

ulm university universität ulm

Entwicklung eines Therapieansatzes zur Behandlung des Pankreaskarzinoms mit rekombinanten clostridiellen Endosporen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von
Sandra Mareike König
aus Ludwigshafen

Ulm, 2011

ulm university universität ulm

Entwicklung eines Therapieansatzes zur Behandlung des Pankreaskarzinoms mit rekombinanten clostridiellen Endosporen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von
Sandra Mareike König
aus Ludwigshafen

Ulm, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Dürre angefertigt.

Amtierender Dekan: Prof. Dr. A. Groß

Erstgutachter: Prof. Dr. P. Dürre

Zweitgutachter: Prof. Dr. B. Eikmanns

Tag der Promotion: 04.04.2012

Sollte dieses Leben kein ernsthafter Kampf sein, der, so man ihn gewinnt, in alle Ewigkeit eine Bereicherung für das gesamte Universum darstellt, wäre es nichts als eine Schmierenkomödie, die ein jeder nach Belieben verlassen kann.
Aber mir kommt es vor wie ein ernsthafter Kampf.

(Wiliam James)

Für meinen Dad.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung……1
2. Material und Methoden…….....8
2.1. Materialen……..……..……..……8
2.1.1. Chemikalien……..……..……..…..8
2.1.2. Gase……..……..…….....8
2.1.3. Enzyme…….…….....……9
2.1.4. Molekularbiologische Hilfsmittel……..……10
2.1.5. Geräte……..……...……11
2.2. Bakterienstämme……..…….....……14
2.3. Plasmide……15
2.4. Oligodesoxynukleotide……18
2.5. Zellanzucht……21
2.5.1. Nährmedien für *E. coli*……...21
2.5.2. Nährmedien für *C. acetobutylicum*……...……..……22
2.5.3. Nährmedien für *C. sporogenes*……...……25
2.5.4. Medienzusätze……..……..26
2.5.4.1. Antibiotika……...26
2.5.4.2. Sonstige Medienzusätze……..27
2.5.5. Anzuchtbedingungen……27
2.5.6. Stammhaltung……28
2.5.7. Sporenpräparation……28
2.5.8. Bestimmung von Wachstumsparametern……...……..29
2.6. Arbeiten mit DNA……29
2.6.1. Behandlung von Lösungen und Geräten……..29
2.6.2. Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien……29
2.6.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ und „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“……..29
2.6.2.2. Plasmidpräparation aus *C. sporogenes* mittels „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“……30
2.6.2.3. Isolierung von Gesamt-DNA aus *C. acetobutylicum*…….……...30

2.6.2.4. Isolierung von DNA aus *C. acetobutylicum* mittels „innuSPEED Bacteria/Fungi Kit“……31
2.6.3. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren……31
2.6.3.1. Phenol-Chloroform-Extraktion……31
2.6.3.2. Ethanolfällung……32
2.6.3.3. Dialyse von DNA-Lösungen……32
2.6.3.4. Reinigung und Konzentrierung von DNA aus Lösungen mittels „NucleoSpin® Extract II“, „UltraClean™15 DNA Purification Kit“ und „DNA Clean & Concentrator™-5 Kit“……33
2.6.3.5. Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen mittels „NucleoSpin® Extract II“ und „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“……33
2.6.4. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten……34
2.6.4.1. Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese……34
2.6.5. Färbung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen……35
2.6.6. Größenbestimmung von Nukleinsäuren……36
2.6.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren……36
2.6.8. Enzymatische Modifikation von DNA……37
2.6.8.1. Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen……37
2.6.8.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al*., 2001; mod.)……37
2.6.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten (Weiss *et al*., 1968)……38
2.6.9. Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion……39
2.6.9.1. Synthetische Oligodesoxynukleotide……39
2.6.9.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)……39
2.6.9.3. „PureTaq Ready-to-Go PCR-beads-Kit“ (Amersham Bioscience)……41
2.6.9.4. Kolonie-PCR……41
2.6.9.5. Einfügen von Restriktionsschnittstellen……42
2.6.9.6. TA-Klonierung von PCR-Produkten……42
2.6.10. Sequenzierung von DNA……42
2.7. Arbeiten mit RNA……43
2.7.1. Vorbehandlung von Lösungen, Geräten und Materialien……43
2.7.2. RNA-Isolierung mittels „Mini RNA Isolation II Kit”……43
2.7.3. RNA-Isolierung mittels „RNeasy® Midi Kit“……43
2.7.4. DNase-Verdau……44

2.7.5. Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA mit anschließender Ethanolfällung……44
2.7.6. RNA-Isolierung mittels Trizol…….....…45
2.7.7. RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)……46
2.8. DNA-Transfer in Bakterien…….....……47
2.8.1. Transformation von *E. coli*…….……..…47
2.8.1.1. Herstellung kaltkompetenter *E. coli*-Zellen (Inoue *et al*., 1990; mod.)……47
2.8.1.2. Transformation kaltkompetenter *E. coli*-Zellen…….....48
2.8.1.3. Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (Dower *et al*., 1988)…….48
2.8.1.4. Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen……...48
2.8.1.5. Herstellung schnellkompetenter *E. coli*-Zellen…….....49
2.8.1.6. Blau-Weiß-Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone……...50
2.8.2. Transformation von Clostridien……...…50
2.8.2.1. Methylierung von Plasmid-DNA für die Transformation in *C. acetobutylicum*……..……50
2.8.2.2. Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation ……..51
2.8.2.3. Konjugation von *C. sporogenes* mit *E. coli* CA434 (Purdy *et al*., 2002)……...52
2.9. Arbeiten mit Proteinen……53
2.9.1. Herstellung von Zellextrakten……..53
2.9.1.1. „Ribolyser™ Cell Disruptor“…….....…53
2.9.1.2. French® Pressure Cell-Press……..54
2.9.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach „Pierce“……..54
2.9.3. Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätschromatographie…….55
2.9.4. Mikrokonzentratorsäulen……..56
2.9.5. Isolierung bakterieller Proteine aus der Cytosol- und Membranfraktion (Penecky und Coon, 1996; mod.)……56
2.9.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (PAGE)……..……57
2.9.6.1. Denaturierende diskontinuierliche SDS-PAGE.....57
2.9.7. Proteinfärbung in Polyacrylamid-Gelen……59
2.9.7.1. Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969; mod.)……..59
2.9.7.2. Silberfärbung (Blum *et al*., 1987)……59

2.9.8. Western-Blot: Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen…....61
2.9.9. Immunfärbung von Proteinen…….62
2.9.10. Größenbestimmung von Proteinen……..…63
2.10. „ClosTron™ Gene Knockout System“…….64
2.10.1. SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension PCR).....65
2.10.2. Restriktionsspaltung von DNA-Fragment und Vektor pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 mit *Hin*dIII und *Bsr*GI……..……66
2.10.3. Ligation von DNA-Fragment und Vektor pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 ……66
2.10.4. Transformation von pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 in *C. acetobutylicum*……..……67
2.10.5. Induktion der Integration in *C. acetobutylicum* ……..67
2.10.6. Kontrolle der Integration mittels PCR……..68
3. Ergebnisse……....69
3.1. Hintergrund und Zielsetzung……..69
3.2. Bisher durchgeführte Experimente (König, 2008)……..…70
3.3. Systemübertragung auf *C. acetobutylicum*…….71
3.3.1. Das Tet-System……71
3.3.1.1. Konstruktion der verschiedenen Expressionsplasmide……..72
3.3.1.2. Überprüfung der Funktionalität des Tet-Systems……74
3.3.1.3. Detektion der Crotonase mittels Western-Blot-Analyse und Immunfärbung……76
3.3.2. Transformation in *C. acetobutylicum*……..78
3.3.2.1.Klonierung des Φ3T I-Methyltransferase-Gen in den pANr2-P_help-tetR_F1-Vektor……...78
3.3.2.2.„Type-One™ Restriction Inhibitor“……...79
3.3.2.3. Klonierung der P_help-tetR-Sequenz in der pANS1-Vektor…..…79
3.3.2.4. pDrive-Klonierungsvektor als Zwischenschritt……..……80
3.3.2.5. Transformation der verschiedenen pMTL-P_tetO2-sp_crt-Plasmidkonstrukte in *E. coli* XL1-Blue MRF' pANS1-P_help-tetR……82
3.3.2.6. Transformation der pMTL-P_tetO2-sp-crt-Plasmidkonstrukte in *C. acetobutylicum*……..82
3.3.2.7. Überprüfung des Tet-Systems in *C. acetobutylicum* und Entwicklung einer Positivkontrolle für die Sekretion……...……83

3.3.2.8. Sequenzierung des pANS1-Methylierungsvektors……..85
3.3.2.9. Überprüfung des Tet-Sytems basierend auf einem Vektor (pMTL-P_tetO2-sp_crt) in *C. acetobutylicum*……85
3.4.Verwendung des „ClosTron™ Gene Knockout Systems“ zur Inaktivierung von CAC1502 in *C. acetobutylicum*……..86
3.4.1. Transformation von pMTL-P_tetO2-sp_crt pANr2-P_help-tetR_F1 in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2…….....89
3.4.2. Konstruktion von pMTL-P_tetO1-sp_crt……90
3.4.2.1. Transformation von pMTL-PtetO1-sp_crt pANr2-P_help-tetR_F1 in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2……..…92
3.4.2.2. Transkript-Nachweis der Crotonase mittels RT-PCR……..……92
3.4.2.3. Wachstumsversuche mit *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-sp_crt und Wildtyp auf MES-Medium……..……94
3.5. Pre- und Pro-Sequenz einer *Staphylococcus hyicus*-Lipase……96
3.5.1. Konstruktion von pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc ….……..…...96
3.5.2. Transformation von pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc in *C. acetobutylicum*…….……98
3.5.3. Detektion der Crotonase mittels Western-Blot-Analyse……..99
3.5.4. Austausch des *bdhA*-Promoters durch den *thlA*-Promoter.....99
3.5.5. Transkript-Nachweis der Crotonase mittels RT-PCR……100
3.5.6. SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse.....101
3.6. Transformation von *C. sporogenes*……102
4. Diskussion……..……..……..……105
5 a. Zusammenfassung.....125
5 b. Summary……127
6. Literaturverzeichnis……..……129
7. Anhang……149
7.1 Weitere Informationsquellen……149

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
α	Alpha
B.	*Bacillus; Bifidobacterium*
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
β	Beta
C	Cytosin; Kohlenstoff
C.	*Clostridium; Corynebacterium*
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cytosindeaminase
CDEPT	„Clostridial-Directed-Enzyme-Prodrug/Drug-Therapy“
CDTT	„Clostridial-Directed-Toxin-Therapy“
CGM	„Clostridal Growth Medium“
cm	Zentimeter
Co	Kompanie
CPE	*Clostridium perfringens*-Enterotoxin
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic Acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

DT	Diphterietoxin
E.	*Escherichia*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	*et alii* (und andere)
F	Farad
g	Gramm
G	Guanin
GB	„Great Britain“ (Großbritannien)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H_2O	Wasser
HCl	Hydrochlorid (Salzsäure)
His	Histidin
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IBS	„Intron Binding Site“ (Intron-Bindestelle)
IEP	„Intron Encoded Protein“(Intron-kodiertes Protein)
IL	Interleukin
Inc.	„Incorporated“ (eingetragen)
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
l	Liter
L.	*Lactococcus; Listeria*
LB	„Luria broth“ (Komplexmedium)
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	Mega

M	Molar (mol/l)
MCS	„Multiple Cloning Site“ (Multiple Klonierungsstelle)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mod.	modifiziert
µ	Mikro
n	Nano
NRT	Nitroreduktase
OD	optische Dichte
ori	„Origin of Replication“" (Replikationsursprung)
p	Plasmid
P	Promoter
P.	*Pseudomonas*
P/C/I	Phenol/Chloroform/Isoamylakohol
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
®	„registered“ (eingetragenes Warenzeichen)
RAM	„retrotransposition-activated selectable marker“ (durch Retrotransposition aktivierter Selektivmarker)
RNA	„Ribonucleic Acid“ (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S.	*Salmonella*
s	Sekunde(n)
SDS	„Sodiumdodecylsulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
T	Terminator
T	Thymin

Tab.	Tabelle
Taq	Abkürzung für *Thermus aquaticus*
TK	Thymidinkinase
Tm	Schmelztemperatur
™	„trademark“ (Warenzeichen)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Enzymeinheit(en) (1 U = Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt)
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl-D-galactosid
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die aktuellen Daten des Statistischen Bundesamtes Deutschland (Destatis) zeigen, dass im Jahr 2010 die häufigste Todesursache mit rund 41 % auf eine Herz-/Kreislauferkrankung zurückzuführen ist.

Neben dieser Erkrankung ist Krebs, wie in den Jahren davor, die zweithäufigste Todesursache. Allein in Deutschland werden jedes Jahr 330000 neue Krebserkrankungen (www.dkfz.de) diagnostiziert.
Obwohl die Sterblichkeitsraten in dem Zeitraum zwischen 1990 und 2006 für Männer um 21 % und für Frauen um 12,3 % zurückgingen (Jemal *et al*., 2010), erliegt in der Bundesrepublik noch immer jeder Vierte einem Krebsleiden. Da die durchschnittliche Lebenserwartung eines Menschen immer weiter ansteigt, nimmt gleichzeitig auch die Wahrscheinlichkeit zu, an Krebs zu erkranken.
Neben dem Alter spielen noch andere Faktoren eine wesentliche Rolle, welche Krebs zu einer multifaktoriellen Erkrankung machen. Dazu zählen insbesondere Umweltfaktoren (Ernährung, Nikotinkonsum, Virusinfektionen, usw.), aber auch eine gewisse familiäre Disposition kann für eine Krebsentstehung ursächlich sein.
Durch Vorsorge und rechtzeitige Früherkennung könnten mehr als 30 % der Krebserkrankungen durch eine adäquate Behandlung geheilt werden (www.who.int/cancer/en/). Je früher Krebs diagnostiziert wird, desto größer ist die Chance für den Patienten, die Krankheit dauerhaft zu besiegen. Für die eigentliche Krebsbehandlung der mittlerweile 300 bekannten Tumorarten stehen verschiedene Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Dabei werden hauptsächlich drei verschiedene Therapieformen unterschieden, welche individuell eingesetzt und auch kombiniert werden.
Mittel der ersten Wahl ist, wenn möglich, die Resektion, bei der operativ der Tumor und meist die benachbarten Lymphknoten entfernt werden. Nachteilig bei einem chirurgischen Eingriff ist jedoch die Tatsache, dass Metastasen so nicht bekämpft werden und immer ein Risiko besteht, dass noch krankes Gewebe vorhanden ist.
Daher erfolgt zuvor oder anschließend zusätzlich eine Medikamentenbehandlung, bei der dem Patienten oft Cytostatika (Chemotherapie) verabreicht werden. Im Idealfall werden dadurch Metastasen abgetötet oder zumindest das weitere Tumorwachstum

gehemmt. Problematisch bei diesem Behandlungskonzept sind jedoch die starken Nebenwirkungen, da nicht nur die Tumorzellen, sondern auch sich proliferierende Zellen geschädigt werden.
Dagegen ermöglicht die moderne Strahlentherapie eine gezielte Behandlung, auch bei schwer zugänglichen Tumoren, ohne das gesunde Gewebe massiv zu schädigen. Durch die hohen Strahlendosen haben Patienten auch hier häufig unter starken Nebenwirkungen zu leiden. Zusätzlich besteht die Gefahr einer bösartigen Neubildung.
Trotz enormer Fortschritte und Verbesserungen im Bereich der Tumortherapie gibt es immer noch Krebserkrankungen, die durch diese konventionellen Ansätze gar nicht oder nur sehr schlecht behandelt werden können.
Zu diesen zählt auch das Pankreaskarzinom, das auf Grund mangelnder und uncharakteristischer Symptome schwer zu diagnostizieren ist. Die chirurgische Resektion der Bauchspeicheldrüse und eines Großteils des umliegenden Gewebes ist nach wie vor die einzige potenziell kurative Therapie (Whipple, 1994; Ramesh, 2010). Jedoch kann zum Zeitpunkt der Diagnose ein solcher operativer Eingriff lediglich bei 20 % der Patienten durchgeführt werden. Die Prognose ist schlecht, so dass in den meisten Fällen nur eine Palliativtherapie angewendet werden kann.
Bei einer kurativen Resektion kann eine Überlebensrate nach fünf Jahren von etwa 20 % erreicht werden (Okabayashi *et al*., 2008). Die Fünfjahresüberlebensrate dagegen liegt bei allen Pankreaskarzinompatienten bei < 3 %.

Die unbefriedigenden Heilungsraten bei dieser, aber auch anderen Krebserkrankungen und die auftretenden Nebenwirkungen der genannten Behandlungsmethoden verlangen nach alternativen Therapieansätzen zur Krebsbekämpfung. Durch den raschen Fortschritt der Molekularbiologie in den vergangenen Jahrzehnten konnten einige vielversprechende Ansätze entwickelt werden.
Dabei rückt immer mehr die Anwendung von Bakterien im Kampf gegen den Krebs in den Fokus. Besonderes Augenmerk hierbei fiel auf die Spezies der Gattungen *Salmonella*, *Bifidobacterium* und *Clostridium* (Jain und Forbes, 2001). Letztere eignet sich besonders gut für die Therapie von Tumoren mit nekrotisierenden und hypoxischen Bereichen, da es sich hierbei um obligat anaerobe Bakterien handelt, die in der Lage sind, Endosporen zu bilden. Diese sind für das menschliche Immunsystem

weitestgehend inert und können dem Patienten direkt in die Blutbahn injiziert werden. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass diese nur in hypoxischen Bereichen massiver Tumore auskeimen (Lemmon *et al*., 1997; Lambin *et al*., 1998; Theys *et al*., 2001; Dang *et al*., 2001). Die Verwendung apathogener Clostridien erwies sich dabei für den Patienten als ungefährlich (Minton, 2003). Dadurch werden rekombinante Clostridiensporen zu idealen Trägern von neuen Antitumormitteln und können so als eine Art „Trojanisches Pferd“ agieren (Wei *et al*., 2008).

Ein Ansatzpunkt ist die Methode der sogenannten CDEPT („Clostridial Directed Enzyme Prodrug Therapy“), bei der die systemisch applizierten clostridiellen Sporen im hypoxischen Bereich des Tumors auskeimen und ein rekombinantes Enzym produzieren und sezernieren. Dieses überführt dann die inaktive Vorstufe eines Wirkstoffs („prodrug“) in seine wirksame Form, so dass diese spezifisch den Tumor schädigen kann (Minton *et al*., 1995). Dadurch lassen sich bei gleichzeitig höheren Dosen die Nebenwirkungen der Chemotherapeutika minimieren.

Eine weitere Variante stellt die CDTT („Clostridial Directed Toxin Therapy“) dar, bei der anstatt einer inaktiven Vorstufe ein Toxin eingesetzt wird. Dies bietet den Vorteil, dass sich die Wirkung des Toxins nicht nur auf proliferierende Zellen beschränkt (Trédan *et al*., 2007), sondern auch ruhende Zellen betrifft.

Dabei handelt es sich bei bakteriellen Toxinen, auf Grund ihrer Fähigkeit, Zellen effizient zu schädigen, um attraktive Kandidaten (Michl und Gress, 2004). Das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) rückte hierbei als Krebstherapeutikum besonders in den Fokus (Michl *et al*., 2001; Kominsky *et al*., 2004). Dieses *Clostridium* ist bekannt als Verursacher von Lebensmittelvergiftungen (Johnson, 1999), deren Symptome sich durch Diarrhö und Darmkrämpfe äußern. Neben dem Enterotoxin verfügt *C. perfringens* noch über 13 weitere Toxine, die unter anderem auch an Wundinfektionen wie Gasbrand (Gasgangrän) beteiligt sind (Rood, 1998).

Beim CPE handelt es sich um ein 35 kDa großes Protein (LD_{50} von 81 µg/kg), welches durch Ausbildung eines Porenkomplexes die Durchlässigkeit der Zellmembran steigert, was schließlich zum Verlust des osmotischen Gleichgewichts und zum Zelltod führt (Czeczulin *et al*., 1993; McClane, 2001; Smedley *et al*., 2007). Dabei bindet das Toxin an die Proteine Claudin-3 und Claudin-4, die ein wichtiger Bestandteil der in Epithelien vorkommenden Zellverbindungen, der „Tight Junctions“, sind und als Rezeptoren des CPE identifiziert wurden (Katahira *et al*., 1997). Der C-Terminus des CPE ist für die Bindung verantwortlich, wohingegen der N-Terminus mit der

Cytotoxizität assoziiert wird (Horiguchi *et al*., 1987; Hanna *et al*., 1992; Kokai-Kun *et al*., 1997; 1999). Dabei bindet das CPE (319 AS) im Bereich zwischen AS 306 und 315 (Kimura, 2010) an die zweite extrazelluläre Schleife der Claudin-3- und -4-Rezeptoren (Fujita *et al*., 2000). In dieser Schleife wurde das zentrale ^{148}NPL^{150}VP-Motiv identifiziert und als essentiell für die CPE-Claudin-Interaktion eingestuft (Winkler *et al*., 2009). Diese Rezeptor-vermittelte Interaktion führt zur Ausbildung eines Porenkomplexes mit einer molekularen Masse von 155 kDa (Chakrabarti und McClane, 2005). Die Folge ist eine erhöhte Permeabilität der Membran, wodurch es zum Flüssigkeitsaustritt und letztendlich zum Kollaps der Zelle kommt (McDonel und Dorner, 1986). Bereits geringe Mengen an CPE sind ausreichend, um durch den Einstrom extrazellulärer Ca^{2+}-Ionen in die Zelle die natürlichen Apoptoseprozesse zu initiieren (Chakrabarti *et al*., 2003).

Es konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass Claudin-3 und -4 oft in epithelialen Tumoren wie z. B. bei Colon-, Ovarial-, Mamma-, und Prostatakarzinomen produziert werden (Long *et al*., 2001; Soini 2004). Expressionsstudien haben auch gezeigt, dass im Pankreaskarzinomgewebe und in Zelllinien die Claudin-4-Rezeptoren bis zu 1000fach überexprimiert werden (Michl *et al*., 2001).

Dadurch zeichnen sich die beiden Claudin-Rezeptoren als ideale Angriffsziele für eine selektive CPE-Behandlung solider Tumore aus. Intra-tumorale Applikationen von rekombinantem CPE führten bereits zu einer Dosis-abhängigen Eradikation der Krebszellen, ohne dabei Toxin-assoziierte Nebenwirkungen auszulösen. Jedoch ist hierbei eine ständig zu wiederholende Gabe von 0,5 bis 1,0 µg CPE nötig, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen (Kominsky *et al*., 2007, Santin *et al*., 2007).

Darüber hinaus könnte der hohe interstitielle Druck im Tumor eine therapeutische Wirkung verhindern, da dadurch keine optimale Verteilung des CPE im Tumorgewebe gewährleistet werden kann (Jain, 1989). Die systemische Applizierbarkeit ist daher sehr eingeschränkt und bei einigen Tumoren, beispielsweise beim Pankreaskarzinom, durch ihre schwer erreichbare Lage nicht möglich.

Durch Einsetzen des CPE in der bereits erwähnten CDTT entsteht ein vielversprechender Therapieansatz zur Behandlung des Pankreaskarzinoms. Das Prinzip dieses Ansatzes ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Nach intravenöser Applikation rekombinanter Clostridiensporen erreichen diese über den Blutstrom den Tumor. Im hypoxischen Bereich des Tumorgewebes keimen sie aus und besiedeln den Tumor. Die vegetativen Zellen sind dann in der Lage, das rekombinante CPE zu

produzieren und sezernieren, welches über die Interaktion mit Claudin-4-Rezeptoren schließlich zur massiven Schädigung des Tumors führt.

