, Biochemie und Pharmakologie;  
Diplomarbeit am Institut für Genetik bei Prof. Dr. J. C. Howard; Thema: „Identifizierung und Analyse IIGP-1 verwandter p47 kDa GTPasen in der Maus“;

### Schulbildung

- 1994-1996 Landrat-Lucas-Gymnasium in Leverkusen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1991-1994 Werner-Heisenberg-Gymnasium in Leverkusen
- 1988-1991 Liebfrauen-Gymnasium in Mühlhausen

### Publikationen

Cemalettin Bekpen, Julia P Hunn, Christoph Rohde, Iana Parvanova, Libby Guethlein, Diane M Dunn, **Eva Glowalla**, Maria Leptin, and Jonathan C Howard  
*“The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage.”*  
Genome Biol. 2005;6(11):R92. Epub 2005 Oct 31.

**Eva Glowalla**, Bettina Tosetti, Oleg Krut, Martin Krönke  
*“Proteomics-based Identification of Cell Wall-associated Proteins as Protective Vaccine Candidates against Staphylococcus aureus”*  
Infect Immun - submitted 2007 Aug

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität Köln unter Leitung von Prof. Dr. M. Krönke angefertigt und von Herrn Dr. O. Krut wissenschaftlich betreut. Die wissenschaftliche Betreuung der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln erfolgte durch Herrn Prof. Dr. J.C. Howard.

Für die wertvollen Diskussionen, wissenschaftlichen Ideen und das in mich gesetzte Vertrauen möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. M. Krönke und Herrn Dr. O. Krut bedanken. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. J.C. Howard für die Übernahme der Betreuung der Dissertation und die Anfertigung des Gutachtens.

Jasmin Herz, Annabelle Schnaith, Danni Grumme und Sonja Leggio danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, ein tolles Arbeitsklima sowie für fachliche aber auch private Unterschätzung. Insbesondere möchte ich mich bei Oleg Krut für die freundschaftliche Zusammenarbeit und sein wissenschaftliches Engagement bedanken. Einen Dank ganz besonderer Art möchte ich schließlich an Tina Tosetti richten, die mich in den letzten 3 Jahren nicht nur als eine ausgezeichnete Kollegin begleitet hat, sondern mir auch als Freundin mit Tat und Rat immer zu Seite stand.

Olaf Utermöhlen, Katu Bernardo, Norbert Pakulat, Nikola Baschuk, Ulrike Carow, Michael Schramm, Hamid Kashkar, Benjamin Yazdanpanah, Carola Pongratz sowie allen Mitarbeitern des mikrobiologischen Institutes danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ständige Diskussionsbereitschaft und kreative Anregungen.

Ein besonderer Dank gilt schließlich Axel Tophoven, meiner Familie, Claudette Soumahoro sowie Jolante Bartylla, also den Personen, welche während der gesamten Zeit immer für mich und meine Sorgen ein offenes Ohr hatten, mir stets zu Seite standen und immer für mich da waren.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Martin Krönke und Prof. Dr. J.C. Howard betreut worden.