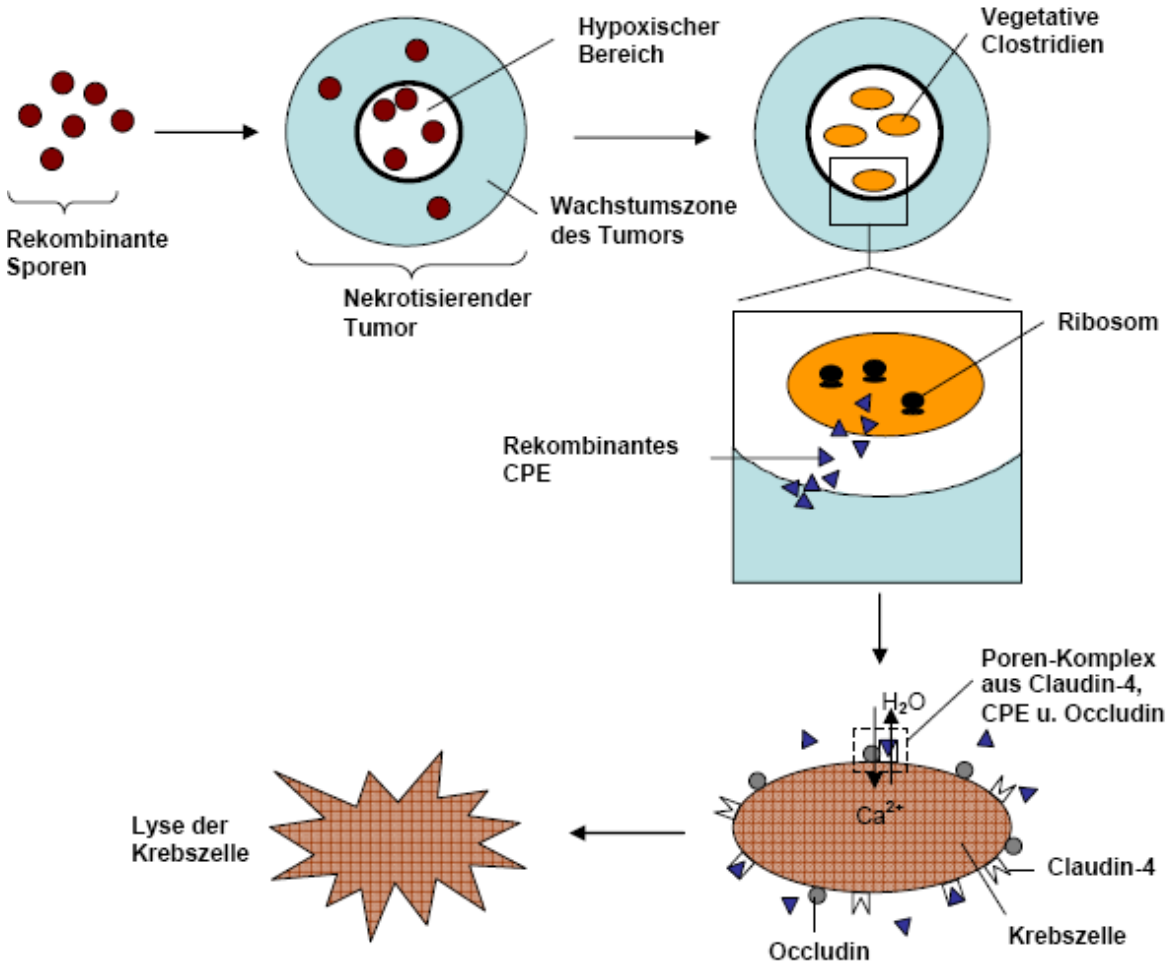

Abbildung 1: Prinzip der CDTT. Systemische Applikation rekombinanter Clostridiensporen, welche im hypoxischen Bereich des Tumors auskeimen. Die CPE-Produktion führt schließlich zur Lyse der Krebszelle.

Aufgrund seiner pathogenen Eigenschaften ist *C. perfringens* kein geeigneter Kandidat, um in der CDTT eingesetzt zu werden. Für die Anwendung in der Krebstherapie kommen nur apathogene Stämme in Frage (Barbé *et al*., 2006). Des Weiteren bildet *C. perfringens* das Enterotoxin sporulationsabhängig und CPE wird erst bei der Lyse der Mutterzellen freigesetzt (Duncon, 1973). Entsprechend konnte im 5'-Bereich des CPE auch keine Konsensussequenz für ein typisches Signalpeptid identifiziert werden (Czeczulin *et al*., 1993). Um folglich einen Transport des Toxins

durch die Cytoplasmamembran gewährleisten zu können, ist ein Signalpeptid notwendig. Eine entsprechende Modifikation des Toxins erfolgt durch Anheften einer geeigneten Signalpeptidsequenz und sollte ein Ausschleusen des rekombinant hergestellten CPE ermöglichen. Das daraus resultierende Fusionsprotein wird mittels des in Clostridien vorhandenen Sec-Systems aktiv transloziert und von der sogenannten Signalpeptidase I prozessiert.

In früheren Arbeiten wurde die Signalpeptid-kodierende Sequenz einer Amylase *amyP* aus *C. acetobutylicum* mit dem *cpe*-Gen fusioniert (Box, 2006). Für die Expression dieser Fusion wurde der apathogene Stamm *C. acetobutylicum* gewählt. Das resultierende Fusionsprotein wurde ausgeschleust und konnte im Überstand nachgewiesen werden. Die produzierte Menge des Toxins (0,5 mg/l) erwies sich jedoch im *in vivo*-Mausmodell als zu gering. Auch zeigte sich, dass die Produktion dieses Fusionsproteins auf den Zwischenwirt *Escherichia coli* eine stark toxische Wirkung ausübte.

Daher wurden über eine *in silico*-Analyse geeignetere clostridielle Signalsequenzen identifiziert, die sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien ohne Nebenwirkungen exprimiert und prozessiert werden können (König, 2008). Anstelle des CPE wurde als Modellprotein für die Ausschleusung das Enzym Crotonase gewählt, welches mit 28 kDa eine ähnliche Größe wie das Enterotoxin aufweist. Hierbei handelt es sich um die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase von *C. acetobutylicum*. Durch die Substitution sollte u. a. eine toxische Wirkung des CPE auf den Zwischenwirt *E. coli* ausgeschlossen werden. Allerdings zeigten Wachstumsversuche, dass auch bei Verwendung verschiedener Signalpeptide die Produktion eines Fusionsproteins letztendlich die Schädigung des Zwischenwirtes bewirkt.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, zunächst ein Expressionssystems zu entwickeln, welches die Verwendung von *E. coli* als Zwischenwirt erlaubt. Gleichzeitig soll eine Optimierung dieses Systems dazu führen, dass *C. acetobutylicum* bzw. *C. sporogenes* in der Lage sind, das Enterotoxin in einer ausreichenden Konzentration zu produzieren und auch auszuschleusen. Durch die entsprechende Optimierung der Expression in der Zelle und der Etablierung des Proteinexports soll letztlich eine Interaktion mit den Tumorzell-Rezeptoren Claudin-3 und -4 gewährleistet werden, um einen

entsprechenden Therapieansatz, insbesondere zur Behandlung des Pankreaskarzinoms, zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

In dieser Arbeit wurden überwiegend Chemikalien von folgenden Firmen verwendet:

- Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg
- Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
- Invitrogen GmbH; Karlsruhe
- Merck KGaA; Darmstadt
- Otto Nordwald GmbH; Hamburg
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Schnelldorf

2.1.2. Gase

Für anaerobe Arbeiten wurden Gase bzw. Gasgemische von der Firma MTI Industriegase AG, Neu-Ulm bezogen und sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Verwendetes Gas und Gasgemisch

Gas(gemisch)	Zusammensetzung	Reinheit	Verwendung
Stickstoff (N_2)		5.0	Anaerobes Arbeiten
Formiergas	95 % Stickstoff (N_2)	k. A.	Anaerobenkammer
	5 % Wasserstoff (H_2)	k. A.	

k. A. = keine Angabe des Herstellers

2.1.3. Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2 aufgeführt. Eingesetzte Restriktionsendonukleasen wurden hauptsächlich von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Enzyme, Bezugsquelle und Verwendungszweck

Enzym	Bezugsquelle	Verwendungszweck
Lysozym (84468 U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf	Zelllyse
Proteinase K (2,5 U/mg)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Verdau von Proteinen
RNase A (5 U/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	Verdau von RNA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 1 U/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	Dephosphorylierung
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	DNA-Ligation
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	
TypeOne™ Restriction Inhibitor	Epicentre Biotechnologies, Madison (USA)	Erhöhung der Transformationseffizienz
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	RT-PCR
illustra™ Ready-To-Go™ RT-PCR Beads	GE Healthcare Europe GmbH, München	
illustra™ PuReTaq™ Ready-To-GoTM PCR	GE Healthcare Europe GmbH, München	PCR
Failsafe™ PCR System	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm	
Genaxxon Taq-Polymerase (5 U/µl)	Genaxxon BioScience GmbH, Ulm	
High Fidelity PCR Enzyme Mix (5 U/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	

ReproFast Polymerase (5 U/µl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	PCR

2.1.4. Molekularbiologische Hilfsmittel

Als Größenstandard für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der „Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Mix“. Bei Agarosegelelektrophoresen kam je nach zu erwartender Fragmentgröße der „Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder“, der Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder“ oder der „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ zum Einsatz. Diese Größenstandards sowie der Ladepuffer „6x Loading Dye Solution“ wurden von der Fermentas GmbH bezogen.

Im Verlauf dieser Arbeit fanden diverse „Kits“ als molekularbiologisches Hilfsmittel Verwendung. In Tabelle 3 sind diese „Kits“ unter ihrem jeweiligen Verwendungszweck zusammen getragen.

Tabelle 3: Verwendete „Kits“

„Kit"	Lieferant/Hersteller	Verwendungszweck
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen	Isolierung von Plasmid-DNA
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg	
NucleoSpin® Extract II	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren	Reinigung von DNA
UltraClean™ 15 DNA Purification Kit	MO BIO laboratories, Inc., Carlsbad (USA)	
DNA Clean & ConcentratorTM-5Kit	HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg	
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg	
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford (USA)	Bestimmung der Proteinkonzentration
Qiagen PCR Cloning Kit	QIAGEN GmbH, Hilden	TA-Klonierung von PCR-Fragmenten

Qiagen® OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden	Analyse von Genexpression
Mini RNA Isolation II Kit	HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg	Isolierung von RNA
Rneasy® Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden	

2.1.5. Geräte

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Werkstatt der Universität Ulm, Ulm
Anaerobenkammer	Werkstatt der Universität Ulm, Ulm
Brutschränke	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Mailand (Italien)
Elektrophorese Power Supply ST 606	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Elektroporationsgerät Gene-Pulser® II mit Pulse Controller Plus	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Feinwaage AE 163	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Fotodokumentationsanlage Gelprint 2000i	MWG Biotech AG, Ebersberg
French® Pressure Cell-Press	SLM Instruments Inc., Urbana (USA)
Heizblock	Technische Werkstatt der Universität, Göttingen
Heizpilz (2 l)	Tyco Thermal Controls GmbH, Heidelberg
Heizpilz (4 l)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inkubationsschüttler Certomat® R	Sartorius AG, Göttingen
Inkubationsschüttler Excella E24	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen

Incubator Shaker Series Inkubationsschüttler GFL 3020	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Inkubationsschüttler G24 Environmental Incubation Shaker	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Inkubationsschüttler HF	Infors AG; Bottmingen, Schweiz
Kühlschränke	Liebherr-Holding GmbH, Biberach a. d. Riss
Kühlzentrifuge 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Kühlzentrifuge Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG., Tuttlingen
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge ZK 401	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen
Magnetrührer IKAMAG® REO	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroplatten-Lesegerät anthos htIII	Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals (Österreich)
Mikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrowelle Moulinex OPTIQUICK	Groupe SEB Deutschland GmbH, Offenbach
PCR Maschine PTC 200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
pH-Messgerät WTW pH 521	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Photodokumentationsanlage Mitsubishi P93D	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer	Biometra GmbH, Göttingen
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson International B. V. Deutschland, Limburg-Offheim
Reagenzglasschüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Reinstwasseranlage ELGASTAT Maxima	USF Deutschland GmbH, Ransbach-Baumbach
Ribolyser HYBAID	Hybaid GmbH, Heidelberg
Spektralphotometer Ultrospec® 3100 pro	GE Healthcare Europe GmbH, München
Tiefkühlschränke (- 20 °C)	Liebherr-Holding GmbH, Biberach a. d. Riss
Tiefkühlschränke (- 80 °C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Tischzentrifuge Heraeus PICO 17	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Tischzentrifuge Mini Spin®	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge L8-60M	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UV-Schirm TFP-M/WL (312 nm)	biostep GmbH, Jahnsdorf
UV-Schirm UST-30L-8E (365 nm)	biostep GmbH, Jahnsdorf
Vakuumzentrifuge Speed Vac Concentrator	Bachofer GmbH, Reutlingen
Waage BP 2100 S	Sartorius AG, Göttingen
Waage BP 8100	Sartorius AG, Göttingen
Wandautoklav	Münchener Medizin Mechanik, Planegg
Wasserbad GFL	GFL - Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wasserbad HAAKE FISONS SWB 20	Thermo Fischer Scientific, Dreieich
Zentrifuge für Hungate-Röhrchen EBA 20	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge für Hungate-Röhrchen EBA 3S	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

2.2. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

Tab. 5: Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp[1)]	Herkunft/Referenz
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	Typstamm	American Type Culture Collection, Manassas (USA)
Clostridium perfringens (Typ A) DSM 11784	Typstamm	DSMZ GmbH, Braunschweig
Clostridium sporogenes NCIMB 10696	Typstamm	NCIMB Ltd., Aberdeen (GB)
Escherichia coli		
BL21 (DE3)	F^- *ompT gal dcm lon* *hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) (DE3)	Stratagene, La Jolla (USA)
SURE®	*endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14-* Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[*proAB+ lacI^q lacZΔM15 Tn10*]	Stratagene, La Jolla (USA)
XL1 Blue MRF'	*Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tet^r)]	Stratagene, La Jolla (USA)
XL2-Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI^{q}Z ΔM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r]	Stratagene, La Jolla (USA)
CA434	*hsdS* ($r_B^-m_B^-$) *supE44 thi-1 recAB ar-14 leuB5proA2 lacY1 galK rpsL20* (str^R) *xyl-5 mtl-1* (pACYC184::Sau5) mit konjugativem Plasmid R702 (Tc^R Sm^R Su^R Hg^R Tra$^+$ Mob$^+$)	Purdy *et al*., 2002

[1)] Für die Genotypabkürzungen siehe : Bachmann, 1990 ; Berlyn *et al*., 1996.

2.3. Plasmide

In der folgenden Tabelle sind alle eingesetzten bzw. konstruierten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 6: Plasmide

Vektor	Größe [Bp]	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pDrive	3851	pMB1/ColE1 ori (*rep*), f1 *ori*, *bla*, *aph*, *lacPOZ'*	QIAGEN GmbH, Hilden
pET29a(+)	5371	pBR322 ori (rep), f1 *ori*, *lac*I, *aph*, PT7, TT7	Novagen R & D Systems, Wiesbaden
pANS1	5852	pACYC184/p15A ori (rep), *spcE*, Methyltransferase-Gen des Phagen Φ3T I	Böhringer, 2002
pMTL007	11845	pMB1/ColE1 ori (rep), pCB102 ori (orfH), oriT (traJ), *catP*, *lac*I, P*fac*, Gruppe II Intron (ltrA)	Heap *et al*., 2007
pMTL007c-E2	8925	pMB1/ColE1 ori (rep), pCB102 ori (orfH), oriT (traJ), catP, *lac*I, P*fac*, Gruppe II Intron (ltrA), FRT-flanked *ermB* RAM	Heap *et al*., 2010
p7BIG2TOX	9208	P7BIG2 mit MLSr und *cpe* aus pUC-cpe-ermC2 als *Xba*I-Fragment	Box, 2005
pANr2-Phelp-tetR-F1	5569	Vektor: pANr2 (pANS1ΔΦ3TMethytransferase) Insert: P*help*, *tetR* (mit RBS)	Meisohle, 2010
pMTL	5619	Vektor: pMTL007 Δ*lac*IΔP*fac*ΔClosTron	Meisohle, 2010
pMTL-PtetO2	5742	Vektor: pMTL007 Insert: P*tetO2*	Meisohle, 2010

pMTL-PbdhA	5267	Vektor: pMTL007 Insert: P*bdhA*	Riegel, unveröffentlicht
pET29a-3D'-crt	6171	Vektor: pET29a(+) Insert: *3D*', *crt*	König, 2008
pET29a-chi'-crt	6171	Vektor: pET29a(+) Insert: *chi*', *crt*	König, 2008
pET29a-colA'-crt	6150	Vektor: pET29a(+) Insert: *colA*', *crt*	König, 2008
pET29a-orf5'-crt	6171	Vektor: pET29a(+) Insert: *orf5*', *crt*	König, 2008
pET29a-pec'-crt	6156	Vektor: pET29a(+) Insert: *pec*', *crt*	König, 2008
pET29a-plc'-crt	6147	Vektor: pET29a(+) Insert: *plc*', *crt*	König, 2008
pET29a-amyP'-crt	6174	Vektor: pET29a(+) Insert: *amyP*', *crt*	König, 2008
pMTL-PtetO2-3D'-crt	6767	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *3D*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-chi'-crt	6734	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *chi*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-colA'-crt	6746	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *colA*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-orf5'-crt	6767	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *orf5*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-pec'-crt	6752	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *pec*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-plc'-crt	6743	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *plc*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-amyP'-crt	6770	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *amyP*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-crt	6587	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *crt*	diese Arbeit

pMTL-PtetO2-crt-His6	6543	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *crt-His$_6$*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-chi	7080	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *chi*	diese Arbeit
pMTL-PtetO2-pec	6978	Vektor: pMTL-PtetO2 Insert: *pec*	diese Arbeit
pANr2-Phelp-tetR-F1-Methyl	7259	Vektor: pANr2-Phelp-tetR-F1-Methyl Insert: *Φ3T I Methyltransferase*	diese Arbeit
pANS1-Phelp-tetR	7038	Vektor: pANS1 Insert: P*help-tetR*	diese Arbeit
pDrive-Methyl-SgfI	5555	Vektor: pDrive Insert: *Φ3T I Methyltransferase*	diese Arbeit
pDrive-Phelp-tetR-BglII	4701	Vektor: pDrive Insert: P*help-tetR*	diese Arbeit
pMTL-PtetO1	5719	Vektor: pMTL-PtetO2 ΔPtetO2 Insert: P*tetO1*	diese Arbeit
pMTL-PtetO1-3D'-crt	6749	Vektor: pMTL-PtetO1 Insert: *3D*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO1-colA'-crt	6728	Vektor: pMTL-PtetO1 Insert: *colA*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO1-orf5'-crt	6749	Vektor: pMTL-PtetO1 Insert: *orf5*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO1-pec'-crt	6734	Vektor: pMTL-PtetO1 Insert: *pec*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO1-plc'-crt	6725	Vektor: pMTL-PtetO1 Insert: *plc*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-PtetO1-amyP'-crt	6752	Vektor: pMTL-PtetO1 Insert: *amyP*', *crt*	diese Arbeit
pMTL-bdhA-PrePro	6023	Vektor: pMTL-bdhA Insert: *PrePro*	diese Arbeit

pMTL-bdhA-PrePro-crt	6811	Vektor: pMTL-bdhA-PrePro Insert: *crt*	diese Arbeit
pMTL-bdhA-PrePro-crt-Tadc	6973	Vektor: pMTL-bdhA-PrePro-crt Insert: T*adc*	diese Arbeit
pMTL-thlA-PrePro-crt-Tadc	6859	Vektor: pMTL-bdhA-PrePro-crt-TadcΔbdhA Insert: P*thlA*	diese Arbeit

2.4. Oligodesoxynukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von der biomers.net GmbH, Ulm, bezogen und sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Dabei sind die eingefügten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme rot markiert und die dazu gehörigen Restriktionsenzyme aufgeführt. Die jeweiligen Oligodesoxynukleotide wurden mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7: Oligodesoxynukleotide

Bezeichnung	**Sequenz (5'→ 3')**	**Restriktions-enzym**
pMTL007-rev	tta gca gcc gga tct cag tgg cac gtg aca	*Pmi*I
pMTL007-rev2	aca cac gtg tta gca gcc gga tct cag tgg	*Pmi*I
pMTL007-rev3	aca cac gtg aac tca gct tcc ttt cgg g	*Pmi*I
pMTL007-rev4	aca cac gtg agt tat tgc tca gcg gtg gc	*Pmi*I
pMTL007-rev5	aca cac gtg tca gtg gtg gtg gtg gtg gtg ctc gag tct att ttt gaa gcc	*Pmi*I
pAN-f-methyl-BspTI	aca aca ctt aag atc aaa tct gca acc gac cg	*Bsp*TI
pAN-r-methyl-BspTI	aca aca ctt aag ctt cct cac ctc tca atc cc	*Bsp*TI
pAN-f-methyl-SgfI	aca gcg atc gca tca aat ctg caa ccg acc g	*Sgf*I
pAN-r-methyl-SgfI	aca gcg atc gcc ttc ctc acc tct caa tcc c	*Sgf*I
pAN-tetR-fNruI	aca tcg cga atc cca tta tgc	*Nru*I

pAN-tetR-rBglII	aca aga tct gct tat gct g	*Bgl*II
P-tetR-f BglII	aca aga tct atc cca tta tgc	*Bgl*II
pANS1-f-Bglll	aca aga tct atc aaa tct gca acc gac cg	*Bgl*II
pANS1-r-Bglll	aca aga tct ctt cct cac ctc tca atc cc	*Bgl*II
P-pDrive-amp-SgfI	aca gcg atc gcc ttg gct gac agt tac caa tgc	*Sgf*I
P-pDrive-ampBglII	aca aga tct ctt ggc tga cag tta cca atg c	*Bgl*II
pANS1-tetR-f-BglII	aca aga tct gat ccc att atg c	*Bgl*II *Sgf*I
pANS1-tetR-f-SgfI	aca gcg atc gcg atc cca tta tgc	
pANS1-tetR-f	ttc cga atc cgt tag aag gc	
P-tetR-f-SgfI	aca gcg atc gca tcc cat tat gc	*Sgf*I
P-tetR-r-SgfI	aca gcg atc gcg ctt atg ctg	*Sgf*I
Rev-SgfI-crt	aca gcg atc gca act cag ctt cct ttc g	*Sgf*I
For-pec-SbfI	aca cct gca gga tga aat act taa cta aaa agc	*Sbf*I
Rev-pec-SgfI	aca gcg atc gct taa aag cag cct aaa ccg gca agg tg	*Sgf*I
For-chi-SbfI	aca cct gca ggt tga gta ctc gta aaa aac ttt taa cat tct tgg cc	*Sbf*I
Rev-chi-SgfI	aca gcg atc gct tac cta tta aat ttt gtt cta ata ctt gtc c	*Sgf*I
For-SbfI-crt-1	aca cct gca gga tgg aac taa aca atg tca tcc ttg aaa agg	*Sbf*I
For-SbfI-crt-2	aca cct gca gga tgg aac taa aca atg tc	*Sbf*I
For-PhelptetR-SphI	aca gca tgc taa acg atc cca tta tgc	*Sph*I
Rev-PhelptetR-SphI	aca gca tgc tta tgc tgc ttt taa gac c	*Sph*I
For-PhelptetR-FspI	aca tgc gca taa acg atc cca tta tgc	*Fsp*I
Rev-PhelptetR-NheI	aca gct agc tta tgc tgc ttt taa gac c	*Nhe*I
CAC1502_638I639s-IBS	aaa aaa gct tat aat tat cct tac agc tct ttt ctg tgc gcc cag ata ggg tg	*Hin*dIII
CAC1502_638I639s-EBS1d	cag att gta caa atg tgg tga taa cag ata agt ctt ttc tag taa ctt acc ttt ctt tgt	

CAC1502_638I639s-EBS2	tga acg caa gtt tct aat ttc ggt tag ctg tcg ata gag gaa agt gtc t	
CAC1502_606I607a-IBS	aaa aaa gct tat aat tat cct tat cct aca ata tag tgc gcc cag ata ggg tg	*Hin*dIII
CAC1502_606I607a-EBS1d	cag att gta caa atg tgg tga taa cag ata agt caa tat aaa taa ctt acc ttt ctt tgt	
CAC1502_606I607a-EBS2	tga acg caa gtt tct aat ttc ggt tta gga tcg ata gag gaa agt gtc t	
CAC1502-Kontrolle-for	tta gag gtg gtt act atg gc	
CAC1502-Kontrolle-Rev	acg ctc att tct aag ctc tg	
ErmRAM-F primer	acg cgt tat att gat aaa aat aat aat agt ggg	
ErmRAM-R primer	acg cgt gcg act cat aga att att tcc tcc cg	
Crt-for-RT-PCR	ttc ggg ata ctt gga aat aaa gtg	
Crt-rev-RT-PCR	tca gtg gtg gtg gtg gtg g	
For-PmeI-ptb	aca gtt taa acg acg gat ccc cgg gaa ttc t	*Pme*I
Rev-HindIII-ptb	aca aag ctt gct taa cta tgc ggc atc	*Hin*dIII
Rev-PtetO1-HindIII	aca aag ctt cgt taa tta tac tct atc aat gat ag	*Hin*dIII
For-PtetO1	gct ggt gaa gta cat cac cga cg	
tetO1	tta gtt taa aca cag aat tcg atc ccc atc caa aaa cta aaa aaa ata ttg aca ctc tat cat tga	*Pme*I
	tag agt ata att aac gcg cca agc ttg gga tcc cca gct tgt tga tac act aat gcc tgc agg aca	*Sbf*I
Pf-pMTLTox-SdaI	aca cct gca ggt ttg ttt aac ttt aag aag g	*Sbf*I
Rev-SbfI-ptb	aca cct gca ggg ctt aac tat gcg gca tc	*Sbf*I
P-For-PrePro-FseI	aca ggc cgg cca tga aag aaa caa aac atc aac ac	*Fse*I
P-Rev-PrePro-SmiI	aca att taa atg tat ggt ttt ttg tcg ctc gc	*Smi*I

P-For-crt-SmiI	aca att taa atc atg gaa cta aac aat gtc atc c	*Smi*I
P-rev-crt-NheI	tgt gct agc tca gtg gtg gtg gtg gtg gtg c	*Nhe*I
Pfor-Tadc-NheI	aat agc tag cga act tag acc cat ggc tg	*Nhe*I
Prev-Tadc-NheI	aat agc tag cct agc tct cac att ctt gc	*Nhe*I
P-f-PmeI-thlA	aca gtt taa act aca tga gca ttc taa aag	*Pme*I
P-r-FseI-thlA	tgt ggc cgg ccc taa cct cct aaa ttt tga tac g	*Fse*I

2.5. Zellanzucht

Alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen zur Herstellung von Medien und Puffern wurden in Wasser aus der Reinstwasseranlage gelöst, welches im Folgenden immer mit H_2O abgekürzt wurde.

2.5.1. Nährmedien für *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium. Zur Herstellung von Festmedien wurde den LB-Lösungen vor dem Autoklavieren 15 g/l (w/v) Agar zugegeben. Zur Steigerung der Effizienz von Transformationen wurde SOC-Medium für die Regenerationsphase verwendet. Für die Herstellung von kaltkompetenten Zellen wurde SOB-Medium eingesetzt. Die Zusammensetzung der entsprechenden Medien ist im Folgenden aufgeführt.

LB-Medium (Sambrook und Russell, 2001):

Trypton	10 g	1	% (w/v)
NaCl	10 g	171	mM
Hefeextrakt	5 g	0,5	% (w/v)
H_2O	*ad* 1000 ml		

SOC-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

Trypton	20 g	2 % (w/v)
NaCl	200 mg	8,6 mM
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
KCl	186 mg	2,5 mM
Glucose x H_2O	4 g	20 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	

SOB-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

Trypton	20 g	2 % (w/v)
NaCl	580 mg	10 mM
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
KCl	186 mg	2,5 mM
$MgCl_2$ x 6 H_2O	2,03 g	10 mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	2,44 g	10 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	

Die beiden Magnesiumsalze wurden getrennt von den anderen Medienkomponenten autoklaviert und erst nach dem Abkühlen zugesetzt.

2.5.2. Nährmedien für *C. acetobutylicum*

Für die Herstellung anaerober Medien wurde das dafür benötigte Wasser ca. 20 min gekocht, anschließend im Eisbad mit Stickstoff begast und nach dem Abkühlen luftdicht verschlossen.

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* erfolgte auf CG-Medium. Bei einigen Wachstumsversuchen wurde dagegen auch MES-Medium verwendet. Zur Herstellung von Sporen wurde ein entsprechendes Sporulationsmedium hergestellt.

CGM („Clostridial Growth Medium", mod.; Wiesenborn *et al*., 1988)

D-(+)-Glucose x H_2O	50	g	252,5	mM
KH_2PO_4	0,75	g	5,5	mM
K_2HPO_4	0,75	g	4,3	mM
$(NH_4)_2SO_4$	2	g	15,1	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,71	g	2,9	mM
$MnSO_4$ x H_2O	0,01	g	0,06	mM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,01	g	0,04	mM
NaCl	1	g	17,1	mM
L-Asparagin Monohydrat	2	g	15,1	mM
Hefeextrakt	5	g	0,5	% (w/v)
H_2O	*ad* 1000	ml		

Die aufgeführten Medienkomponenten wurden eingewogen, der Redoxindikator Resazurin (1 mg/l) zugesetzt und in der Anaerobenkammer mit anaerobem Wasser versetzt, abgefüllt und autoklaviert. Für entsprechende Plattenmedien wurden zusätzlich 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

MES Medium (Bertram *et al*., 1990)

Na-Thioglycolat	0,5	g	4,4	mM
Glucose	40	g	202	mM
KH_2PO_4	0,1	g	0,7	mM
$(NH_4)_2SO_4$	2	g	15,1	mM
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	21,3	g	100	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,1	g	0,4	mM
NaCl	0,01	g	0,17	mM
$NaMoO_4$ x 2 H_2O	0,01	g	0,04	mM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,01	g	0,68	mM
$MnSO_4$ x H_2O	0,015	g	0,089	mM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,015	g	0,054	mM
Vitaminstammlösung	1	ml/l		
H_2O	*ad* 1000	ml		

Vitaminstammlösung

p-Aminobenzoesäure	4	mg	30	µM
Thiamin-HCl	4	mg	12	µM
Biotin	0,2	mg	0,8	µM
H_2O	*ad* 1000	ml		

Alle Komponenten wurden eingewogen, in H_2O gelöst und mit NaOH (1 M) auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt. Das Medium wurde 20 min gekocht und danach unter stetiger Stickstoffbegasung auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde das Medium in der Anaerobenkammer abgefüllt und daraufhin für 15 min autoklaviert.

Sporulationsmedium (Monot *et al*., 1982, mod.)

$CaCO_3$	1,1	g	11	mM
KH_2PO_4	1,1	g	8,1	mM
K_2HPO_4	1,1	g	6,3	mM
$(NH_4)_2SO_4$	2,3	g	17,4	mM
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,1	g	0,4	mM
H_2O	*ad* 1000	ml		

Die aufgelisteten Medienkomponenten wurden eingewogen, mit dem Redoxindikator Resazurin (1 mg/l) und anaerobem Wasser versetzt und zu je 4,4 ml in Hungate-Röhrchen aliquotiert und autoklaviert. Vor Verwendung des Mediums wurden je 1 ml der Butyratstammlösung (0,1 M) und der Spurenelement- / Vitaminlösung zu 10 ml 1 %-iger Glucose gegeben und aus dieser Mischung 600 µl zum Grundmedium gegeben.

Spurenelement- / Vitaminlösung für Sporulationsmedium

NaCl	10	mg	170	µM
$NaMo_4$ x 2 H_2O	10	mg	40	µM
$CaCl_2$ x 2 H_2O	10	mg	70	µM
$MnSO_4$ x H_2O	15	mg	90	µM
$FeSO_4$ x 7 H_2O	15	mg	50	µM
p-Aminobenzoesäure	2	mg	10	µM
Thiamin-HCl	2	mg	6	µM
Biotin	0,1	mg	0,4	µM
H_2O	*ad* 1000	ml		

Alle Komponenten wurden eingewogen, mit Wasser versetzt und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte wegen der Lichtempfindlichkeit im Dunkeln.

2.5.3. Nährmedien für *C. sporogenes*

Für die Kultivierung von *C. sporogenes* wurde ausschließlich 2YT-Medium verwendet.

2YT-Medium (Bertram *et a*l., 1990; mod.)

Trypton	30 g	3	% (w/v)
Hefeextakt	20 g	2	% (w/v)
Natriumthioglykolat	1 g	8,7	mM
H_2O	*ad* 1000 ml		

Die aufgeführten Medienbestandteile wurden eingewogen, unter anaeroben Bedingungen mit Wasser versetzt, abgefüllt und anschließend autoklaviert. Für die Herstellung von Plattenmedien wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

2.5.4. Medienzusätze

2.5.4.1. Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Alle Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Dabei wurde das lichtsensitive Tetracyclin stets vor Lichteinwirkung geschützt. Zur Herstellung von Plattenmedien wurde die benötigte Antibiotikastammlösung, nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50 °C, zugesetzt. Bei Flüssigmedien erfolgte die Zugabe kurz vor Gebrauch.

Tabelle 8: Antibiotika

Antibiotika	Kürzel	Lösungs-mittel	Stamm-lösung	Gebrauchs-lösung	Bezugsquelle
Ampicillin	Amp	H_2O	100 mg/ml	100 µg/ml	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Chloramphenicol	Cm	96 % (w/v) Ethanol	30 mg/ml	30 µg/ml	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Clarithromycin	Cla	H_2O	5 mg/ml	2,5 - 5 µg/ml	Abbott Laboratories, Abbott Park (USA)
Colistin	Col	H_2O	10 mg/ml	20 µg/ml	Fluka Chemie GmbH, Buchs (Schweiz)
Kanamycinsulfat	Kan	H_2O	50 mg/ml	50 µg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spectinomycin	Spec	H_2O	50 mg/ml	50 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

Tetracyclin-HCl	TetH	H_2O	10 mg/ml	10 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Thiamphenicol	Thi	Dimethyl-Formamid	15 mg/ml	15 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

2.5.4.2. Sonstige Medienzusätze (Induktion der Blau-Weiß-Selektion)

Für die Blau-Weiß-Selektion (2.8.1.6.) wurden die Agarplatten mit 20 µl einer IPTG- und 40 µl einer X-Gal-Stammlösung versetzt. Damit das Lösungsmittel verdampfen konnte, wurden die Agarplatten für ca. eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, da X-Gal lichtempfindlich ist.

Tabelle 9: Sonstige Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]
IPTG	20 (H_2O)	20
X-Gal	40 (Dimethylformamid)	40

2.5.5. Anzuchtbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte standardmäßig in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium. Um bei größeren Volumina eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten, wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen genutzt. Die Kulturen wurden jeweils bei 37 °C (bzw. 18 °C bei kaltkompetenten Zellen) auf einem Rundschüttler bei 120-170 Upm inkubiert. Die Inkubation von Agarplatten erfolgte in einem Brutschrank, ebenfalls bei 37 °C.

Die Anzucht von *C. acetobutylicum* und *C. sporogenes* erfolgte bis zu einem Volumen von 5 ml in Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc.; Vineland (USA)) mit Butylgummistopfen (Ochs GmbH, Bovenden) und Schraubdeckeln. Bei einem Volumen von 50 ml wurden 125-ml-Müller-Krempel-Flaschen (Müller+Krempel AG, Bülach (Schweiz)) mit Naturgummistopfen (Maag Technic GmbH, Göppingen) und

Edelstahldeckel verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank und Agarplatten wurden im Brutschrank in der Anaerobenkammer inkubiert.

2.5.6. Stammhaltung

Für die Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen wurden Glycerinkulturen (Gherna, 1994) angelegt. Dazu wurden einer über Nacht gewachsenen Kultur 500 µl entnommen und diese mit 500 µl sterilem 100 %-igen (v/v) Glycerin in einem 2-ml-Schraubdeckelröhrchen versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.
Bei C. *sporogenes* konnte die ausgeprägte Fähigkeit zur Endosporenbildung ausgenutzt werden. Daher war es möglich, den Organismus bei 37 °C in Hungate-Röhrchen zu kultivieren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur zu verwahren.

2.5.7. Sporenpräparation

Die Aufbewahrung von *C. acetobutylicum* erfolgte in Form von Sporensuspensionen. Dazu wurden 0,5 ml einer in CGM, gegebenenfalls unter selektiven Bedingungen, wachsenden Übernachtkultur in Sporulationsmedium inokuliert und für 4-6 Tage bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgreicher Kontrolle auf Sporulation mittels der Mikroskopie wurden die Suspensionen bei 4 °C und 6000 Upm 10 min lang zentrifugiert. Das Sporulationsmedium wurde bis auf 0,5 ml abgenommen und mit 0,5 ml CGM versetzt. Anschließend wurde das Zellsediment darin suspendiert und in 2-ml-Schraubdeckelröhrchen aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für die Reaktivierung der Sporen wurden 100 µl der Sporensuspension für 10 min bei 80 °C pasteurisiert und daraufhin mit einer sterilen Spritze in 5 ml CGM injiziert.
Für die Herstellung von *C. sporogenes*-Sporensuspensionen wurden 5 ml 2YT-Medium angeimpft und für ca. 10-14 Tage bei 30 °C inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 5000 Upm und 4 °C. Das erhaltene Zellsediment wurde in 1 ml 2YT-Medium suspendiert und bei -80 °C gelagert. Für das Animpfen einer frischen Kultur wurden 50-100 µl der Sporenpräparation zunächst für 10 min bei 80 °C pasteurisiert.

2.5.8. Bestimmung von Wachstumsparametern

Der Wachstumsverlauf der Bakterienkulturen wurde durch Bestimmen der Optischen Dichte (OD) verfolgt. In einem Spektralphotometer wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in 1-ml-Halbmikroküvetten (VWR International GmbH, Darmstadt), mit einer Schichtdicke von 1 cm, gegen das entsprechende Medium als Leerwert gemessen. Um eine Linearität zwischen Extinktion und Zellzahl zu gewährleisten, wurden die Proben ab einer optischen Dichte von 0,3 mit Medium verdünnt.

2.6. Arbeiten mit DNA

2.6.1. Behandlung von Lösungen und Geräten

Alle hitzestabilen Lösungen und Geräte wurden zur Inaktivierung von Nukleasen und zur Vermeidung von Kontaminationen für mindestens 20 min bei 121 °C und einem Druck von 1,2 bar autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden dagegen sterilfiltriert. Kleingeräte aus Metall oder Glas wurden direkt vor Gebrauch in Ethanol (80 % v/v) getaucht und anschließend abgeflammt.

2.6.2. Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien

2.6.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ und „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden in dieser Arbeit sowohl der „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ als auch der „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ verwendet. Der Zellaufschluss basiert auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse (http://www.zymoresearch.com/zrc/pdf/D4036d.pdf, Birnboim und Doly, 1979). Die Isolierung der Plasmid-DNA beruht dabei auf der durch chaotrope Salze vermittelten selektiven Bindung von DNA an eine Silikamembran.

Die genaue Durchführung ist dem Protokoll des jeweiligen Herstellers zu entnehmen, wobei jeweils alle optionalen Schritte durchgeführt wurden. Des Weiteren wurde beim "Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit" vor der Elution ein Zentrifugationsschritt (10000 Upm, 3 min, RT) zum Trocknen der Silikamembran durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend in 30-50 µl H_2O eluiert und konnte direkt weiter verwendet werden.

2.6.2.2. Plasmidpräparation aus *C. sporogenes* mittels „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“

Die Plasmidpräparation aus *C. sporogenes* erfolgte ähnlich der Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* (siehe 2.6.2.1.). Hierbei wurden 2 ml einer Übernachtkultur eingesetzt und der Lyseschritt wurde auf 4 min verlängert. Die übrigen Schritte wurden nach den optionalen Angaben des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich erfolgte auch hier vor der Elution mit 30 µl H_2O ein Zentrifugationsschritt (10000 Upm, 3 min, RT) zur Trocknung der Silikamembran.

2.6.2.3. Isolierung von Gesamt-DNA aus *C. acetobutylicum*

Die Isolation der Gesamt-DNA aus *C. acetobutylicum* erfolgte nach einer modifizierten Form des Protokolls von Bertram und Dürre (1989). Dazu wurden 5 ml einer Übernachtkultur bei 6000 Upm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 1 ml Kaliumphosphatpuffer (10 mM; pH 7,5) suspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 0,5 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Zugabe von 50 µl Lysozym (200 mg/ml). Des Weiteren wurde für einen Verdau unerwünschter RNA 5 µl RNase A (10 mg/ml) zugesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden 50 µl 10 % SDS und 30 µl Proteinase K–Lösung (20 mg/ml; 50 % Glycerin) zur Proteolyse zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 55 °C.

Um Nukleinsäuren zu entsalzen und weitere Verunreinigungen durch Proteine zu entfernen, wurden nukleinsäurehaltige Lösungen entsprechenden Reinigungsschritten

unterzogen. Hierzu wurde zunächst eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.6.3.1.) durchgeführt, bis keine Protein-Interphase mehr erkennbar war. Nach der anschließenden Ethanolfällung (2.6.3.2.) wurde die DNA getrocknet und in 30 µl sterilem Wasser aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde diese bei 4 °C gelagert.

2.6.2.4. Isolierung von DNA aus *C. acetobutylicum* mittels „innuSPEED Bacteria/Fungi Kit“

Mit Hilfe dieses „Kits“, der u. a. speziell für die Isolierung genomischer DNA aus Gram-positiven Bakterien entwickelt wurde, konnte chromosomale DNA einfach, ohne die Durchführung einer Phenol-Chloroform-Extraktion, isoliert werden. Bei diesem Protokoll wird eine schnelle Homogenisierung dieser schwer zugänglichen Ausgangsmaterialien mit einem effizienten Aufschluss der Bakterienzellwände in speziell entwickelten „Lysis Tubes“, kombiniert. Die Zellen werden zunächst mechanisch aufgeschlossen und dann einer thermischen und proteolytischen Lyse unterzogen. Die DNA wird dann selektiv an die Oberfläche einer „Spin Filter“-Membran gebunden. Durch Waschen werden Inhibitoren entfernt und schließlich wird die DNA eluiert. Dabei erfolgte die Durchführung strikt nach Angaben des Herstellers.

2.6.3. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.6.3.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion werden Proteinverunreinigungen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen entfernt. Die Proteine werden hierbei denaturiert und anschließend abgetrennt. Zur Reinigung wurde die Probe mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v), Sambrook *et al*., 2001; RotiPhenol^{TM}) gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 Upm, 10 min, RT) wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr vorhanden war. Um nun das Phenol zu entfernen, wurde der

Lösung ein gleiches Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, (v/v)) zugegeben und kräftig gemischt. Nach abschließender Zentrifugation (14000 Upm, 10 min, RT) wurde die gereinigte DNA, welche sich in der wässrigen Phase befand, einer Ethanolfällung (2.6.3.2.) unterzogen.

2.6.3.2. Ethanolfällung

Bei der Ethanolpräzipitation wird ausgenutzt, dass Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Konzentrationen von monovalenten Kationen im Alkoholmilieu einen unlöslichen Niederschlag bilden, der durch Zentrifugieren von der wässrigen Phase getrennt werden kann.
Dazu wurde die zu fällende DNA-Lösung mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2; eingestellt mit Eisessig) und 2,5 Vol. eiskalten, absoluten Ethanol versetzt. Daran schloss sich eine Inkubation über Nacht bei -20 °C an. Die präzipitierte DNA wurde daraufhin durch Zentrifugation (14000 Upm, 30 min, 4 °C) sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment mit eiskaltem 70 %-igen (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14000 Upm, 10 min, 4 °C). In der Vakuumzentrifuge wurde das Sediment getrocknet, um den Alkohol vollständig zu verdampfen. Dadurch kann vermieden werden, dass dieser bei der weiteren Verwendung der DNA störend wirkt. Das getrocknete Präzipitat wurde schließlich in 30 µl sterilem Wasser gelöst und konnte direkt weiterverwendet werden.

2.6.3.3. Dialyse von DNA-Lösungen

Da eine erhöhte Salzkonzentration auch eine erhöhte Leitfähigkeit zur Folge hat, führt dies bei der Elektroporation zu einer höheren Stromdichte. Dabei kann es sogar zu einem Funkenschlag kommen, was wiederum zum Fehlschlagen der Transformation führen kann.
Um ein Gelingen der Elektroporation zu gewährleisten, konnten mit Hilfe der Dialyse Plasmid-DNA-Lösungen mit hohen Salzkonzentrationen für eine Transformation durch Elektroporation (2.8.1.4.) entsalzt werden. Dazu wurde ein Nitrocellulose-Filterplättchen vorsichtig auf die Wasseroberfläche einer mit sterilem Wasser befüllten

Petrischale gelegt. Auf dieses Plättchen wurde dann die DNA-Lösung pipettiert und für etwa 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA-Lösung wieder abgenommen und direkt in der Transformation eingesetzt.

2.6.3.4. Reinigung und Konzentrierung von DNA aus Lösungen mittels „NucleoSpin® Extract II“, „UltraClean™15 DNA Purification Kit“ und „DNA Clean & Concentrator™-5 Kit“

Für die Reinigung von Restriktionsverdauen (2.6.8.1), Ligationen (2.6.8.3.) und PCR-Produkten wurde der „NucleoSpin® Extract II Kit“, der „UltraClean™15 DNA Purification Kit“ oder der „DNA Clean & Concentrator™-5 Kit“ verwendet. Das Prinzip basiert auf einer selektiven, durch chaotrope vermittelte Bindung von DNA an eine Silica-Matrix. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Lediglich beim „UltraClean™15 DNA Purification Kit“ wurden 7 µl der beigefügten Silica-Matrix-Lösung pro Ansatz zugegeben und die DNA wurde mit ca. 50 % des Ausgangsvolumens bzw. mit mind. 15 µl H_2O eluiert. Dadurch konnten Verunreinigungen durch die Glasmilch verringert werden.

2.6.3.5. Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen mittels „NucleoSpin® Extract II“ und „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde sowohl der „NucleoSpin® Extract II“ als auch der „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ eingesetzt. Zunächst wurden PCR-Produkte oder enzymatisch behandelte DNA zur Auftrennung einer nichtdenaturierenden Agarose-Gelelektrophorese (2.6.4.1.) auf ein 0,8- oder 2 %-iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach einem anschließenden Anfärben mit Ethidiumbromid wurde die DNA auf einem UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht. Bei dieser Wellenlänge trägt die DNA die geringsten Schäden davon (Hauptabsorptionsmaximum bei 260 nm). Mit einem Skalpell konnte nun das gewünschte Fragment ausgeschnitten werden und mit einem der beiden oben erwähnten „Kits“ gereinigt werden. Dabei entsprach die Vorgehensweise den Angaben des Herstellerprotokolls. Es wurde lediglich, wie in (2.6.2.1.) beschrieben, vor der

Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (10000 Upm, 3 min, RT) zum Trocknen der Membran eingefügt.

2.6.4. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten

2.6.4.1. Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäurestränge in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Durch die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle wandern diese zur Anode. Die elektrisch neutrale Agarosematrix fungiert hierbei wie ein Sieb, durch die die kleineren Moleküle schneller wandern als die großen (Sambrook und Russell, 2001). Je nachdem welche Fragmentlänge zu erwarten war, wurde entweder mit Agarosekonzentrationen von 0,8 % (Fragmente > 1000 Bp) oder 2 % (Fragmente < 1000 Bp) gearbeitet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gekocht und in horizontale Gelkammern eigener Bauart gegossen. Durch die Verwendung eines passenden Kammes wurden Ladetaschen geformt. Nachdem die Agarose fest war, wurde diese mit 1 x TAE- Puffer überschichtet und der Kamm vorsichtig gezogen. Vor Beladen der Taschen wurden die Proben zum Beschweren und zur Markierung der Lauffront mit dem Ladepuffer „6x Loading Dye Solution“ (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) im Verhältnis 5:1 oder eines Ladepuffers eigener Herstellung (Tab. 11) versetzt. Zusätzlich wurde eine Tasche mit einem geeigneten DNA-Größenstandard (Abb. 2) beladen, um eine Bestimmung der Fragmentgrößen zu ermöglichen. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer konstanten Spannung von 80-135 V für etwa 30-45 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Agarosegel für 10-15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (2.6.5.) gefärbt und unter Verwendung einer Fotodokumentationsanlage (MWG Biotech GmbH, Ebersberg) ausgewertet.

Tabelle 10: 50 x TAE-Stammlösung (Sambrook und Russell, 2001)

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Tris	242 g	2 M
Eisessig	57 ml	1 M
EDTA	18,7 g	50 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	
pH 7,5		

Tabelle 11: 6 x Ladepuffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Tris	0,12 g	10 mM
Glycerin	60 ml	8,2 M
EDTA	2,28 g	60 mM
Bromphenolblau	30 mg	0,45 mM
Xylencyanol FF	30 mg	0,55 mM
H_2O	*ad* 100 ml	
pH 7,6 (mit HCl einstellen)		

2.6.5. Färbung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen

Für das Anfärben von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen wurden diese 10-15 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,75 µg/ml in 1 x TAE-Puffer) inkubiert. Dabei kann das Ethidiumbromid zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkalieren und dann bei Anregung mit UV-Licht die Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. So konnte das Bandenmuster des Gels auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm erkennbar gemacht und mit Hilfe der Fotodokumentationsanlage fotografiert werden.

2.6.6. Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Durch Verwendung von DNA-Größenstandards (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) konnten DNA-Fragmentgrößen im Agarose-Gel bestimmt werden. Dazu wurden 3 µl des entsprechenden Größenstandards in einer separaten Ladetasche mit auf das Gel aufgetragen. In dieser Arbeit wurden, je nach erwarteter Fragmentgröße, der „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, der „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ oder der „GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder“ verwendet (Abb. 2).

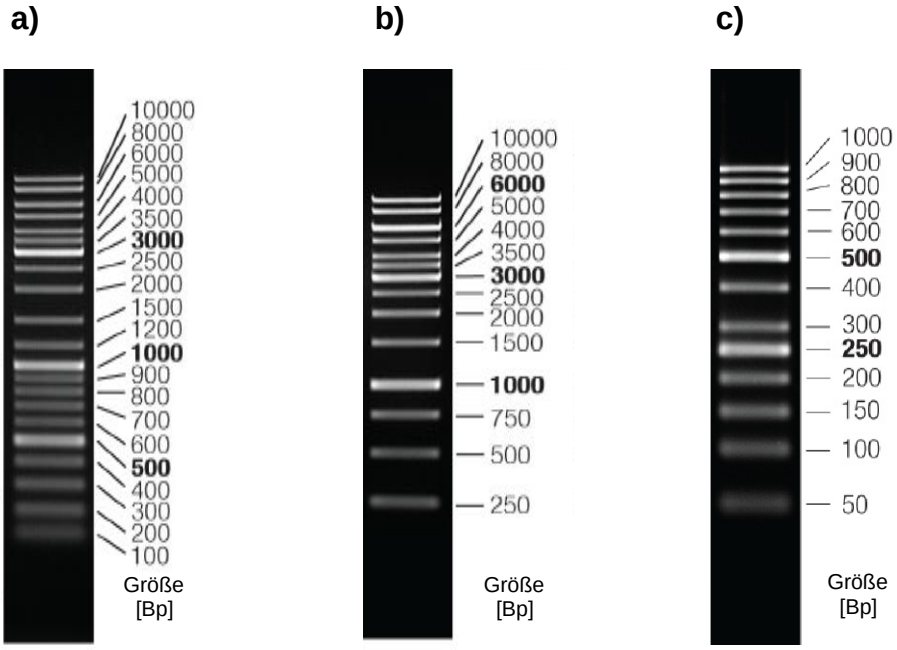

Abbildung 2: Nukleinsäuren-Größenstandards (www.fermentas.com)
a) „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“
b) „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“
c) „GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder“

2.6.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dafür wurde eine 100-µl-Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Extinktion von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook und Russell, 2001).
Die Reinheit konnte aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Dabei liegt der A_{260}/A_{280}-Quotient für reine Nukleinsäure-Lösungen bei DNA zwischen 1,8 und 2,0 bzw. bei RNA zwischen 2,0 und 2,2 (Sambrook und Russell, 2001).

2.6.8. Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.8.1. Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Bei der sequenzspezifischen Restriktionsspaltung von DNA zu analytischen und präparativen Zwecken wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Damit die optimale Aktivität des Enzyms gewährleistet werden konnte, wurden die entsprechend mitgelieferten Reaktionspuffer der jeweiligen Restriktionsenzyme genutzt. Bei Verwendung mehrerer Restriktionsendonukleasen in einem Ansatz, wurde ein Puffer gewählt, in dem alle Enzyme mindestens eine Aktivität von 50-100 % aufwiesen. Die Fermentas GmbH schlägt auf ihrer Internetseite (http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html) die optimalen Bedingungen für einen ausgewählten Doppelverdau vor. Lag jedoch kein geeignetes Puffersystem vor, so wurden die Restriktionsverdaue nacheinander durchgeführt und zwischendurch immer gereinigt (2.6.3.4. und 2.6.3.5.).
Eine abschließende Reinigung erfolgte ebenfalls mit Hilfe molekularbiologischer „Kits“ (Tab. 3). Die Restriktionsspaltung konnte mittels einer nicht-denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese (2.6.4.1.) überprüft werden.

2.6.8.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al*., 2001; mod.)

Nach der Linearisierung eines Vektors durch eine Restriktionsspaltung (2.6.8.1.) können die beiden Enden des Vektors wieder religieren. Das kann eine Verringerung der Ausbeute an neu zusammengesetzten Plasmiden zur Folge haben. Um eine solche Religation zu vermeiden, wurden die 5'-Enden des Vektors durch die SAP „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP, 1 U/µl, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) dephosphoryliert. Dieses Enzym kann direkt in den Restriktionsansatz zugegeben werden, da es in diesem Puffersystem ebenfalls aktiv ist. Die Dephosphorylierung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.
Zur Kontrolle auf erfolgreiche Dephosphorylierung wurde bei der Ligation (2.6.8.3.) ein Ansatz gewählt, der keine Insert-DNA enthält. Nach der folgenden Transformation (2.8.1.) konnte die Anzahl an Religanten bestimmt werden.

2.6.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten (Weiss *et al*., 1968)

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde eine T4-Ligase verwendet, welche ATP-abhängig doppelsträngige DNA-Moleküle durch Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Gruppen verknüpft.
Ligationen erfolgten standardmäßig in 20-µl-Ansätzen, wobei das Konzentrationsverhältnis zwischen Vektorrückgrat und Insert 1:3 betrug. Dabei variierten die Inkubationszeit und die Temperatur, je nachdem welcher Hersteller verwendet wurde. So erfolgte die Inkubation nach Angaben der Roche Diagnostic GmbH über Nacht bei 16 °C. Dahingegen wurde der Ligationsansatz bei Verwendung der T4-Ligase der Fermentas GmbH für 1 h bei 22 °C inkubiert. Eine weitere Variante war die Gradienten-Ligation, bei der beginnend mit 22 °C jede Stunde die Temperatur um 1 °C gesenkt wurde. Bei Erreichen von 16 °C wurde diese Temperatur für 5-12 h gehalten. Alle Ligationen wurden mit einem Hitzeschock (65 °C, 15 min), bei der die Ligase inaktiviert wurde, beendet. Wurden bei einer Transformation kaltkompetente Zellen verwendet, so konnte der Ligationsansatz direkt eingesetzt werden, andernfalls wurden die Ansätze noch einer Dialyse (2.6.3.3.) unterzogen.

2.6.9. Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion

2.6.9.1. Synthetische Oligodesoxynukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide („Primer“) wurden alle von der Firma biomers.net GmbH, Ulm, synthetisiert und bezogen.
Damit eine optimale Anlagerung an die Ziel-DNA gewährleistet werden konnte, wurde beim „Primerdesign“ darauf geachtet, dass die Länge des Oligodesoxynukleotids bei 18-30 Basen lag und der G+C-Gehalt 40-60 % betrug. Des Weiteren sollten am 3'-Ende ein bis zwei G oder C sitzen, um eine bessere Bindung und Elongation zu erhalten. Außerdem wurde zur Vermeidung von Fehlhybridisierung und Leserasterverschiebung beachtet, dass nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten waren. Für das Erstellen der Oligodesoxynukleotide unter Berücksichtigung der erwähnten Parameter wurde das Programm „Clone Manager 7.11“ (Scientific & Educational Software, Cary (USA)) verwendet.

2.6.9.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR; „Polymerase Chain Reaction“, Saiki *et al*., 1985) ist die Standardmethode, um spezifische DNA-Bereiche zu amplifizieren oder auch zusätzlich zu modifizieren. In dieser Arbeit wurde die PCR u. a. auch für den Nachweis von Genen und Plasmiden in Klonen von *E. coli*, *C. acetobutylicum* und *C. sporogenes* verwendet.
Für die PCR sind einige grundlegende Komponenten notwendig. Dazu zählt einmal die Ausgangs-DNA, die den zu amplifizierenden Bereich („Template“) enthält, zwei Oligodesoxynukleotide („Primer“), welche den Startpunkt der DNA-Synthese auf den beiden Einzelsträngen der DNA festlegen, eine hitzestabile DNA-Polymerase und für die Synthese die dNTPs als Bausteine. Zusätzlich ist für die Funktionalität der DNA-Polymerase ein entsprechender Puffer notwendig. Das Prinzip der PCR basiert auf der zyklischen Wiederholung dreier Arbeitsschritte. Der erste Schritt beinhaltet die Denaturierung der DNA. Im zweiten Schritt (Anlagerung) hybridisieren, bei entsprechender Temperatur, die Oligodesoxynukleotide an die beiden Bereiche der Einzelstränge, zu denen sie komplementär sind. Anschließend füllt die DNA-

Polymerase, ausgehend vom 5'-Ende dieses kurzen doppelsträngigen Abschnittes, mit den dNTPs die fehlenden Stränge in 3'-Richtung auf. Nach diesem dritten Schritt wird nun der komplette Zyklus wiederholt, so dass bei einer Anzahl von n Zyklen im Idealfall 2^n Kopien des von den Oligodesoxynukleotiden begrenzten Bereichs synthetisiert werden. Die Hybdridisierungstemperatur T_m ist abhängig von der Länge und der Sequenz der verwendeten Oligodesoxynukleotide und wurde mit folgender Formel (Suggs *et al*., 1981) näherungsweise berechnet:

$$T_m\,[°C] = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Im Folgenden sind ein typischer Standard-PCR-Ansatz und ein Standard-PCR-Programm aufgeführt.

Standard-PCR-Ansatz (50 µl):

2	µl	Oligodesoxynukleotidmix
1	µl	Matrizen-DNA („Template“) ca. 100 ng
1	µl	Oligodesoxynukleotid „forward” (10 pmol/µl)
1	µl	Oligodesoxynukleotid „reverse” (10 pmol/µl)
5	µl	10x Reaktionspuffer (mit MgCl2)
0,5	µl	DNA-Polymerase (1 U/µl)
49,5	µl	H_2O
50	**µl**	**Gesamtvolumen**

Reaktionsbedingungen:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	45 s	32 Zyklen
Hybridisierung	variabel[1)]	45 s	
Elongation	72 °C	variabel[2)]	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

[1)] Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur (Tm) der Oligodesoxynukleotide (Tab. 7).
[2)] Die Elongationszeit wurde abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase und der Fragmentlänge gewählt.

2.6.9.3. „PureTaq Ready-to-Go PCR-beads-Kit“ (Amersham Bioscience)

Die „Beads” dieses „Kit“ beinhalten bereits die für eine PCR notwendigen Komponenten wie eine Polymerase, dNTPs und den Puffer inklusive $MgCl_2$. Lediglich die „Template“- DNA, die beiden Oligodesoxynukleotide und H_2O (ad 25 µl) mussten noch zugegeben werden. Dabei erfolgte die Durchführung strikt nach den Angaben des Herstellers. Hauptsächlich kam dieser „Kit“ zum Einsatz, wenn die „Primer“ auf ihre Funktionalität hin überprüft wurden oder es sich um ein schwer zu amplifizierendes DNA-Fragment handelte.

2.6.9.4. Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR (Woodman, 2008; mod.) konnten nach einer Transformation in einem größeren Maßstab Einzelkolonien auf das Vorhandensein des gewünschten „Insert“-Fragmentes im Vektor geprüft werden. Hierfür wurde in den PCR-Ansatz direkt Zellmaterial von einer Plattenkolonie eingesetzt, um mittels entsprechender Oligodesoxynukleotide den gesuchten DNA-Abschnitt zu amplifizieren. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Einzelkolonie von der Agarplatte gepickt und in den vorbereiteten PCR-Ansatz suspendiert. Anschließend wurde das Programm einer Standard-PCR (2.6.9.2.) durchgeführt.

2.6.9.5. Einfügen von Restriktionsschnittstellen

Mit Hilfe der PCR war es möglich, über spezielle Oligodesoxynukleotide Erkennungssequenzen für ausgewählte Restriktionsendonukleasen an das gewünschte DNA-Fragment anzuhängen. Dadurch kann das resultierende PCR-Fragment entweder bei Verwendung nur einer Restriktionsschnittstelle eine ungerichtete und dementsprechend bei zwei unterschiedlichen eine gerichtete Klonierung durchgeführt werden. Die entsprechenden Erkennungssequenzen wurden jeweils an das 5'-Ende der Oligodesoxynukleotide angefügt. Zusätzlich wurde dieses Ende des „Primers“ noch um ein paar Basen erweitert, um die Bindung des Restriktionsenzyms zu gewährleisten.

2.6.9.6. TA-Klonierung von PCR-Produkten

Bei schwierigen Klonierungen besteht die Möglichkeit mittels dieser Methode PCR-Produkte direkt zu klonieren. In dieser Arbeit wurde der „QIAGEN PCR Cloning Kit“ verwendet. Der beinhaltete Vektor pDrive liegt bereits linearisiert vor und besitzt an seinen 5'-Enden einzelne Desoxythymidinreste. Durch Verwendung einer DNA-Polymerase mit Terminale-Transferase-Aktivität wurden an das 3'-Ende zusätzliche Adenosinbasen angefügt. Diese konnten daraufhin mit dem pDrive-Vektor ligiert werden. Durch die Blau-Weiß-Selektion (2.8.1.6.) konnte der Erfolg der Ligation dann kontrolliert werden.

2.6.10. Sequenzierung von DNA

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung (Sanger *et al*., 1977) konnten hergestellte bzw. klonierte Konstrukte auf mögliche Mutationen überprüft werden. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bzw. von der GATC Biotech AG durchgeführt. Dazu wurden das Volumen und die Konzentration der zu analysierenden Plasmid-DNA, den Anforderungen der jeweiligen Firma entsprechend, eingestellt.

2.7. Arbeiten mit RNA

2.7.1. Vorbehandlung von Lösungen, Geräten und Materialien

Um bei Arbeiten mit RNA die ubiquitär vorkommenden RNasen zu inhibieren, wurden alle verwendeten Lösungen, Geräte und Materialien doppelt autoklaviert und zusätzlich gesondert gelagert. Hitzeempfindliche Materialien sowie alle Arbeitsflächen wurden vor Benutzung mit „RNase-ExitusPlus™“ (AppliChem GmbH, Darmstadt) behandelt. Generell wurden bei allen Arbeiten mit RNA Einweghandschuhe getragen. Des Weiteren wurden grundsätzlich nur gestopfte Spitzen (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg) verwendet.

2.7.2. RNA-Isolierung mittels „Mini RNA Isolation II Kit”

Für die schnelle Isolierung geringerer Mengen an Gesamt-RNA fand der „Mini RNA Isolation II Kit” Anwendung. Dazu wurden 5 ml einer über Nacht angezogenen Kultur zentrifugiert (2000 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Zellsediment in 200 µl „RNA Extraction Buffer“ suspendiert. Alle weiteren Schritte folgten nach Anleitung des Herstellers. Die RNA wurde schließlich in 10 µl H_2O eluiert und konnte direkt weiter verwendet werden.

2.7.3. RNA-Isolierung mittels „RNeasy® Midi Kit“

Die Isolierung der Gesamt-RNA sowohl aus *C. acetobutylicum* als auch aus *C. sporogenes* erfolgte mit Hilfe des „RNeasy® Midi Kit“ der Firma Qiagen. Dazu wurden jeweils 20 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5000 Upm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zunächst in 1 ml TE-Puffer (Tab. 12) suspendiert und dann auf 20 ml aufgefüllt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (5000 Upm, 10 min, 4 °C) wurde das Zellsediment in 800 µl RLT-Puffer (im „Kit“ enthalten) gelöst, mit

10 µl β-Mercaptoethanol versetzt und in Schraubdeckelröhrchen mit Glasperlen transferiert. Im Ribolyser™ erfolgte der Aufschluss in fünf Durchgängen (Speed 6,5; 45 s), wobei jeweils nach zwei Läufen eine 5-minütige Inkubation auf Eis erfolgte. Nach einer sich anschließenden Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein steriles 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers, bis schließlich die Elution mit 2 x 150 µl sterilem und 50 °C warmen H_2O erfolgte.

Tabelle 12: TE-Puffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Tris-HCl (1 M; pH 8)	1 ml	10 mM
EDTA	38 mg	1 mM
H_2O	*ad* 100 ml	
pH 7,8		

2.7.4. DNase-Verdau

Um unerwünschte DNA aus der RNA-Isolierung zu entfernen, wurde ein DNA-Verdau mittels der Invitrogen DNase I durchgeführt. Dafür wurde zunächst die Konzentration der doppelsträngigen Nukleinsäuren (siehe 2.6.7.) bestimmt, wobei schließlich pro 150 µg gemessener DNA 50 U DNase I sowie 1/10 Volumen 10 x DNase-Reaktionspuffer eingesetzt wurden. Nach einer Inkubation bei 37 °C für mind. 2 h erfolgte eine Hitzeinaktivierung der DNase I bei 65 °C für 10 min. Daran schloss sich direkt eine Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA (2.7.5.) an.

2.7.5. Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA mit anschließender Ethanolfällung

Für die RNA-Extraktion wurde vorab jeder Verdauansatz mit sterilem H_2O auf 500 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von jeweils 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) und Invertieren der Ansätze folgte eine Zentrifugation mit 14000 Upm

für 10 min bei 4 °C. Die obere Phase wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen, in ein neues 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) versetzt. Die Ansätze wurden erneut invertiert und einem weiteren Zentrifugationsschritt (14000 Upm, 10 min, 4 °C) unterzogen. Nochmals wurde die obere wässrige Phase in ein neues 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 50 µl 3 M Na-Acetat und 1 ml 99 % Ethanol erfolgte die Fällung der RNA über Nacht bei -20 °C. Hinterher wurden die Ansätze bei 14000 Upm für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach einer Zugabe von 1 ml 70 %-igem Ethanol (v/v) schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (14000 Upm, 10 min, 4 °C) an. Danach wurde der Überstand verworfen und die RNA in der Vakuumzentrifuge ohne Hitze für ca. 20 min getrocknet. Schließlich wurde die RNA in 10 µl sterilem H_2O gelöst und die Konzentration bestimmt.

2.7.6. RNA-Isolierung mittels Trizol

Für die RNA-Isolierung wurde der entsprechende Bakterienstamm in 50 ml Medium bis zur gewünschten OD angezogen, in Falcon-Röhrchen transferiert und für 10 min bei 5000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 600 µl Lysis-Puffer (20 mg/ml Lysozym in SET Puffer [25 % Saccharose, 0,05 M Tris-HCl, 0,05 M EDTA]) suspendiert, kräftig geschüttelt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem Trizol wurde die Lösung vorsichtig auf- und abpipettiert, bis die Zellen lysiert waren. Diese Suspension wurde dann mit 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) versetzt und für 15 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Nun wurde die wässrige obere Phase abgenommen, 500 µl eiskaltes Isopropanol zugegeben und nach ordentlichem Mischen für 10 min wie zuvor zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgekippt und das Sediment mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4 min, 8000 Upm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das RNA-Sediment in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und schließlich in 50 µl H_2O suspendiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

2.7.7. RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

Dieses PCR-Verfahren diente zum Nachweis eines gezielten RNA-Transkripts. Dabei wird vor dem eigentlichen Amplifikationsprozess zunächst die mRNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wird dann als Template in eine Standard-PCR eingesetzt. Hierbei kann ein Amplifikat nur dann erhalten werden, wenn die entsprechende mRNA des Gens gebildet wurde. Im Folgenden ist das Protokoll mit der verwendeten SuperScript™ III Reverse Transcriptase der Firma Invitrogen aufgeführt.

Einzelstrang cDNA-Synthese:

1. - 1 µl Gen-spezifischer „Primer“
   - 10 pg -5 µg RNA
   - 1 µl 10 mM dNTP-Mix
   ad 13 µl H_2O

2. Ansatz für 5 min bei 65 °C erhitzen und für mind. 1 min auf Eis inkubieren.

3. Kurze Zentrifugation aller Komponenten und weitere Zugabe von:

   - 4 µl 5x „First-Strand” Buffer
   - 1 µl 0,1 M DTT
   - 1 µl „RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor”
   - 1 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl)

4. Vorsichtiges Mischen mit Hilfe der Pipette.

5. Inkubation für 30-60 min bei 55 °C.

6. Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C für 15 min.

Die cDNA wird anschließend als Template für die Amplifikation in eine PCR (2.6.9.2.) eingesetzt.

2.8. DNA-Transfer in Bakterien

2.8.1. Transformation von *E. coli*

2.8.1.1. Herstellung kaltkompetenter *E. coli*-Zellen (Inoue *et al*., 1990; mod.)

Zur Herstellung kaltkompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst der gewünschte *E. coli*-Stamm in 5 ml LB-Medium (gegebenenfalls mit dem notwendigen Antibiotikum) angezogen. In einem 1000-ml-Erlenmeyer-Kolben wurden dann mit dieser Vorkultur 250 ml SOB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 18 °C und 100 Upm bis zum Erreichen einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6-0,8. Die Zellen wurden nun für 10 min auf Eis gestellt und daraufhin durch Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit ca. 30 ml TB-Puffer (Tab. 13) gewaschen und nochmals für 10 min auf Eis gehalten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5000 Upm, 10 min, 4 °C) wurden das Sediment in 10 ml TB-Puffer suspendiert und danach tropfenweise 1,5 ml DMSO zugegeben. Anschließend wurde diese Suspension in 200 µl-Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

Tabelle 13: TB-Puffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Lösung 1		
PIPES	756 mg	10 mM
$CaCl_2$	420 mg	15 mM
H_2O	*ad* 125 ml	
pH 6,7 mit KOH einstellen		
Lösung 2		
KCl	4,66 g	250 mM
$MnCl_2$	1,72 g	34,7 mM
H_2O	*ad* 125 ml	

Beide Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert und anschließend steril vereinigt.

2.8.1.2. Transformation kaltkompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation kaltkompetenter *E. coli*-Zellen wurde je ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 1 µl (100-400 ng DNA) einer Plasmidpräparation (2.6.2.) bzw. 20 µl eines Ligationsansatzes (2.6.8.3.) versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock (1 min, 42 °C) ausgesetzt und anschließend für weitere 10 min auf Eis gehalten. Den Zellen wurden 800 µl vorgewärmtes SOC-Medium (2.5.1.) zugegeben und für 60 min bei 37 °C schüttelnd regeneriert. Daraufhin wurden 200 µl direkt auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Die restliche Kultur wurde für 3 min bei 9000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 200 µl abgenommen, das Sediment in diesem suspendiert und ebenfalls auf Selektivagarplatten mittels Glaskugeln ausplattiert. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 1-2 Tage.

2.8.1.3. Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (Dower *et al*., 1988)

Zur Herstellung der elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurde ein 5 ml LB-Röhrchen (gegebenenfalls mit Antibiotikum) mit dem benötigten *E. coli*-Stamm angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden dann 250 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (4 °C, 6000 Upm, 10 min) geerntet. Das Sediment wurde zweimal mit 250 ml eiskaltem H_2O gewaschen. Daran schlossen sich zwei weitere Waschschritte mit 25 ml eiskaltem 10 %-igen (v/v) Glycerin an (Zentrifugation bei 4 °C, 8000 Upm, 10 min). Schließlich wurde das erhaltene Zellsediment in 1 ml 10 %-igem (v/v) Glycerin aufgenommen und die Suspension in 50-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der elektrokompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.8.1.4. Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden vorab 50-µl-Aliquots der elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. In vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,2 cm,

Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) wurden 100-400 ng Plasmid-DNA bzw. der dialysierte Ligationsansatz (2.6.8.3.) vorgelegt. Dazu wurden die elektrokompetenten Zellen pipettiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Durchführung der Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Im Idealfall lag dabei die Zeitkonstante bei 4,5 – 5 ms. Die Zellen wurden direkt nach dem Stromimpuls mit 800 µl vorgewärmtem LB-Medium versetzt und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine einstündige Regenerationsphase bei 37 °C auf dem Schüttler. Nach dieser Inkubationszeit wurden direkt 200 µl mittels Glasperlen auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Die verbliebene Zellsuspension wurde durch einen Zentrifugationsschritt (9000 Upm, 3 min, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf 200 µl abgenommen und das Zellsediment in diesem Rest suspendiert und ebenfalls auf entsprechenden Selektivagarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden für 1-2 Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.8.1.5. Herstellung schnellkompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung schnellkompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte dann, wenn nur einmalig Zellen eines bestimmten *E. coli*-Stamms benötigt wurden. Des Weiteren wurden auf Grund der schlechteren Transformationseffizienz bei diesen Transformationen keine Ligationsansätze verwendet, sondern lediglich Plasmid-DNA.

Zur Herstellung solcher schnellelektrokompetenter Zellen wurden aus einer 5-ml-LB-Übernacht-Kultur des benötigten *E. coli*-Stamm je 2-ml-Aliquots in sterile 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 1 min bei 9000 Upm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit 1 ml sterilem und eiskalten H_2O gewaschen. Daraufhin wurde das Sediment ebenso mit eiskaltem 10 %-igen Glycerin (v/v) gewaschen und schließlich in 100 µl eiskaltem 10 %-igen Glycerin (v/v) suspendiert. 50-µl-Aliquots davon wurden dann direkt in einer Elektroporation eingesetzt.

2.8.1.6. Blau-Weiß-Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Blau-Weiß-Selektion ermöglicht vorab eine Auswahl an potentiell positiven Klonen. Dabei sind die rekombinanten *E. coli*-Klone nach erfolgreicher Insertion in der multiplen Klonierungsstelle eines entsprechenden Vektors von Religanten unterscheidbar.

Das Prinzip dieser Selektion beruht darauf, dass die verwendeten *E. coli*-Stämme auf Grund der chromosomal lokalisierten Deletion *lac*$I^qZ\Delta M15$ keine funktionsfähige β-Galactosidase bilden können. Durch Verwendung eines geeigneten Vektors (z. B. pDrive) mit dem Genlocus (*lacPOZ'*) kann dieser Defekt kompensiert werden (Vieira und Messing, 1982). Da dieser Genort in der multiplen Klonierungsstelle lokalisiert ist, kommt es nach Integration eines DNA-Fragmentes zur Inaktivierung dieses Gens und folglich kann keine funktionsfähige β-Galactosidase mehr gebildet werden. Zur Überprüfung wurde das farblose Substratanalogon X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid) verwendet. Ist die β-Galactosidase funktionsfähig, so hydrolysiert dieses Enzym das X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl, welches wiederum in Verbindung mit Sauerstoff zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird. Daher färben sich die Religanten (ohne Insert) blau, wohingegen die positiven Klone (mit Insert) weiß bleiben.

Für die Anwendung des Blau-Weiß-Tests wurden die Selektivagarplatten vor Benutzung wie in 2.5.4.2. beschrieben behandelt.

2.8.2. Transformation von Clostridien

2.8.2.1. Methylierung von Plasmid-DNA für die Transformation in *C. acetobutylicum*

Ein in *C. acetobutylicum* vorhandenes sequenzspezifisches Restriktionssystem führt zur Degradierung von fremder DNA. Die aus *E. coli* präparierten Plasmide würden somit direkt nach der Transformation wieder abgebaut werden. Um die Plasmide vor einem solchen Abbau zu schützen, wurden diese durch eine Methyltransferase aus dem *Bacillus subtilis*-Phagen Φ3T I (Noyer-Weidner *et al*., 1983; Noyer-Weidner *et al*., 1985; Tran-Betcke *et al*., 1986) methyliert. Durch die Methylierung des internen

Cytosins der Basenfolge 5'-GGCC-3' und 5'-GCNGC-3' (Balganesh *et a*l., 1987) wird die Plasmid-DNA vor dem Abbau der Restriktionsendonuklease *Cac*824I in *C. acetobutylicum* bewahrt (Mermelstein und Papoutsakis, 1993).
Deshalb wurden die zur Elektroporation eingesetzten Vektoren zuvor *in vivo* in *E. coli* methyliert. Dazu wurden die *E. coli*-Stämme XL1-Blue MRF' oder SURE® verwendet, da diese keines der Restriktionssysteme McrA, McrBC und Mrr besitzen. Diese würden DNA schneiden, bei der das Cytosin der Sequenz 5'-CG-3' methyliert ist. Die Methyltransferase ist auf dem Plasmid pANS1 (Böhringer, 2002) kodiert. Dieser Vektor wurde zunächst in den erwähnten *E. coli*-Stämmen etabliert und daraufhin wurden diese mit dem zu methylierenden Plasmid transformiert. Die so modifizierte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe einer Minipräparation (2.6.2.1.) isoliert. Der pANS1-Vektor musste aus dieser Isolierung nicht entfernt werden, da dieser keinen Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien trägt. Durch einen Restriktionsverdau (2.6.8.1.) mit *Sat*I (Erkennungssequenz: 5'-CG*NGC-3') konnte eine erfolgreiche Methylierung überprüft werden.

2.8.2.2. Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation

Für die Transformation wurden zunächst 5 ml CG-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum) mit einem 100-µl-Aliquot einer vorher pasteurisierten Sporensuspension beimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden mit dieser Vorkultur 50 ml vorgewärmtes CG-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotikum) auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1 beimpft und bis zu einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6 kultiviert. Alle weiteren Schritte erfolgten in der Anaerobenkammer. Hierbei wurde zunächst die Kultur bei 6500 Upm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend einmal mit 1 Vol. kaltem ETM-Puffer gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (6500 Upm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellsediment in 3 ml kaltem ET-Puffer suspendiert. Ausgehend von dieser Zellsuspension konnten 5 Transformationen durchgeführt werden. Dazu wurden jeweils 600 µl in die vorgekühlten Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 4 mm, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) überführt, in die zuvor 2 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA vorgelegt worden waren. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 600 Ω und 50 µF. Nach jedem Impuls wurden die Zellen direkt in 1,4 ml CG-Medium überführt und für

4 h oder über Nacht regeneriert. Danach wurden jeweils 300 µl mittels Glaskugeln auf Selektivagarplatten ausplattiert. Diese wurden mit Parafilm verschlossen und für 3-5 Tage bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 14: ETM-Puffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Saccharose	92,3 g	270 mM
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	106,7 mg	0,6 mM
NaH_2PO_4 x H_2O	600 mg	5 mM
Magnesiumchlorid Hexahydrat	42,7 g	210 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	
pH 6		

Der ET-Puffer entspricht dem ETM-Puffer, dieser enthält lediglich kein Magnesiumchlorid.

2.8.2.3. Konjugation von *C. sporogenes* mit *E. coli* CA434 (Purdy *et al*., 2002)

Der konjugative Transfer von DNA in *C. sporogenes* erfolgte unter Verwendung des Donorstamms *E. coli* CA434. Dazu wurden über Nacht sowohl *C. sporogenes* in 5 ml 2YT-Medium als auch der Donorstamm mit dem zu übertragenden Plasmid in 5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) angezogen. Von der *E. coli* CA434-Vorkultur wurde dann ein 1-ml-Aliquot für 1 min bei 8000 Upm zentrifugiert und das resultierende Zellsediment vorsichtig, um ein Abscheren der Pili zu verhindern, mit 0,5 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die folgenden Schritte unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde das erhaltene Zellsediment in 200 µl der *C. sporogenes*-Übernachtkultur aufgenommen. Diese Suspension wurde dann in 10-µl-Portionen auf eine 2YT-Agarplatte aufgetropft und nicht invertiert für 7-8 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden nun mit 2 ml anaerobem PBS-Puffer unter Zuhilfenahme einer Einweg-Impföse abgeschabt bzw. abgeschwemmt. Von diesem Konjugationsgemisch wurden 100 µl direkt auf Selektiv-Agarplatten mit Hilfe von Glaskugeln ausplattiert. Dabei wurde für die Selektion gegen den Donorstamm *E. coli* 434 Colistin eingesetzt, da dieses letal für Gram-negative,

aber unwirksam gegen Gram-positive Bakterien ist (Böhringer, 2002; Bertram *et al*., 1991). Das restliche Konjugationsgemisch wurde 2 min bei 4 °C für 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl verworfen, das Sediment darin suspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Agarplatten wurden mit Parafilm versiegelt und für 3-5 Tage bei 37 °C anaerob inkubiert.

Tabelle 15: PBS-Puffer (1x)

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
NaH_2PO_4	1,44 g	12 mM
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	15,6 g	88 mM
NaCl	5,84 g	100 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	
pH 7,4		

2.9. Arbeiten mit Proteinen

2.9.1. Herstellung von Zellextrakten

Zur Extrahierung der Proteine aus den Zellen wurden folgende Aufschlussmethoden verwendet:

2.9.1.1. „Ribolyser™ Cell Disruptor“

Bei der Herstellung von Zellextrakten aus geringem Kulturvolumen wurde der „Ribolyser™ Cell Disruptor“ (Hybaid GmbH, Heidelberg) verwendet. Dieser quantitative Zellaufschluss erfolgt mechanisch durch Zertrümmern der Zellen mit Glasperlen. Dazu wurden die Kulturen in Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 1 ml Aufschlusspuffer (20 mM KP-Puffer, pH 7) suspendiert und in ein Schraubdeckelröhrchen mit 250 mg Glasperlen (Ø 0,1 mm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf) überführt. Das Schraubdeckelröhrchen wurde dann im Ribolyser arretiert und für 45 s auf Stufe 6,5 bei 4° C aufgeschlossen. Dieser Vorgang wurde fünf Mal wiederholt, wobei jeweils

nach zwei Durchgängen eine 5-minütige Inkubation auf Eis erfolgte, um ein Denaturieren der Proteine auf Grund der entstandenen Reibungswärme zu vermeiden. Nach einer abschließenden Zentrifugation (14000 Upm, 30 min, 4 °C) konnten die Überstände mit der Pipette abgenommen und in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt werden.

2.9.1.2. French® Pressure Cell-Press

Die „French Press“ (Milner *et al*., 1950) ist ein Zellaufschlussgerät, bei dem die Bakteriensuspension in einen vorgekühlten Zylinder gegeben wird, dessen Auslass verschlossen ist. Mit einem Stempel wird dann ein hoher Druck auf die Suspension ausgeübt, woraufhin das Ventil soweit geöffnet wird, dass die Suspension unter geringem Volumenstrom aus der Düse der Druckzelle austreten kann. Die dabei entstehende Entspannung sorgt für das Aufplatzen der Zellen und die damit verbundene Freisetzung des Zellinhaltes.
Zunächst wurden 50 ml Kultur in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen zentrifugiert (10 min, 5000 Upm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 2-3 ml Puffer (20 mM Tris/HCl; pH 7,6) suspendiert. Für einen Zellaufschluss bei *E. coli* waren zwei Durchgänge durch die Presse ausreichend. Nach Zentrifugieren (20 min, 5000 Upm, 4 °C) der Zelltrümmer wurden die Überstände bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

2.9.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach „Pierce“

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde der „Pierce BCA™ Protein Assay“ verwendet. Diese Methode ist eine Kombination aus der Biuret-Reaktion (Levin und Brauer, 1951), bei der im alkalischen Milieu durch Proteine Kupfer-II-Ionen zu Kupfer-I-Ionen reduziert werden, und der hoch sensitiven Detektion von Kupfer-I-Ionen durch die Verwendung des Natriumsalzes der „Bicinchoninic acid“

(BCA; Smith *et al*., 1985). In einem Verhältnis 2:1 zwischen BCA und Kupferion zeigt sich das Produkt dieser Reaktion als purpurner Farbkomplex.
Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. So wurden in „96-Well-Platten“ 25 µl Probe bzw. Standard zu 200 µl BCA-Arbeitslösung gegeben und dieser Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion jeder Probe bei einer Wellenlänge λ von 562 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. An Hand der zuvor erstellen Kalibriergerade konnte nun die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.9.3. Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätschromatographie

Durch die Verwendung der Ni-NTA-Affinitätschromatographie können poly-Histidin-fusionierte Proteine spezifisch gereinigt bzw. isoliert werden. In dieser Arbeit verfügten die rekombinanten Proteine über einen 6x-Histidin-Rest („*his_6-tag*“) am C-terminalen Ende. Für die Affinitätschromatographie wurde als stationäre Phase die Ni-NTA Agarose der Firma Qiagen GmbH, Hilden verwendet. Für die Reinigung wurde eine 10-ml-Säule gemäß den Angaben des Herstellers (GE Healthcare EUROPE GmbH, München) zusammengebaut. Dann wurden direkt auf das Filterplättchen 500 µl der Ni-NTA-Agarose-Lösung gegeben. Nach Äquilibrieren der Säule mit 5 ml 10 mM Imidazolpuffer wurde der Kulturüberstand (50 ml) auf die Säule geladen, durch Schütteln mit dem Säulenmaterial gemischt und für 5 min inkubiert. Während dieser Inkubation und dem anschließenden Durchtropfen (der Durchfluss wurde in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen) bindet das rekombinante Protein an die freien Koordinationsstellen des Liganden. Durch einen Waschschritt mit 5 ml 30 mM Imidazolpuffer werden unspezifisch gebundene Verunreinigungen entfernt. Die Elution des spezifisch gebundenen Proteins erfolgte durch Waschen mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (75 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM, 1 M). Bei diesen Waschschritten wurden zweimal jeweils 1 ml Imidazol-Puffer zugegeben und die Säule kräftig geschüttelt. Nach einer 3-minütigen Inkubation wurde das Eluat durchgetropft und jeweils in einem 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen.
Die verschiedenen Fraktionen wurden bei 4 °C gelagert oder direkt weiterverwendet. Für die Reinigung der Säule wurde diese zweimal mit 10 ml 1 M Imidazol-Puffer gewaschen und anschließend mit 30 %-igem Ethanol befüllt und bei 4 °C gelagert.

2.9.4. Mikrokonzentratorsäulen

Für das Konzentrieren von Proteinen wurden die in Tabelle 16 aufgeführten Konzentratorsäulen genutzt. Durch die Verwendung unterschiedlicher Porengrößen der Filter dieser Säulen war es möglich, Proteine mit einem bestimmten Molekulargewicht oder auch Medienrückstände abzutrennen. Dabei wurden jeweils die Angaben des Herstellers befolgt.

Tabelle 16: Verwendete Mikrokonzentratorsäulen

Konzentrator	Lieferant/Hersteller
VIVASPIN 500	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Microcon Ultracel YM-100 Microcon Ultracel YM-50 Microcon Ultracel YM-10	Milipore Corporation, Bedford (USA)
Nanosep centrifugal Devices with OmegaTM Membrane	Pall Corporation, Ann Arbor (USA)

2.9.5. Isolierung bakterieller Proteine aus der Cytosol- und Membranfraktion (Penecky und Coon, 1996; mod.)

Für die Isolierung der Proteine aus der Cytosol- und Membranfraktion wurde der Zellextrakt (2.9.1.) in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und austariert. Der anschließende Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge erfolgte für 1 h 30 min bei 45000 Upm und 4 °C. Der Überstand, welcher die Cytosolproteine beinhaltete, wurde abgenommen, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Des Weiteren wurde das Sediment nun mit Hilfe eines Spatels entnommen und in einem Homogenisator in 50-100 µl KP-Puffer (20 mM, pH 7) suspendiert. Diese Suspension enthält die zu untersuchende Membranfraktion und wurde kurzzeitig bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

2.9.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (PAGE)

2.9.6.1. Denaturierende diskontinuierliche SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektophorese ist eine Methode zur denaturierenden Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse (Lämmli *et al*., 1970). Das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) ist in der Lage, an Proteine zu binden und kann somit deren Eigenladung überdecken. Dadurch ist gewährleistet, dass eine Migration der negativ geladenen Proteine nach Anlegen einer elektrischen Spannung zur Anode erfolgt. Dabei wandern kleinere Proteine schneller durch das Gel, während größere Proteine von der Polyacrylamid-Matrix retardiert werden. Dieses unterschiedliche Laufverhalten ist auf die jeweilige Größe der Proteine zurückzuführen und ermöglicht so, mit Hilfe eines Größenstandards, eine Größenabschätzung der zu untersuchenden Proteine. Für die Herstellung der hier verwendeten Polyacrylamid-Gele wurden zunächst geeignete Glasplatten (14,7 x 9,2 x 0,3 cm) mit Wasser und 80 %-igem Ethanol (v/v) gereinigt bzw. entfettet. Anschließend wurden die Glasplatten, abgedichtet mit Dichtungsgummis, in entsprechende Gießvorrichtungen gespannt. Zunächst wurde die Trenngellösung hergestellt (Zusammensetzung siehe Tabelle 17), welche bis etwa 2 cm unter die Oberkante der Ohrenplatte gegossen wurde. Dabei fungiert APS als Radikalinitiator und TEMED dient zur Quervernetzung zwischen Acrylamid und Bisacrylamid. Das Trenngel wurde entweder mit 1-Butanol oder 2-Propanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu erhalten. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Überschichtungsmaterial abgekippt und das Sammelgel darüber gegossen. In dieses wurde ein Kamm luftblasenfrei hineingesteckt. Sobald auch das Sammelgel polymerisiert war, konnte das Gel für die Elektrophorese eingesetzt werden.

Tabelle 17: SDS-PAGE Gelzusammensetzung

Zusammensetzung	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
Rotiphorese, 40 %	2,08 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer	2,08 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
H_2O	4,17 ml	3,25 ml
APS, 10 %	75 µl	30 µl
TEMED	7,5 µl	15 µl

Tabelle 18: Trenngelpuffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Tris	68,8 g	2,17 M
H_2O	*ad* 250 ml	
pH 8,8 mit HCl einstellen		

Tabelle 19: Sammelgelpuffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Tris	37,8 g	1,25 M
H_2O	*ad* 250 ml	
pH 6,8 mit HCl einstellen		

Tabelle 20: Lämmli-Probenpuffer (5-fach konzentriert)

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
1 M Tris-HCl, pH 6,8	3,2 ml	104 mM
SDS	1,5 g	958 mM
Glycerin	3,5 ml	35,8 mM
ß-Mercaptoethanol	2,5 ml	57,8 µM
Bromphenolblau	2 mg	

Tabelle 21: 10 x Elektrophoresepuffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Tris	30,3 g	0,25 M
Glycin	142,6 g	1,92 M
SDS	10 g	34,7 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	

2.9.7. Proteinfärbung in Polyacrylamid-Gelen

2.9.7.1. Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969; mod.)

Polyacrylamid-Gele wurden nach der elektrophoretischen Trennung in die Coomassie-Färbelösung gegeben und darin mindestens 30 min oder über Nacht unter leichtem Schwenken auf dem Taumler inkubiert. Dabei bindet der Farbstoff an die aromatischen und basischen Seitenketten der Aminosäuren. Da sich das gesamte Gel blau einfärbt, wurde solange mit Entfärbelösung gewaschen, bis der nicht gebundene Farbstoff aus dem Gel entfernt und die Proteine als blaue Banden im Gel sichtbar waren. Die untere Nachweisgrenze bei dieser Methode liegt bei ca. 100 ng pro Bande.

Tabelle 22: Coomassie-Färbe-/Entfärbelösung

Coomassie-Färbelösung		
Coomassie Brilliant Blue G 250	0,04	% (w/v)
Methanol	40	% (v/v)
Essigsäure	10	% (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung		
Methanol	40	% (v/v)

2.9.7.2. Silberfärbung (Blum *et al*., 1987)

Diese Methode weist im Vergleich zu coomassiegefärbten Gelen eine höhere Sensitivität auf. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 0,1 bis 1 ng pro Bande. Bei diesem Verfahren werden die Polyacrylamid-Gele nach der Elektrophorese für mindestens

30 min in Fixierlösung gelegt. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 10 min mit 50 %-igem Ethanol (v/v) wurden die Gele für 1 min in Thiosulfatlösung geschwenkt und anschließend dreimal für 20 s mit Wasser gewaschen. Darauf folgte eine 15-minütige Inkubation in frisch angesetzter Silbernitratlösung. Überschüssiges Silber wurde durch zweimaliges Waschen mit Wasser für jeweils 20 s entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Proteine nach Zugabe der Entwicklerlösung visualisiert. Dabei werden die Silberionen durch das alkalische Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert. Nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität erfolgten ein kurzer Waschschritt mit Wasser und eine abschließende Inkubation für 15 min in der Stopplösung. Die Gele wurden dann eingescannt und ausgewertet.

Tabelle 23: Fixierlösung

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Methanol	500 ml	12,27 M
Eisessig	120 ml	2,1 M
Formaldehyd 37 % (v/v)	0,5 ml	13,6 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	

Tabelle 24: Thiosulfatlösung

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
$Na_2S_2O_3$ x 5 H_2O	0,2 g	0,81 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	

Tabelle 25: Silbernitratlösung

Zusammensetzung [1)]	Menge	Konzentration
$AgNO_3$	0,2 g	11,77 mM
Formaldehyd 37 % (v/v)	75 µl	20,36 mM
H_2O	*ad* 100 ml	

[1)] Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Tabelle 26: Entwicklerlösung

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Na_2CO_3	60 g	0,57 M
Thiosulfatlösung	20 ml	0,0162 mM
Formaldehyd 37 % (v/v)	0,5 ml	0,05 % (v/v)
H_2O	*ad* 1000 ml	

2.9.8. Western-Blot: Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Mit Hilfe dieser Methode werden Proteine nach der Elektrophorese von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen übertragen (Towbin *et al*., 1979; mod.). Dafür wurden zunächst das Sammelgel entfernt und vier Filter aus „Whatman"-Papier (Whatman International Ltd., Maidstone; England) und eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Anschließend wurden die Filter und die Membran in Transferpuffer getränkt. Zwischen jeweils zwei Schichten „Whatman"-Papier wurden dann die Membran und darauf das Gel auf Anodenseite der „Fastblot"-Apparatur Typ B33 (Biometra, Biometra GmbH, Göttingen) luftblasenfrei angeordnet. Nach Auflegen der Kathodenseite wurde der Transfer der Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 Gelfläche für 1-2 Stunden durchgeführt. Aufgrund der negativen Ladung der Proteine kommt es durch Anlegen eines elektrischen Stromflusses zur Migration der Proteine aus dem Gel in Richtung Anode und somit auf die Nitrocellulose-Membran. Die Membran wurde nach der Übertragung direkt für die Immunfärbung verwendet.

Tabelle 27: Transferpuffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
Tris	5,8 g	48 mM
Glycin	2,8 g	37 mM
SDS	0,37 g	1,28 mM
100 % Methanol	200 ml	4,9 M
H_2O	*ad* 1000 ml	

2.9.9. Immunfärbung von Proteinen

Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde diese über Nacht in 5 % (w/v) fettarmer Trockenmilch in PBS-Puffer (Tab. 28) inkubiert, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen abzusättigen. Nach Entfernen des überschüssigen Blockreagenz durch mehrmaliges Waschen (3 x 5 min) mit PBS-Puffer wurde die Membran mit dem Erstantikörper für eine Stunde auf dem Taumler inkubiert. Da es sich in dieser Arbeit hauptsächlich um die spezifische Detektion eines „his-tag“-Fusionsproteins handelte, war der Erstantikörper (Maus-Anti-$His_{6,}$ 1:250 in 10 ml PBS) gegen den „his-tag“ des auf der Membran immobilisierten Proteins gerichtet.

Nach dieser Inkubationszeit wurde die Membran erneut mit PBS-Puffer (3 x 5 min) unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend wurde der, gegen die Epitope des Erstantikörper gerichteten Meerettich-Peroxidase-gekoppelte, Zweitantikörper (Anti-Maus Ig-Peroxidase, 1/1000 in PBS plus 5 % fettarme Trockenmilch) zugegeben und unter schwachem Schütteln für 60 min inkubiert. Die oben genannten Waschschritte wurden wiederholt. Die Detektion erfolgte schließlich durch Zugabe von 10 ml frischer Peroxidase-Substratlösung plus 10 µl 30 %-igem H_2O_2, bis dunkle Banden sichtbar waren oder der Hintergrund angefärbt wurde. Das in der Substratlösung enthaltene 4-Chlor-1-naphtol bildet dabei einen wasserunlöslichen Niederschlag. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser abgestoppt und die Membran anschließend gescannt und ausgewertet.

Tabelle 28: PBS-Puffer

Zusammensetzung	Menge	Konzentration
NaCl	8 g	136,89 mM
KCl	0,2 g	2,68 mM
Na_2HPO_4	1,44 g	8,09 mM
KH_2PO_4	0,24 g	1,74 mM
H_2O	*ad* 1000 ml	
pH 7,4 mit HCl einstellen		

2.9.10. Größenbestimmung von Proteinen

Durch Verwendung des Größenmarkers „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (Abbildung 3), konnte die molekulare Masse von Proteinen im Polyacrylamid-Gel oder nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran bestimmt werden.

Dazu wurden 3-5 µl des Größenmarkers in einer separaten Ladetasche mit auf das Gel aufgetragen.

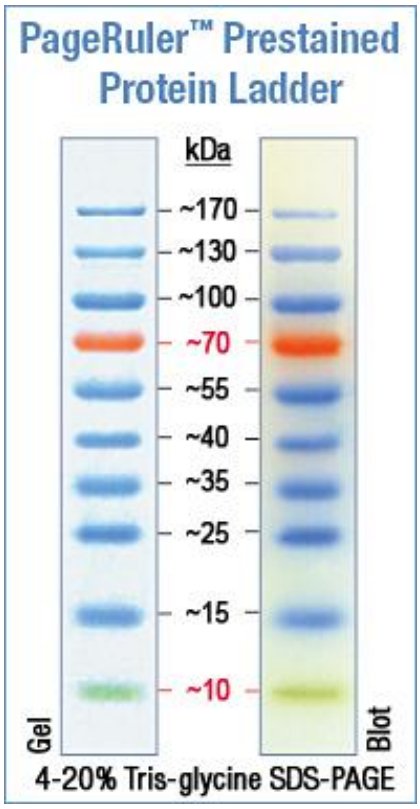

Abbildung 3: Protein-Größenmarker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.10. „ClosTron™ Gene Knockout System“

Das „ClosTron™ Gene Knockout System“ stellt eine schnelle und effiziente Methode zur gezielten Geninaktivierung durch Integration eines mobilen Gruppe II Introns aus *Lactococcus lactis* dar (Frazier *et al*., 2003). Dabei basiert das Prinzip auf dem für *E. coli* konzipierten „TargeTron™-System. Jedoch sind weder der Promoter noch der Integrationsmarker des „TargeTron™-Plasmids“ pACD4K-C in Clostridien funktionell. Basierend auf dieser Tatsache wurde speziell für die Anwendung in Clostridien der äquivalente Vektor pMTL007 entwickelt. Dieses Plasmid wurde u. a. mit einer modifizierten *ermB*-Resistenzkassette versehen. Des Weiteren steht das Gruppe-II-Intron unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *fac*-Promoters. Die Sequenz dieses Promoters setzt sich aus der Promotersequenz der Ferredoxingene aus *C. pasteurianum* und der Sequenz des *E. coli lacZ*-Operons zusammen (Heap *et al*., 2007). Während des sog. „retro-homing“ integriert das Gruppe-II-Intron mit Hilfe des LtrA-Proteins in das Zielgen (Cousineau *et al*., 1998).
Durch die Verwendung einer ErmRAM-Kassette (Erythromycin „Retrotransposition-Activated selectable Marker“) ist eine zusätzliche Selektion der Integrationsmutanten möglich. Hierbei ist die Erythromycinresistenz aktiv, sobald bei erfolgreicher Integration das im *Er*^{R}-Gen enthaltene Gruppe-I-Intron sich auf RNA-Ebene selbst herausschneidet.
Bei der Nachfolgegeneration des „ClosTron™ Gene Knockout Systems“ wurde der oben erwähnte induzierbare *fac*-Promoter gegen den konstitutiv aktiven *fdx*-Promoter aus *C. sporogenes* ausgetauscht. Dadurch wird eine sofortige Expression der Inaktivierungskassette gewährleistet (Heap *et al*., 2009a). Des Weiteren trägt der resultierende Vektor pMTL007c-E2, unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *thlA*-Promoters, die Sequenz für das *flp*-Gen. Dieses kodiert für eine Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae*, welche das Ausschneiden des Selektionsmarkers der *ermB*-Kassette spezifisch an einer 65 Bp langen, inverse Sequenzwiederholungen enthaltenden „Flp-recognition-target-site (FRT)“ katalysiert (Cherepanov und Wackernagel, 1995).

Durch eine SOE-PCR (2.10.1.) wurde die Erkennungssequenz des Introns an das Zielgen angepasst. Auf der Internetseite der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Schnelldorf wird ein Programm angeboten, welches über einen computergestützten Algorithmus geeignete Integrationsstellen berechnet und automatisch die „Primer“ generiert (http://www.sigma-genosys.com/targetron/).

2.10.1. SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension PCR)

Basierend auf dem Prinzip der SOE-PCR kann die Erkennungssequenz des Introns durch Austausch einzelner Basen soweit mutiert werden, dass es in das Zielgen inseriert (Ho *et al*., 1998). Dabei werden drei Reaktionsansätze zu einem einzigen Schritt („one-step-SOE-PCR) zusammengefasst (Chamberlain *et al*., 1988).
Die erforderlichen Oligodesoxynukleotide IBS, EBS1d und EBS2 mit den entsprechenden Punktmutationen wurden mit Hilfe des Computerprogramms der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf ermittelt.
Entsprechend der Anleitung des Handbuches zum „TargeTron™ Gene Knockout System“ wurde unter Verwendung des „FailSafe™ PCR-Systems“ die SOE-PCR wie folgt durchgeführt.

Oligodesoxynukleotidmix:

1 µl	IBS	(100 µM)
1 µl	EBS1d	(100 µM)
1 µl	EBS2	(20 µM)
1 µl	EBS Universal[1)]	(20 µM)
6 µl	H_2O	
10 µl	**Gesamtvolumen**	

[1)] Im „ClosTron™ Gene Knockout System enthalten.

Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

SOE-PCR-Ansatz:

1	µl	Oligodesoxynukleotidmix
1	µl	Intron-Matrize[1)] (1:10 verdünnt)
0,5	µl	FailSafe™ DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
25	µl	Failsafe™ 2x Premix E
22,5	µl	H_2O
50	**µl**	**Gesamtvolumen**

[1)] Im „ClosTron™ Gene Knockout System enthalten.

Nachstehendes Programm wurde für die PCR verwendet:

Reaktionsbedingungen:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	15 s	30 Zyklen
Hybridisierung	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Kühlung	4 °C	∞	

Das resultierende 350 Bp lange Fragment wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.6.4.1.) überprüft, die entsprechende Bande ausgeschnitten und gereinigt (2.6.3.5.).

2.10.2. Restriktionsspaltung von DNA-Fragment und Vektor pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 mit *Hin*dIII und *Bsr*GI

Das gereinigte PCR-Produkt wurde für die Ligation (2.6.8.3.) in den Vektor pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 zunächst mit *Hin*dIII und *Bsr*GI geschnitten. Ebenso wurde der Vektor mit denselben Restriktionsenzymen linearisiert und zusätzlich dephosphoryliert (2.6.8.2.). Dabei erfolgte der Doppelverdau (2.6.8.1.) in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer für 1 h bei 37 °C. Nach dem Inaktivierungsschritt (10 min bei 80 °C) konnte das DNA-Fragment aus der Lösung gereinigt werden. Dagegen musste der dephosphorylierte Vektor, welcher schon ein inseriertes DNA-Fragment trug, von diesem durch Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt und anschließend aus dem Gel gereinigt werden. Dabei ist das „backbone“ des linearisierten pMTL007 ca. 11,5 kBp groß und das des pMTL007c-E2 ca. 8,5 kBp.

2.10.3. Ligation von DNA-Fragment und Vektor pMTL007 bzw. pMTL007c-E2

Die Ligation von verdautem PCR-Produkt und Vektorrückgrat pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 erfolgte analog der in 2.6.8.3. beschriebenen Methode. Der komplette

Ligationsansatz wurde in kaltkompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert. Eine erste Selektion positiver Klone erfolgte über Chloramphenicol. Einzelne Kolonien wurden dann in selektivem Flüssigmedium angezogen, um daraus Plasmid-DNA zu isolieren (2.6.2.1.), welche durch einen analytischen Restriktionsverdau (2.6.8.1.) und schließlich mittels Sequenzierung (2.6.10.) überprüft wurde.

2.10.4. Transformation von pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 in *C. acetobutylicum*

Für die Transformation wurden die Vektoren pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 mit den modifizierten Intronsequenzen zuerst in *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANS1) *in vivo* methyliert (2.8.2.1). Durch einen analytischen Restriktionsverdau wurde die Plasmidpräparation auf erfolgreiche Methylierung hin überprüft, die Konzentration bestimmt (2.6.7.) und in *C. acetobutylicum* transformiert. Der Transformationsansatz wurde nach 4 h oder über Nacht auf CGM-Agarplatten mit 15 µg/ml Thiamphenicol (pMTL007) bzw. 2,5 µg/ml Clarithromycin (pMTL007c-E2) ausplattiert.

2.10.5. Induktion der Integration in *C. acetobutylicum* (nur bei Verwendung des Vektors pMTL007)

Von einer Übernachtkultur der Transformanten (2.8.2.2.) wurden 100 µl steril mit der Spritze in ein Hungate-Röhrchen mit 900 µl CGM und 15 µg/ml Thiamphenicol überimpft. Nach einer Inkubation von etwa 3 h bei 37 °C wurde die Kultur mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (6000 Upm, 1 min, RT) wurden die Zellen mit 500 µl PBS (Tab. 28) gewaschen und das Sediment in 1 ml CGM aufgenommen. Nach einer weiteren Inkubation von 3 h bei 37 °C wurden 200 µl dieser Suspension unter anaeroben Bedingungen auf einer CGM-Agarplatte mit 2,5 µg/ml Clarithromycin ausplattiert, mit Parafilm versiegelt und für 3-5 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.10.6. Kontrolle der Integration mittels PCR

Nach Isolierung der Gesamt-DNA (2.6.2.3.) aus den Integrationsmutanten wurde diese DNA als „Template“ in eine Standard-PCR (2.6.9.2.) eingesetzt. Für die Kontrolle, ob die Integration am gewünschten Bestimmungsort erfolgte, wurden die Oligodesoxynukleotide so gewählt, dass einer vor der Insertionsstelle band und der andere stromabwärts im Gen (EBS1d-Oligodesoxynukleotid) bzw. einer hinter der Insertionsstelle und der andere stromaufwärts im Gen (EBS2-Oligodesoxynukleotid). Das Resultat der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.6.4.1.) ausgewertet, wobei bei erfolgreicher Integration des Gruppe-II-Introns das PCR-Produkt eine Größe von ca. 2,1 kBp aufweisen sollte.

3. Ergebnisse

3.1. Hintergrund und Zielsetzung

Für die vorgesehene therapeutische Anwendung ist es erforderlich, das CPE mit einer Signalsequenz zu erweitern, damit das Toxin aktiv aus den vegetativen *Clostridium*-Zellen ausgeschleust werden kann.

Während seiner Doktorarbeit konnte G. Box einen *E. coli-C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor konstruieren, welcher die genetische Information des Toxins trägt und bereits mit der Sequenz eines Signalpeptids (von AmyP, einer Amylase aus *C. acetobutylicum*) erweitert ist. Dabei steht die Genexpression dieses Fusionsproteins AmyP'-CPE unter der Kontrolle des schwach konstitutiv aktiven *bdhA*-Promoters der Butanol-Dehydrogenase aus *C. acetobutylicum*. Das resultierende p7BIG2TOX-Plasmid (siehe Abb. 4) konnte erfolgreich in *C. acetobutylicum* transformiert werden.

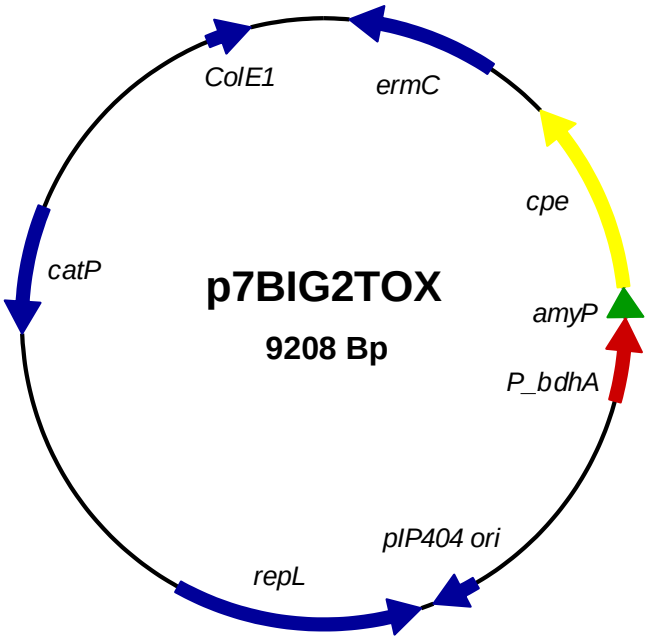

Abbildung 4: Plasmidkarte von P7BIG2TOX

Auch konnte das Fusionsprotein im Kulturüberstand in einer Konzentration von 0,5 mg/l (Box, 2006) nachgewiesen werden. Jedoch wurde im *in vivo*-Mausmodell keine Wirkung des Toxins festgestellt, was wohl auf eine zu geringe Konzentration zurückzuführen ist.
Des Weiteren zeigte sich bereits bei den Klonierungsarbeiten, dass sogar eine schwache konstitutive Expression dieses modifizierten Gens für den Zwischenwirt *E. coli* ein außerordentliches Wachstumsdefizit zur Folge hat. Nur durch die Verwendung eines weiteren Resistenzgens (*ermC*) gelang es überhaupt, diesen einen positiven Klon zu identifizieren.
Deshalb arbeitete D. Meisohle während seiner Doktorarbeit u. a. auch an dem Versuchsansatz, ein asRNA-System zur Dämpfung der schädlichen CPE-Produktion in *E. coli* zu etablieren. Jedoch konnte die Expression einer entsprechenden asRNA nicht nachgewiesen werden.
Um kritische Klonierungsarbeiten in *E. coli* zu vermeiden, wurden bereits auch andere denkbare Zwischenwirte wie *Lactococcus lactis* (Meisohle, 2010) und *Bacillus subtilis* (Wensche, 2009) als potentielle Alternative untersucht. Allerdings gelang die Etablierung eines Ersatz-Zwischenwirtes mit den genannten Kandidaten nicht.

Da der Einsatz eines Zwischenwirtes für diverse Klonierungsschritte unumgänglich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst das Ziel verfolgt, ein Expressionssystem zu entwickeln, das die Verwendung von *E. coli* als Zwischenwirt ermöglicht. Darauf aufbauend soll das System soweit optimiert werden, dass in *C. acetobutylicum* bzw. in *C. sporogenes* eine ausreichende CPE-Menge produziert und in das Außenmedium sezerniert wird. Durch die entsprechende Optimierung der Expression in der Zelle und der Etablierung des Proteinexports soll letztlich eine Interaktion mit den Tumorzell-Rezeptoren gewährleistet werden, um einen entsprechenden Therapieansatz zu ermöglichen.

3.2. Bisher durchgeführte Experimente (König, 2008)

In vorangegangenen Untersuchungen (Box, 2006) zeigte sich, dass die Verwendung des Fusionsproteins, bestehend aus dem Signalpeptid der α-Amylase AmyP aus *C. acetobutylicum* und dem CPE, eine toxische Wirkung auf den Zwischenwirt *E. coli*

ausübte. Daher bestand ein Versuchsansatz darin, über eine computergestützte *in silico*-Suche bessere clostridielle Signalsequenzen zu identifizieren, die sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien ohne Nebeneffekte exprimiert und prozessiert werden können. Die zehn vielversprechendsten Signalsequenzen wurden mit dem Gen für die Crotonase, welches eine ähnliche molekulare Masse wie das CPE aufweist, fusioniert. Dieses Enzym wurde ausgewählt, um toxische Effekte des CPE auf den Zwischenwirt ausschließen zu können.
Die verschiedenen Plasmidkonstrukte (pET29_sp_crt) führten unter Verwendung des T7-Systems in Wachstumsversuchen mit *E. coli* BL21 (DE3) zu einem unterschiedlichen Wachstumsverhalten. Die Expression des mit den unterschiedlichen Signalsequenzen fusionierten *crt*-Gens erfolgte durch die Zugabe des Induktors IPTG und sorgte schließlich für eine erhebliche Wachstumseinbuße.

3.3. Systemübertragung auf *C. acetobutylicum*

3.3.1. Das Tet-System

Um letale Effekte auf den Zwischenwirt *E. coli* durch die Überproduktion der verschiedenen Signalpeptid-Crotonase-Fusionen zu vermeiden, ist es erforderlich, ein Expressions-System zu wählen, welches im Zwischenwirt nicht exprimiert wird, dagegen im Zielorganismus *C. acetobutylicum* angeschaltet vorliegen soll.
Durch die Verwendung des so genannten Tet-Systems ist die Konstruktion eines solchen Expressionssystems möglich. Dieses System kommt häufig bei der Regulation der Genexpression zur Anwendung und ist in *E. coli* strikt reguliert (Kamionka *et al*., 2004). Der verwendete Repressor TetR und die zugehörigen Operatorsequenzen *tetO1* und *tetO2* sind gut erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass ein *E. coli*-Stamm, der den entsprechenden Repressor TetR produziert, in der Lage ist, die Promoteraktivität um das 300-fache zu reprimieren. Dabei bindet TetR als Dimer an die zwei *tet*-Operatorsequenzen und verhindert so die Transkription des nachfolgenden Gens. Eine Induktion der Genexpression ist durch die Zugabe des Induktors Tetracyclin möglich. Die Bindung des Tetracyclins an TetR führt zu einer

Konformationsänderung des TetR, welche den Verlust der Operatorbindefähigkeit zur Folge hat.

Für die Anwendung eines solchen Tet-Expressionssystems ist die Konstruktion zweier Plasmide (siehe Abbildung 5) erforderlich. Hierbei trägt das eine Plasmid unter anderem die Sequenz der zwei *tet*-Operatoren und die Information der jeweiligen Fusionsproteine. Das andere Plasmid enthält die Sequenz des Repressors TetR. Im Gegensatz zum vorher genannten Plasmid ist hier nur der Replikationsursprung für den Gram-negativen *E. coli* notwendig, jedoch keiner für das Gram-positiven *C. acetobutylicum*, da in diesem keine Repression des Fusionsproteins erwünscht ist.

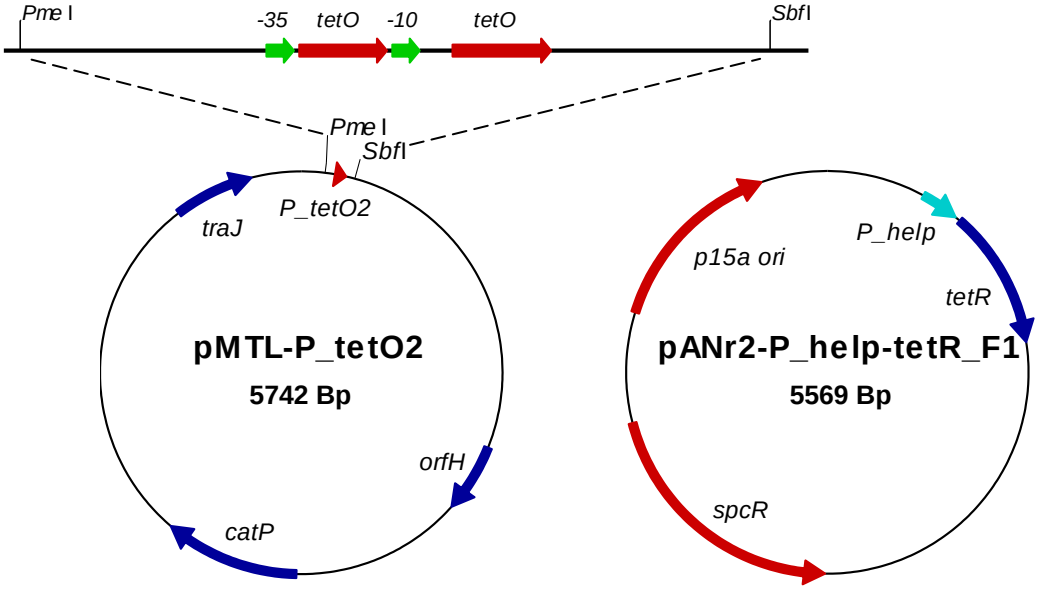

Abbildung 5: Plasmidkarten von pMTL_PtetO2 und dem Repressorplasmid pANr2-P_help-tetR_F1

3.3.1.1. Konstruktion der verschiedenen Expressionsplasmide

Für die Konstruktion dieser Plasmide bestand die Strategie zunächst darin, die jeweilige Sequenz der Fusionsproteine aus pET29_sp_crt zu amplifizieren und in den Vektor pMTL-P_tetO2 (Meisohle, 2010), welcher bereits die Sequenz der *tet*-Operatoren trägt, einzubringen. Die verwendeten Signalsequenzen, welche in der Plasmidbezeichnung pET29_sp_crt allgemein mit sp abgekürzt werden, sind in Tabelle 29 zusammengestellt.

Tabelle 29: Verwendete Signalsequenzen

Stamm	Signalsequenz
Clostridium acetobutylicum	amyP' (Gen für α-Amylase), CA_0098
	orf5' (Gen für Glycosylase/Deglycosylase)
	chi' (Gen für ein „chitinase family"-Protein), CA_C1556
	pec' (Gen für Pectat-Lyase), CA_C3387
Clostridium perfringens	plc' (Gen für Phospholipase C), CPF_0042
	3D' (Gen für ein „3D domain"-Protein), CPF_1437
Clostridium sporogenes	colA' (Gen für Collagenase)

Um das jeweilige Fusionsfragment in pMTL-P_tetO2 klonieren zu können, wurde bei der Amplifikation mit Hilfe von Oligodesoxynukleotiden an das 3'-Ende der Crotonasesequenz mit His_6-Tag eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sbf*I angehängt. An das 5'-Ende der Sequenz der jeweiligen Signalpeptide wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Sgf*I angefügt. Über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen auf dem pMTL-P_tetO2-Plasmid wurden die jeweiligen Fragmente eingebracht. Anschließend wurden die konstruierten Plasmide in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF', welcher bereits das Repressorplasmid pANr2-P_help-tetR_F1 (Meisohle, 2010) trägt, transformiert. Das *tetR*-Gen mit einer optimierten RBS steht hierbei unter der Kontrolle des starken konstitutiven Promoters P_help (siehe Abb. 5). Mit Ausnahme des Fusionsfragments aus pET29_chi_crt konnten alle Fragmente erfolgreich amplifiziert und nach Sequenzierung mutationsfrei in den Vektor pMTL-P_tetO2 kloniert werden. Dadurch konnten die im Folgenden aufgeführten Plasmidkonstrukte erstellt und in den Klonierungsstamm *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANr2-P_help-tetR_F1) transformiert werden:

- pMTL-P_tetO2-amyP'_crt (pANr2-P_help-tetR_F1)
- pMTL-P_tetO2-orf5'_crt (pANr2-P_help-tetR_F1)
- pMTL-P_tetO2-pec'_crt (pANr2-P_help-tetR_F1)
- pMTL-P_tetO2-plc'_crt (pANr2-P_help-tetR_F1)
- pMTL-P_tetO2-3D'_crt (pANr2-P_help-tetR_F1)
- pMTL-P_tetO2-colA'_crt (pANr2-P_help-tetR_F1)

In Abbildung 6 ist das Expressionsplasmid pMTL-P_tetO2-pec'_crt beispielhaft dargestellt.

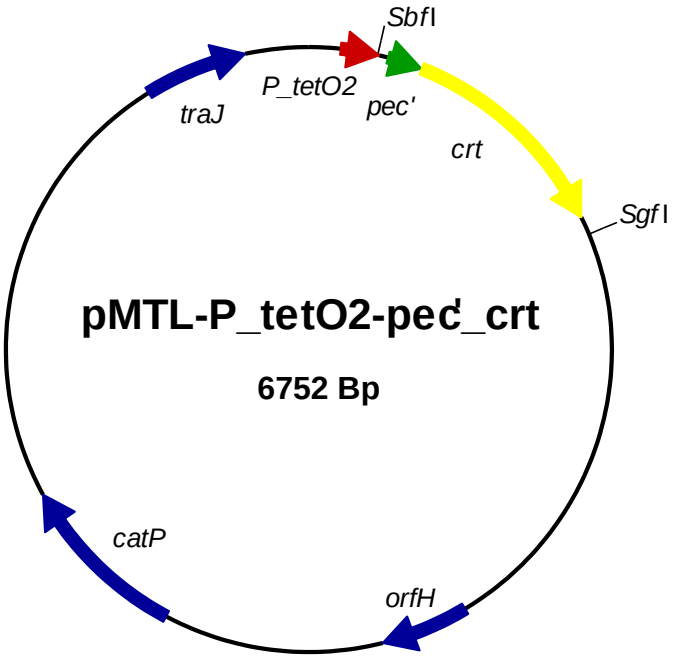

Abbildung 6: Plasmidkarte des Expressionsplasmids pMTL- P_tetO2-pec'_crt

3.3.1.2. Überprüfung der Funktionalität des Tet-Systems

Um die Funktionalität des Tet-Systems zu überprüfen, wurden Wachstumsversuche mit den oben genannten Plasmidkonstrukten in *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANr2-P_help-tetR_F1) durchgeführt. Die Genexpression wurde durch Zugabe von Tetracyclin (Endkonzentration 20 µg/ml) bei einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6 induziert. Der Wachstumsverlauf ist in Abbildung 7 gezeigt.

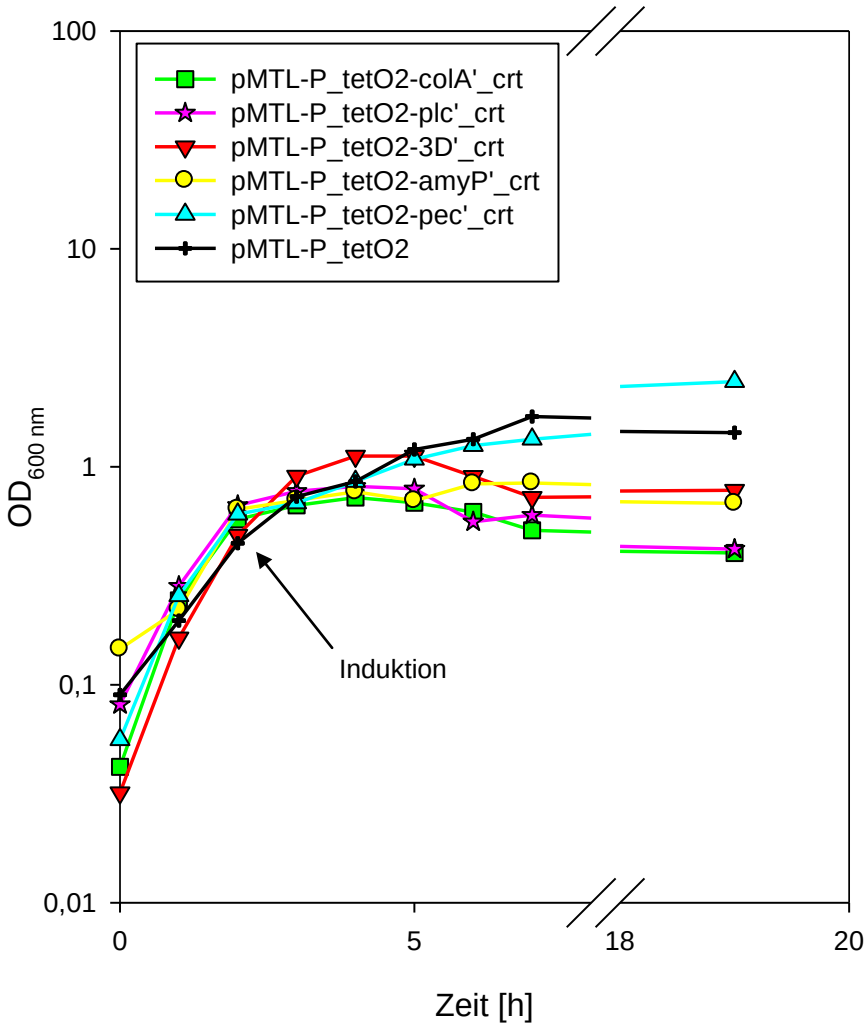

Abbildung 7: Wachstum von *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANr2-P_help-tetR_F1) mit den verschiedenen pMTL-P_tetO2-sp_crt-Konstrukten. Die Induktion erfolgte mit Tetracyclin (Endkonzentration im Medium 20 µg/ml) bei einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6.

Das Wachstumsverhalten zeigte in diesem Experiment einen ähnlichen Verlauf verglichen mit dem Wachstumsversuch mit den Plasmidkonstrukten pET29_sp_crt in *E. coli* BL21 (DE3) (König, 2008). Erneut konnte für den *E. coli*-Stamm, der das Plasmid pMTL-P_tetO2-pec'_crt trägt, gemessen an der Kontrolle (Vektor ohne Insert), ein ebenso gutes bzw. besseres Wachstum beobachtet werden. Allgemein wiesen die diversen Plasmidkonstrukte unterschiedliche Verträglichkeiten nach Zugabe des Induktors Tetracyclin auf.

3.3.1.3. Detektion der Crotonase mittels Western-Blot-Analyse und Immunfärbung

Nach dem Wachstumsversuch wurde überprüft, ob auf Grund der Induktion eine Überproduktion der Crotonase stattgefunden hat und ob die Fusionsproteine auch sezerniert wurden.

In einem Vorversuch wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung Proben aus dem Kulturüberstand, sowohl vor als auch nach der Induktion, analysiert. Es konnte jedoch kein deutlicher Unterschied im Bandenmuster ausgemacht werden.

Schließlich wurden in einem erneuten Wachstumsversuch zur Detektion der Crotonase Proben aus dem Kulturüberstand (4 h nach Induktion) sowie von der Cytoplasma- und Zellmembranfraktion verwendet. Auch hier war es nicht möglich, über das Vorhandensein der Crotonase nach einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung eine eindeutige Aussage zu machen (siehe Abb.8).

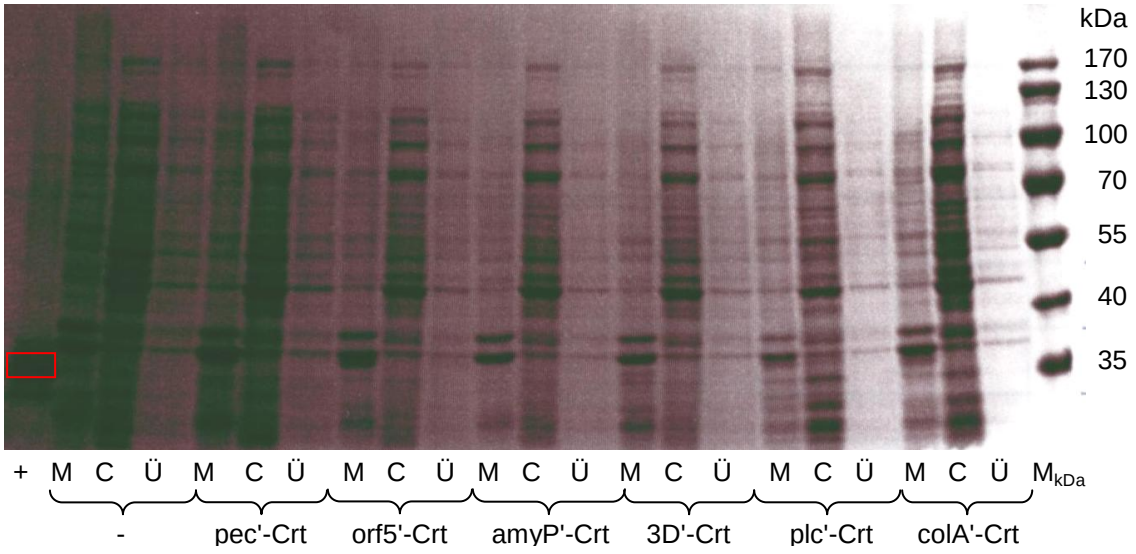

Abbildung 8: SDS-PAGE-Gelbild nach Coomassie-Färbung mit verschiedenen Fraktionen aus *E. coli* pMTL-P_tetO2-sp_crt
+: Positivkontrolle (AdcS1; rot markiert)
M: Membranfraktion
C: Cytoplasmafraktion
Ü: Überstand
M_{kDa}: Marker („Prestained Protein Ladder“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
- : Negativkontrolle (Plasmid enthält keine genetische Information für ein Fusionsprotein)

Der Abbildung 8 ist zu entnehmen, dass für jeden *E. coli*-Klon, in allen untersuchten Fraktionen, Proteine detektiert werden konnten. Auf Grund der zahlreichen Proteine war es nicht möglich, eine für die Crotonase spezifische Bande zu detektieren. Deshalb wurden parallel dazu die Proben in einer zusätzlichen SDS-PAGE getrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und das Fusionsprotein mit Anti-His_6-Antikörpern detektiert. Als Positivkontrolle diente das mit einem His_6-Tag versehene AdcS1. In der folgenden Abbildung 9 ist das Resultat nach der Immunfärbung zu sehen.

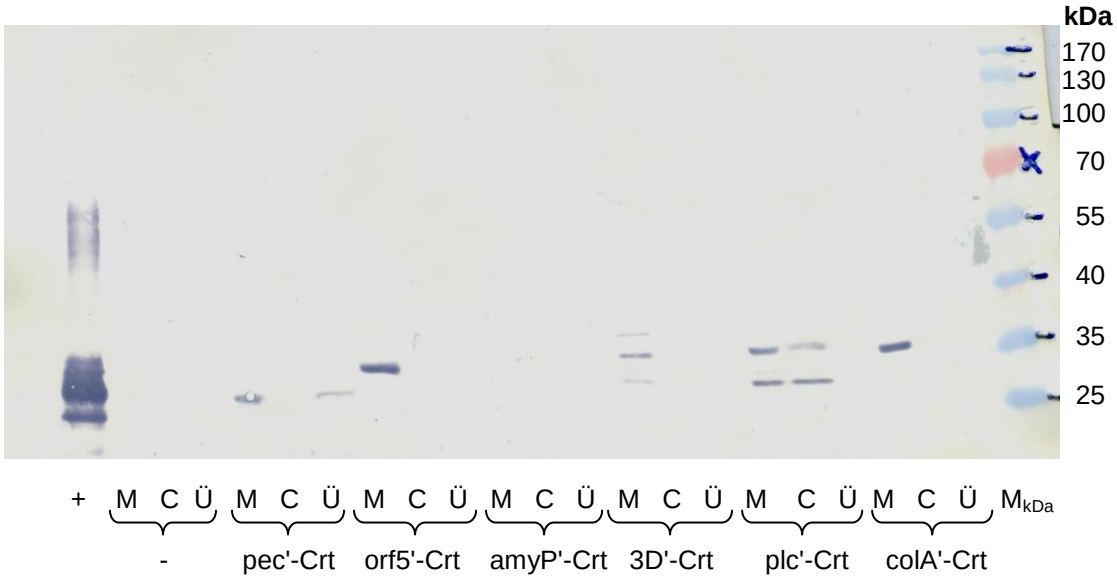

Abbildung 9: Western-Blot zur Detektion der verschiedenen SP-Crt-Fusionen aus *E. coli* XL1-Blue MRF' pMTL-P_tetO2-pec'-crt (pANr2-P_help-tetR_F1).
+: Positivkontrolle (AdcS1-His_6)
M: Membranfraktion
C: Cytoplasmafraktion
Ü: Überstand
M_{kDa}: Marker („Prestained Protein Ladder", Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
- : Negativkontrolle (Plasmid enthält keine genetische Information für ein Fusionsprotein)

Aus der Abbildung 9 geht hervor, dass mit Ausnahme des Konstruktes pMTL-P_tetO2-amyP'-crt und der Negativkontrolle die Crotonase in den Zellmembranfraktionen aller *E. coli*-Stämme detektiert werden konnte. Bei einigen *E. coli*-Stämmen war die Crotonase auch in der Cytoplasmafraktion nachweisbar. So wurden bei den Proben des Stammes *E. coli* pMTL-P_tetO2-plc'-crt zwei Banden detektiert. Bei der ca. 35-kDa-Bande könnte es sich um das Fusionsprotein handeln, wohingegen die Bande bei ca. 29 kDa dafür steht, dass das Signalpeptid abgespalten wurde. Eine entsprechende Bande konnte auch für die Probe aus dem Kulturüberstand des *E. coli* pMTL-P_tetO2-pec'_crt-Stamms detektiert werden. So waren zwar einige Stämme in der Lage, das

Fusionsprotein zumindest teilweise auszuschleusen, allerdings führte die Anreicherung des Fusionsproteins in der Zellmembran letztendlich zur Schädigung des Zwischenwirtes. Durch diesen Wachstumsversuch konnte jedoch die Funktionalität des Tet-Systems bestätigt werden, da es nach Induktion zur Produktion des jeweiligen Fusionsproteins kam.

3.3.2.Transformation in *C. acetobutylicum*

Für die Transformation der jeweils sechs verschiedenen Plasmidkonstrukte (pMTL-P_tetO2-sp_crt) in *C. acetobutylicum* ist es vorab notwendig, diese *in vivo* zu methylieren. Durch die Methylierung wird die Plasmid-DNA aus *E. coli* vor einem Restriktionsabbau in *C. acetobutylicum* geschützt (Mermelstein *et al*., 1993). Da der pANS1-Vektor, welcher das Gen der Φ3T I-Methyltransferase trägt, nicht kompatibel mit den beiden Tet-System-Plasmiden (pMTL-P_tetO2-sp_crt und pANr2-P_help-tetR_F1) ist, sollte das Φ3T I-Methyltransferase-Gen zusätzlich in den Vektor pANr2-P_help-tetR_F1 kloniert werden.

3.3.2.1. Klonierung des Φ3T I-Methyltransferase-Gen in den pANr2-P_help-tetR_F1-Vektor

Das Gen der Φ3T I-Methyltransferase mit der Promoterregion sollte über die *Sgf*I-Schnittstelle in den pANr2-P_help-tetR_F1-Vektor eingefügt werden. Dazu wurde das Gen zunächst mittels PCR amplifiziert und über geeignete Oligodesoxynukleotide mit den Schnittstellen für das Restriktionsenzym versehen.
Die Transformation der entsprechenden Ligationen erfolgte dabei zunächst in kaltkompetente *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen. Allerdings konnte nach diversen Versuchsansätzen kein positiver Klon identifiziert werden. So wurde vorerst der Versuch unternommen, die Transformationen mit elektrokompetenten *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen durchzuführen. Auch hier blieben die Transformationen erfolglos. Nun wurden für die Transformationen sowohl kalt- als auch elektrokompetente *E. coli* SURE-Zellen eingesetzt. Ein positives Resultat konnte hierbei ebenfalls nicht erzielt werden.

Nachdem auch die Verwendung einer anderen Schnittstelle (*Bgl*II) keinen Erfolg brachte, bestand ein weiterer Versuchsansatz darin, das Gen der Φ3T I-Methyltransferase über zwei verschiedene Schnittstellen (*Bsp*TI und *Sgf*I) in den Vektor einzubringen. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Vektors reduziert. Jedoch blieben auch diese Bemühungen ohne Erfolg und ein anderer Versuchsansatz wurde angestrebt.

3.3.2.2 „Type-One™ Restriction Inhibitor“

Dieser Versuchsansatz zielte darauf ab, die Verwendung der Φ3T I-Methyltransferase zu umgehen. Durch den Einsatz des so genannten „Type-One™ Restriction Inhibitors“ soll eine direkte Transformation der verschiedenen Plasmidkonstrukte (pMTL-P_tetO2-sp_crt) in *C. acetobutylicum* gewährleistet werden. Dieser Inhibitor unterbindet die Restriktion unmodifizierter DNA, indem er die DNA-Bindestellen von Typ I R-M-Enzymen blockiert. Allerdings blieben die Transformationen auch nach Einsetzen unterschiedlicher Plasmid- und „Type-One™ Restriction Inhibitors“-Konzentrationen ohne Erfolg.

3.3.2.3. Klonierung der P_help-tetR-Sequenz in der pANS1-Vektor

Nachdem es nicht möglich war, den Einsatz der Φ3T I-Methyltransferase zu umgehen bzw. das Gen in den Vektor pANr2-P_help-tetR_F1 zu klonieren, wurde nun der Versuch unternommen, den Klonierungsschritt umzukehren. Dazu wurde das Gen des TetR-Repressors zusammen mit dem Promoter P_*help* aus dem Vektor pANr2-P_help-tetR_F1 amplifiziert, um das Fragment anschließend über die Schnittstellen *Nru*I und *Bgl*II in den pANS1-Vektor, welcher die Sequenz für die Φ3T I-Methyltransferase trägt, einzubringen. Dennoch war auch bei diesem Versuch kein positiver Klon nachweisbar.

3.3.2.4. pDrive-Klonierungsvektor als Zwischenschritt

Um ein ineffizientes Schneiden der Restriktionsenzyme bei den PCR-Produkten auszuschließen, wurden sowohl das Gen der Φ3T I-Methyltransferase als auch das Gen des P_help-TetR-Repressors in den pDrive-Klonierungsvektor zwischenkloniert.
Ein paralleler Versuchsansatz dazu bestand darin, das Gen der β-Lactamase zusammen mit dem Gen der Φ3T I-Methyltransferase bzw. dem Gen des P_help-TetR-Repressors aus dem pDrive-Klonierungsvektor zu amplifizieren. Das resultierende PCR-Fragment würde dann entsprechend in den Vektor pANr2-P_help-tetR_F1 bzw. in den pANS1-Vektor ligiert werden. Durch die gleichzeitige Klonierung des β-Lactamase-Gens und der damit vermittelten Ampicillin-Resistenz kann ein höherer Selektionsdruck aufgebaut werden, was letztendlich eine leichtere Identifikation positiver Klone ermöglicht.
Dabei zeigte sich, dass die Klonierung des Φ3T I-Methyltransferase-Gens auch bei der Verwendung eines anderen Vektors, wie in diesem Fall des Klonierungsvektors pDrive, zu keinen positiven Klonen führte. Durch die hohe Kopienzahl des pDrive-Klonierungsvektors wird die potentiell toxische Wirkung der Φ3T I-Methyltransferase noch verstärkt.
Es gelang dagegen, ein entsprechendes PCR-Fragment bestehend aus der Sequenz des P_help-TetR-Repressors zusammen mit dem Gen der β-Lactamase zu amplifizieren. Alle weiteren Klonierungsschritte blieben jedoch erfolglos.

Schließlich gelang es doch, die Sequenz des P_help-TetR-Repressors (ohne das β-Lactamase-Gen) aus dem pDrive-Klonierungsvektor durch einen Restriktionsverdau mit *Bgl*II auszuschneiden und über die entsprechende Schnittstelle in den Vektor pANS1 zu ligieren. Eine Sequenzierung konnte bestätigen, dass das Gen in diesem Vektor nun mutationsfrei vorlag. Das konstruierte Plasmid wurde pANS1-P_help-tetR genannt (Abbildung 10).

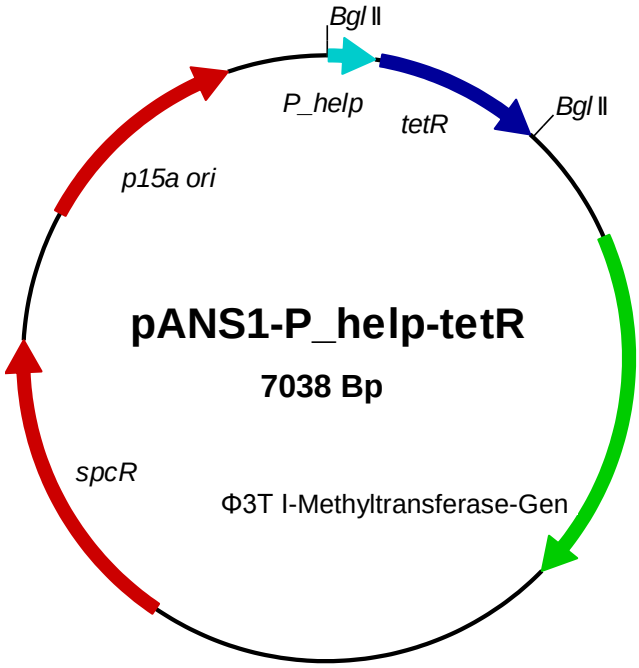

Abbildung 10: Plasmidkarte des Methylierungs-/ Repressorplasmids pANS1-P_help-tetR

Die bis dato durchgeführten Versuchsansätze sind in Tabelle 30 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 30: Übersicht der diversen Versuchsansätze

Versuchsansatz	Klonierungsstrategie
Einbringen des Φ3T I-Methyltransferase-Gens in pANr2-P_help-tetR_F1	über *Sgf*I-Schnittstelle in *E. coli* XL1-Blue MRF' kaltkompetente Zellen elektrokompetente Zellen in *E. coli* SURE kaltkompetente Zellen elektrokompetente Zellen über *Bgl*II-Schnittstelle über *Bsp*TI- und *Sgf*I-Schnittstellen
Umgehen der Φ3T I-Methyltransferase	„Type One™ Restriction Inhibitor“

Klonierungsschritt umkehren: Einbringen von P_help-tetR in pANS1	*Nru*I und *Bgl*II-Schnittstellen
Zwischenklonierung in den Vektor pDrive	Φ3T I-Methyltransferase-Sequenz P_help-tetR-Sequenz zusätzlich mit β-Lactamase

3.3.2.5. Transformation der verschiedenen pMTL-P_tetO2-sp_crt-Plasmidkonstrukte in *E. coli* XL1-Blue MRF' pANS1-P_help-tetR

Das konstruierte Plasmid pANS1-P_help-tetR wurde in *E. coli* XL1-Blue MRF' etabliert. Bevor in diesen Stamm nun die verschiedenen zu methylierenden pMTL-P_tetO2-sp-crt-Plasmidkonstrukte transformiert werden können, muss deren Plasmidpräparation zunächst von dem Vektor pANr2-P_help-tetR_F1 befreit werden. Dieser Vektor war notwendig, damit es nicht zur Überproduktion der Fusionsproteine kommt. Durch einen Restriktionsverdau mit ausgewählten Restriktionsenzymen (*Bgl*II und *Sal*I), die nur in diesem Vektor entsprechende Erkennungssequenzen für die Schnittstellen aufwiesen, konnte dieser Vektor aus der Plasmidpräparation entfernt werden. Die anschließende Transformation der pMTL-P_tetO2-sp-crt-Plasmidkonstrukte in *E. coli* XL1-Blue MRF' pANS1-P_help-tetR erwies sich als erfolgreich.

3.3.2.6. Transformation der pMTL-P_tetO2-sp-crt-Plasmidkonstrukte in *C. acetobutylicum*

Auch nach mehreren Wiederholungen der Transformation konnte kein erfolgreich elektroporierter *C. acetobutylicum*-Klon detektiert werden. Lediglich die Transformation des Kontrollplasmids pMTL007 führte zur Koloniebildung, was dafür sprach, dass die Transformation *per se* funktionierte. Von einem funktionsfähigen Tet-System ausgehend, könnte das gebildete Fusionsprotein diese enorm hemmende Wirkung ausüben. Da keine Literatur zur Überproduktion der Crotonase in *C. acetobutylicum* existiert, besteht die Möglichkeit, dass eine Überproduktion letal wirkt. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde das Gen der Crotonase *crt* durch das Gen des Enterotoxins von *C. perfringens cpe* bzw. die verkürzte Form *cpeT* substituiert. Es

gelang zunächst, nach Transformation in *C. acetobutylicum* für die Fusion ColA' mit CPE zwei Klone (*C. acetobutylicum* pMTL-P_tetO2-colA'_cpe) zu identifizieren. Einer davon konnte nach Präparation der Gesamt-DNA und einer Kontroll-PCR (siehe Abb. 11) auf die Fusionssequenz als positiv bestätigt werden.

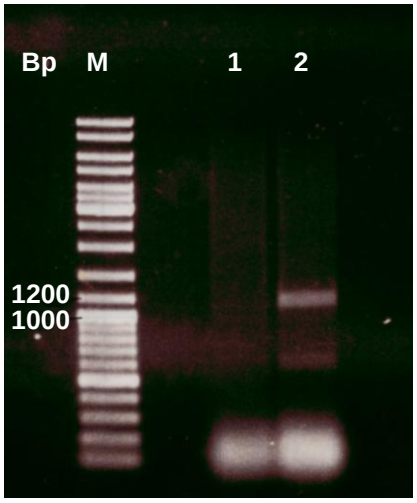

Abbildung 11: Kontroll-PCR auf die Fusionssequenz von *colA'-cpe*
M: Marker („GeneRuler™ DNA Ladder Mix", Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
1: Klon 1 (*C. acetobutylicum* pMTL-P_tetO2-colA'_cpe)
2: Klon 2 (*C. acetobutylicum* pMTL-P_tetO2-colA'_cpe)

Aus obiger Abbildung kann entnommen werden, dass zumindest für Klon 2 das zu erwartende PCR-Fragment mit einer Größe 1077 Bp amplifiziert werden konnte.
Mit diesem Klon folgten Wachstumsversuche, bei denen mittels Western-Blot-Analyse und anschließender Immunfärbung mit Anti-CPE-Antikörper überprüft wurde, ob das gebildete CPE im Kulturüberstand detektierbar ist. Allerdings konnte das Toxin nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren war es nicht möglich, den Klon erneut anzuziehen und auch die Kontroll-PCR war nicht reproduzierbar.

3.3.2.7. Überprüfung des Tet-Systems in *C. acetobutylicum* und Entwicklung einer Positivkontrolle für die Sekretion

Da nicht ersichtlich war, ob das Tet-System in *C. acetobutylicum* funktionell ist und um gleichzeitig zu überprüfen, ob der Ausschleusvorgang eine mögliche Ursache für das Ausbleiben von Kolonien nach der Transformation war, sollte nun lediglich die Crotonase ohne Fusion mit einem Signalpeptid überproduziert werden. Um das

entsprechende Plasmid pMTL-P_tetO2-crt zu konstruieren, war es notwendig, bei der Klonierung über einen Zwischenschritt in den Klonierungsvektor pDrive zu gehen, da ein direktes Ligieren des *crt*-Gens nicht möglich war.

Parallel dazu sollte für den Ausschleusvorgang eine Positivkontrolle entwickelt werden. Für diesen Versuch wurde die Chitinase ausgewählt, deren Signalsequenz (*chi'*) bereits verwendet wurde. Hierfür wurde die Sequenz analog der Crotonasesequenz in das Plasmid pMTL-P_tetO2 kloniert.

Aber auch bei diesen beiden Plasmidkonstrukten war die Transformation nicht erfolgreich.

Durch die Transformation des Plasmids ohne Insert (pMTL-P_tetO2) sollte geklärt werden, ob eine Überproduktion eine mögliche Ursache darstellt. Jedoch wuchsen auch hier keine Kolonien. Da aber die Transformation mit dem Kontrollvektor pMTL007 stets erfolgreich war, wurde das Φ3T I-Methyltransferase-Gen im pANS1-P_help-tetR_F1-Plasmid auf eine potentielle Mutation hin untersucht. Die Sequenzierung konnte keine korrekte Sequenz dieses Gens bestätigen.

Ursprünglich wurde das Repressorgen über die *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Diese Schnittstelle wurde unter anderem deswegen ausgewählt, da eine direkte Klonierung nicht möglich war. Daher wurde der Klonierungsvektor pDrive als Zwischenschritt verwendet, da dieser die erwähnte Restriktionsschnittstelle nicht besitzt. Das Φ3T I-Methyltransferase-Gen hat eine Größe von 1332 Bp; es wurde jedoch bei der Konstruktion des Methylierungsvektors die komplette *Bacillus* Phagensequenz von 2360 Bp kloniert (siehe auch Abb. 12). In einem Bereich davon ist die *Bgl*II-Schnittstelle lokalisiert. In der Literatur ist nichts über die Notwendigkeit der gesamten Sequenz bekannt. Um aber eine Funktionseinbuße der Φ3T I-Methyltransferase auszuschließen, wurde eine neue Restriktionsschnittstelle außerhalb des kritischen Bereichs gewählt, und eine Insertion der Repressorsequenz erfolgte nun über *Sph*I. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR (2.6.9.4.) konnte die Insertion an Hand der richtigen Bandengröße bestätigt werden. Dagegen wurde für die Φ3T I-Methyltransferase eine ca. 300 Bp größere Bande ermittelt. Zusätzlich zeigten sich weitere Unstimmigkeiten mit der Sequenz dieses Methylierungsvektors, weswegen eine Sequenzierung des gesamten Methylierungsvektors pANS1 vorgenommen wurde.

3.3.2.8. Sequenzierung des pANS1-Methylierungsvektors

Die Sequenzierung des pANS1-Vektors führte zu dem Ergebnis, dass die bis dato vorliegende Sequenz nicht korrekt war. Dabei zeigte sich zum einen, dass der unbekannte Bereich um ~60 Bp größer ist und zum anderen, dass ~300 Bp zwischen der Spectinomycin-Resistenzkassette und dem p15a ori nicht vorhanden sind. Der pANS1-Vektor weist damit eine Größe von 5852 Bp auf (siehe Abb. 12).
Unabhängig davon führte der Einbau der Repressorsequenz unter der Kontrolle des Promoters P_*help* dennoch zu einer Veränderung im Gen der Φ3T I-Methyltransferase.

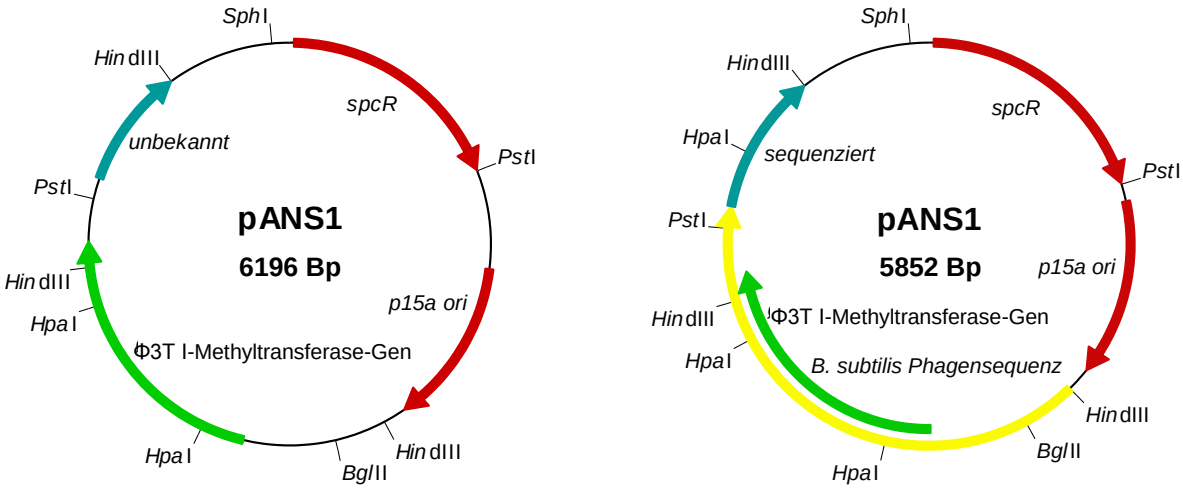

Abbildung 12: Plasmidkarten des Methylierungsvektors pANS1.
Links: Unvollständige Sequenz. Rechts: Vollständig überarbeitete Sequenz.

3.3.2.9. Überprüfung des Tet-Sytems basierend auf einem Vektor (pMTL-P_tetO2-sp_crt) in *C. acetobutylicum*

Da die Funktionalität des Tet-Systems in *C. acetobutylicum* bisher noch nicht bestätigt werden konnte, sollte dies durch die Klonierung des Respressorgens TetR zusammen mit dem Promoter P_*help* in die verschiedenen pMTL-P_tetO2-sp_crt-Plasmide überprüft werden. Für die Expression der Fusionsgene ist nun eine Induktion notwendig. Während der erforderlichen Klonierungsarbeiten zeigten Kontrollverdaue jedoch eine ähnliche Problematik, wie zuvor für das Methylierungsplasmid pANS1 geschildert. Dabei war es zwar wieder möglich, die Repressorsequenz mit Promoter in

das Plasmid zu ligieren, aber das Bandenmuster nach einem Kontrollverdau bzw. einer Kontroll-PCR wich sehr stark von dem Erwarteten ab. Bei dem Promoter P_*help* handelt es sich um einen sehr starken, konstitutiv aktiven Promoter (Riedel *et al*., 2007), der zwar eine starke *tetR*-Expression gewährleistet, aber zu Veränderungen in anderen Genbereichen, wie bei dem der Φ3T I-Methyltransferase, führt.

3.4. Verwendung des „ClosTron™ Gene Knockout Systems“ zur Inaktivierung von CAC1502 in *C. acetobutylicum*

Durch Verwendung des „ClosTron™ Gene Knockout Systems“ bestand die Möglichkeit, die Problematik der Plasmidmethylierung zu umgehen. Der Methylierungsschritt ist aufgrund der in *C. acetobutylicum* vorhandenen Typ II-Restriktionsendonuklease Cac824I (Mermelstein *et al*., 1993) notwendig, da diese Fremd-DNA bei Transformation in *C. acetobutylicum* abbaut. Das Gen CAC1502 kodiert putativ für die Typ II-Restriktionsendonuklease Cac824I (Dong *et al*., 2010). Ein Ausschalten dieses Gens sollte in dem resultierenden Stamm zu einem Verlust der Aktivität dieses Enzyms führen. Für die Konstruktion einer solchen Mutante wurde das „ClosTron™ Gene Knockout System“ verwendet. Dieses System stellt eine speziell für Clostridien angepasste Methode zur gezielten Geninaktivierung dar und basiert auf einer Insertion eines Gruppe-II-Introns (Heap *et al*., 2007).

Ein Algorithmus identifiziert mögliche Intron-Insertionsstellen in der DNA-Sequenz, basierend auf der Konsensussequenz, welche von dem so genannten LtrA-Protein erkannt wird. Eine SOE-PCR wird verwendet, um die Region des L1.ltrB-Introns, welches für die Zielspezifität verantwortlich ist, zu mutieren. Das dabei entstehende PCR-Produkt beinhaltet den Zielbereich eines Introns, welches in das Wunschgen integriert, und weist eine Größe von ~350 Bp auf.

Für die Inaktivierung des CAC1502-Gens wurden mittels des Algorithmus' mögliche Intron-Insertionsstellen identifiziert und davon zwei ausgewählt. Diese befinden sich im Gen an Position 333/334a (a steht für Integration des Introns in „antisense“-Richtung) und an Position 365/366s (s steht für Integration des Introns in „sense“-Richtung). Durch eine SOE-PCR mit den entsprechenden Oligodesoxynukleotiden IBS, EBS2 und EBS1d (Tab. 7), welche analog wie in 2.10.1. beschrieben durchgeführt wurde,

konnte das jeweilige ~350-Bp-Fragment amplifiziert werden. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *Hin*dIII und *Bsr*GI geschnitten, um sie anschließend in den Vektor pMTL007 bzw. pMTL007c-E2 zu ligieren. Diese wurden zuvor ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert, um kompatible Enden zu generieren. Nach erfolgreicher Ligation und Transformation der vier unterschiedlichen Plasmide in *E. coli* XL1-Blue MRF' konnten diese schließlich mittels Sequenzierung als positiv bestätigt werden. Des Weiteren konnte nach anschließender Transformation der Plasmide in *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANS1) ihre Methylierung, mit Hilfe eines *Sat*I-Kontrollverdaus, nachgewiesen werden. Die entstandenen Plasmidkonstrukte sind im Folgenden aufgeführt:

- pMTL007-333/334a (pANS1)
- pMTL007-365/366s (pANS1)
- pMTL007c-E2-333/334a (pANS1)
- pMTL007c-E2-365/366s (pANS1)

Auch nach einigen Transformationsversuchen in *C. acetobutylicum* gelang es nicht, positive Klone, die das Plasmidkonstrukt pMTL007c-E2-333/334a oder pMTL007c-E2-365/366s enthalten sollten, zu identifizieren.

Bei den anderen beiden Konstrukten konnten, nach erfolgreicher Transformation, einzelne Kolonien gepickt und die Induktion der Integration (siehe 2.10.5) durchgeführt werden. Um die resultierenden Klone auf erfolgreiche Integration zu überprüfen, wurden diese gepickt und in 1,4 statt in 5 ml CGM (mit 2,5 µg/ml Clarithromycin) inokuliert. Das Animpfen in einem kleineren Volumen stellte sich, bezogen auf die Anwuchsquote, als sehr effizient heraus. Hierbei wuchsen für das Konstrukt pMTL007-365/366s von neun angeimpften Klonen sieben wieder an. Nach Präparation der chromosomalen DNA und anschließender Kontroll-PCR (siehe Abb. 13) konnte die gewünschte Integration bei diesen Klonen bestätigt werden.

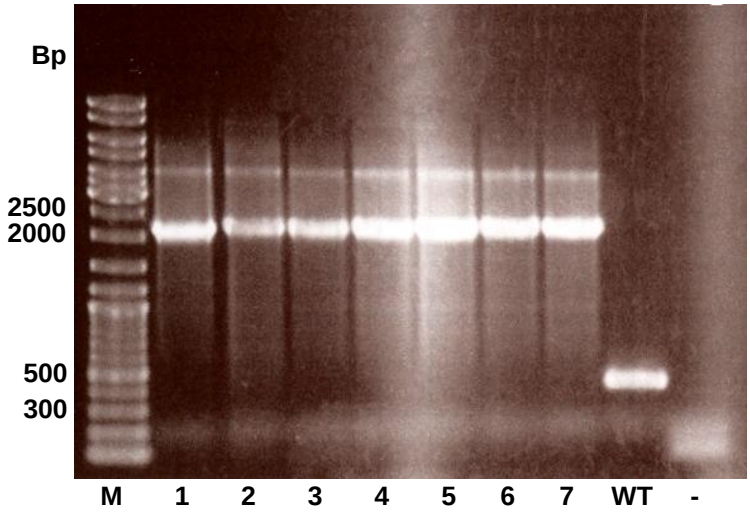

Abbildung 13: Gelbild zur Kontroll-PCR auf positive Integration des Gruppe-II-Introns in das Zielgen CAC1502
M: Marker („GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
1-7: Überprüfte Klone auf potentielle Integration
WT: Wildtyp-Probe (Negativkontrolle für die Integration)
- : Negativkontrolle (PCR)

Durch die Verwendung des Oligodesoxynukleotid-Paares CAC1502-Kontrolle-for/CAC1502-Kontrolle-rev (Tabelle 7) ist bei erfolgreicher Integration ein Amplifikat von 2194 Bp zu erwarten, welches in Abbildung 13 oberhalb der 2000-Bp-Markerbande zu erkennen ist. Dementsprechend ist für die Negativkontrolle der Integration beim Wildtyp, bei der durch die PCR ein 392-Bp-Fragment amplifiziert wurde, eine Bande unterhalb der 400-Bp-Markerbande zu sehen (Abbildung 13).

Die Integration des Gruppe-II-Introns in das Zielgen CAC1502 war somit für die Insertionsstelle 365/366 erfolgreich. Die daraus resultierende Mutante wurde *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 genannt.

3.4.1. Transformation von pMTL-P_tetO2-sp_crt pANr2-P_help-tetR_F1 in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2

Es wurden die folgend aufgeführten Plasmidkonstrukte in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 transformiert:

- pMTL-P_tetO2-colA'_crt (pANr2-P_help-tetR-F1)
- pMTL- P_tetO2-plc′_crt (pANr2-P_help-tetR-F1)
- pMTL- P_tetO2-3D′_crt (pANr2-P_help-tetR-F1)
- pMTL- P_tetO2-amyP′_crt (pANr2-P_help-tetR-F1)
- pMTL- P_tetO2-orf5′_crt (pANr2-P_help-tetR-F1)
- pMTL- P_tetO2-pec′_crt (pANr2-P_help-tetR-F1)
- pMTL- P_tetO2 (pANr2-P_help-tetR-F1)

Dabei erwies sich die Transformation als sehr erfolgreich. Bei allen Transformationsansätzen kam es zur Ausbildung eines dichten Bakterienrasens, so dass für die Bildung von Einzelkolonien zunächst ein Drei-Strich-Ausstrich durchgeführt wurde. Daraufhin konnten einzelne Kolonien gepickt und schließlich mit Hilfe einer PCR auf Vorhandensein der jeweiligen Plasmidkonstrukte überprüft werden. In darauf folgenden Wachstumsversuchen wurden Proben aus dem Kulturüberstand entnommen. Per Western-Blot-Analyse und anschließender Immnunfärbung sollte die Crotonase detektiert werden. Diese war jedoch im Kulturüberstand nicht nachweisbar, so dass die Gesamt-RNA isoliert wurde, um durch eine RT-PCR zu überprüfen, ob ein entsprechendes Transkript gebildet wurde. Dabei war es nicht möglich, aus allen Klonen RNA zu isolieren. Bei denen, bei denen die Isolierung erfolgreich war, konnte die RT-PCR durchgeführt werden. Das Ergebnis hierzu ist der nachfolgenden Abbildung 14 zu entnehmen.

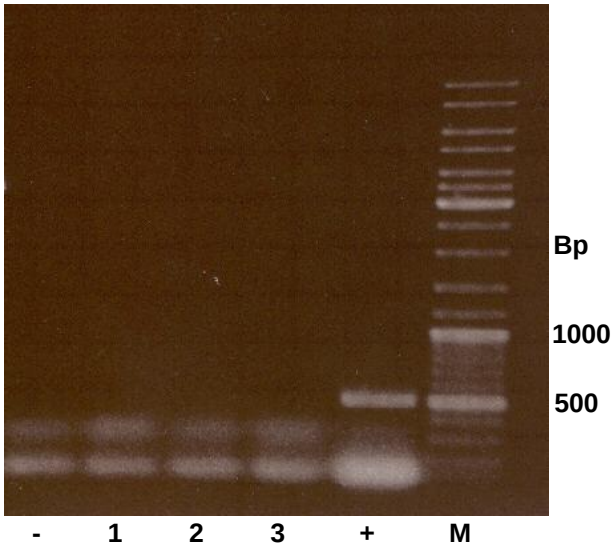

Abbildung 14: Gelbild zur RT-PCR zum Nachweis von 566-Bp-Fragmenten der Crotonase- und 502-Bp-Fragmenten von *catP*-Transkripten.
- : Negativkontrolle (cDNA als „Template“, pMTL-P_tetO2)
1: cDNA als „Template“ (pMTL-P_tetO2-colA'_crt)
2: cDNA als „Template“ (pMTL-P_tetO2-amyP'_crt)
3: cDNA als „Template“ (pMTL-P_tetO2-pec'_crt)
+: Positivkontrolle (*catP*-Transkript)
M: Marker („GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)

Der obigen Abbildung kann entnommen werden, dass kein Transkript der verschiedenen Fusionsproteine detektiert werden konnte. Lediglich für das Resistenz-Gen *catP*, welches ebenfalls vektorkodiert vorliegt, konnte ein entsprechendes Transkript nachgewiesen werden.

3.4.2. Konstruktion von pMTL-P_tetO1-sp_crt

Über die Verwendung und die Funktionalität des Tet-Systems in Clostridien ist nichts bekannt. Daher kam die Vermutung auf, dass es in Clostridien zu einer potentiellen Schleifen-Bildung zwischen den beiden *tet*-Operatorsequenzen tetO1 und tetO2 kommen könnte, was dazu führen würde, dass das gewünschte Transkript des nachfolgenden Gens nicht gebildet werden kann. Um dies zu vermeiden bzw. auszuschließen, wurde das Plasmid pMTL-P_tetO1 (Abbildung 15) konstruiert, welches dann nur noch über eine *tet*-Operatorsequenz verfügt.

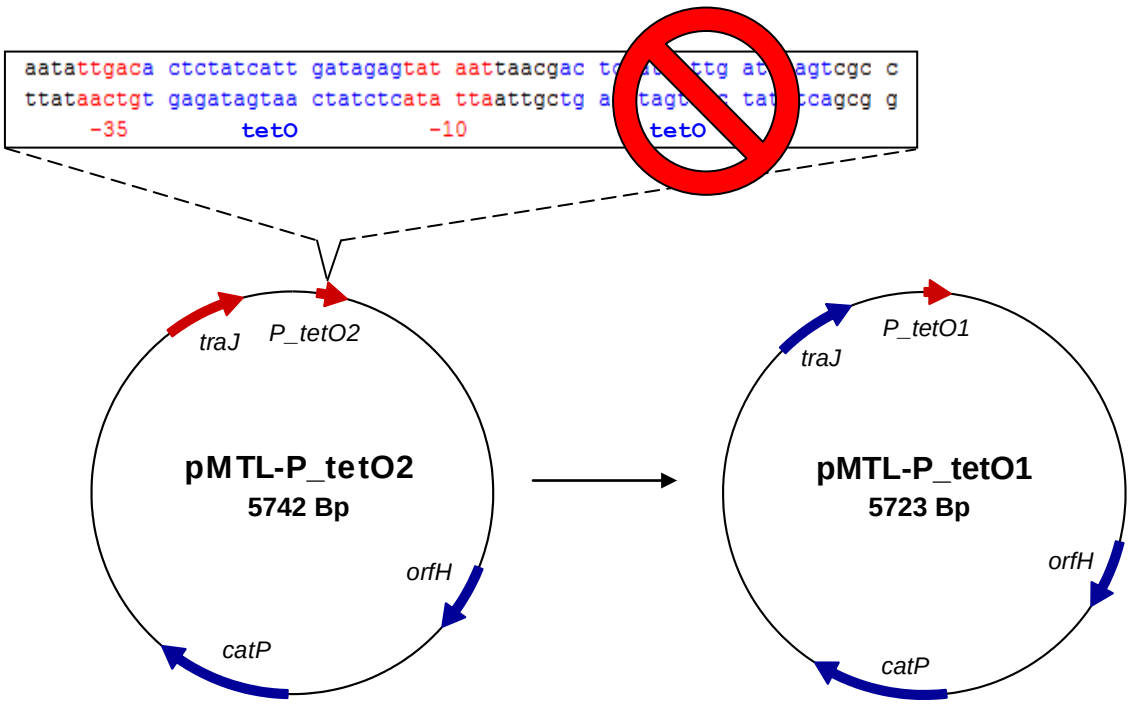

Abbildung 15: Schematische Darstellung zur Konstruktion des pMTL-P_tetO1-Plasmids

Dabei war es nicht möglich, den gewünschten Bereich aus dem pMTL-P_tetO1-Vektor zu amplifizieren, da das reverse Oligodesoxynukleotid sich nicht spezifisch genug an die Sequenz anlagern konnte. Deshalb wurde die Promoterregion mit nur einer *tetO1*-Operatorsequenz von der Firma biomers.net, Ulm, synthetisiert. In einer PCR diente das synthetisierte Fragment als „Template“ und konnte über geeignete Oligodesoxynukleotide am 5'-Ende mit der *Pme*I-Schnittstelle und am 3'-Ende mit der *Sbf*I-Schnittstelle versehen werden. Nach einer Restriktionsspaltung mit den entsprechenden Enzymen konnte das Insert in den ebenfalls zuvor geschnittenen Vektor ligiert werden. Das resultierende Plasmid pMTL-P_tetO1 wurde mittels Sequenzierung als mutationsfrei bestätigt.

In einem weiteren Schritt wurden die verschiedenen sp_crt-Fragmente aus den jeweiligen pMTL-P_tetO1-sp_crt-Plasmiden über *Sbf*I und *Sgf*I ausgeschnitten, gereinigt und in das zuvor entsprechend geschnittene pMTL-P_tetO1-Plasmid kloniert. Es folgte eine Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANr2-P_help-tetR_F1). Die entstandenen Plasmidkonstrukte sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: Konstruierte pMTL-P_tetO1-sp_crt-Plasmide

Plasmidbezeichnung	Klonierungsstamm
pMTL-P_tetO1-amyP′_crt pMTL-P_tetO1-orf5′_crt pMTL-P_tetO1-pec′_crt pMTL-P_tetO1-plc′_crt pMTL-P_tetO1-3D′_crt pMTL-P_tetO1-colA′_crt	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pANr2-P_help-tetR_F1)

3.4.2.1. Transformation von pMTL-PtetO1-sp_crt pANr2-P_help-tetR_F1 in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2

Nach einer Plasmidpräparation aus dem Zwischenwirt *E. coli* XL1-Blue MRF′ (pANr2-P_help-tetR_F1) konnten die isolierten Plasmidkonstrukte (pMTL-PtetO1-sp_crt pANr2-P_help-tetR_F1) direkt für eine Transformation in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 eingesetzt werden.
Die jeweiligen Transformanten wurden gepickt, in Selektivmedium angezogen und schließlich mittels Kontroll-PCR auf das Vorhandensein des pMTL-PtetO1-sp_crt überprüft. Für alle Konstrukte konnten hierbei positive Klone bestätigt werden.

Von Übernachtkulturen wurden Proben aus dem Kulturüberstand für einen Dot-Blot genommen. Für diesen wurden jeweils 5 µl direkt auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetropft. Die Membran wurde dann einer Immunfärbung analog zu 2.9.9. unterzogen. Jedoch war es auch hier nicht möglich, die Crotonase zu detektieren. Lediglich für die Positivkontrolle konnte ein Signal nachgewiesen werden.

3.4.2.2. Transkript-Nachweis der Crotonase mittels RT-PCR

Da bei der Verwendung der pMTL-P_tetO2-sp_crt-Konstrukte mittels RT-PCR für die Crotonase kein entsprechendes Transkript nachgewiesen werden konnte, sollte dies bei der Verwendung von nur einer *tetO*-Operatorstelle ebenso überprüft werden.

Für die RNA-Isolierung wuchsen allerdings nicht alle Klone an. Es gelang von den folgenden vier Klonen RNA zu isolieren:

- *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-colA'_crt
- *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-amyP'_crt
- *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-orf5'_crt
- *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-pec'_crt

Das Ergebnis der RT-PCR ist in Abbildung 16 zu sehen.

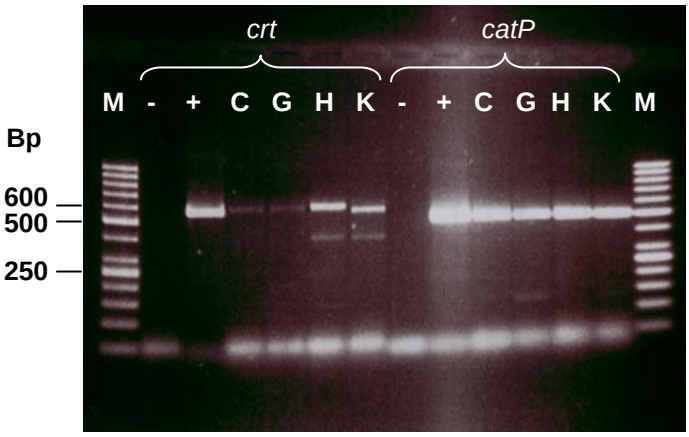

Abbildung 16: Gelbild zur RT-PCR zum Nachweis von 566-Bp-Fragmenten der Crotonase- und 502-Bp-Fragmenten von *catP*-Transkripten.
M: Marker („GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
- : Negativkontrolle (H_2O als „Template”)
+: Positivkontrolle (PCR mit dem entsprechenden Vektor als „Template“)
C: Klon mit pMTL-P_tetO1-colA'_crt-Plasmid
G: Klon mit pMTL-P_tetO1-amyP'_crt-Plasmid
H: Klon mit pMTL-P_tetO1-orf5'_crt-Plasmid
K: Klon mit pMTL-P_tetO1-pec'_crt-Plasmid

Aus der Abbildung 16 ist zu entnehmen, dass die RT-PCR bei allen getesteten Klonen erfolgreich war. Außerdem war es möglich, bei allen ein entsprechendes Transkript für die Crotonase nachzuweisen. Dabei sollte das amplifizierte Fragment eine Größe von 566 Bp aufweisen. Zu sehen ist dies an Hand der Bande zwischen 500 und 600 Bp. Als Kontrolle diente der Nachweis des Transkripts für die *catP*-Resistenzkassette. Hierbei ist das zu erwartende 502-Bp-Fragment auf Höhe der 500-Bp-Bande zu erkennen.

3.4.2.3. Wachstumsversuche mit *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-sp_crt und Wildtyp auf MES-Medium

Da für die Crotonase ein entsprechendes Transkript nachgewiesen werden konnte, wurden nun Wachstumsversuche auf MES-Medium durchgeführt. Über den Verlauf des gesamten Wachstums wurden dabei sowohl die optische Dichte ($OD_{600\ nm}$) als auch der pH-Wert verfolgt (siehe Abb. 17 und 18).

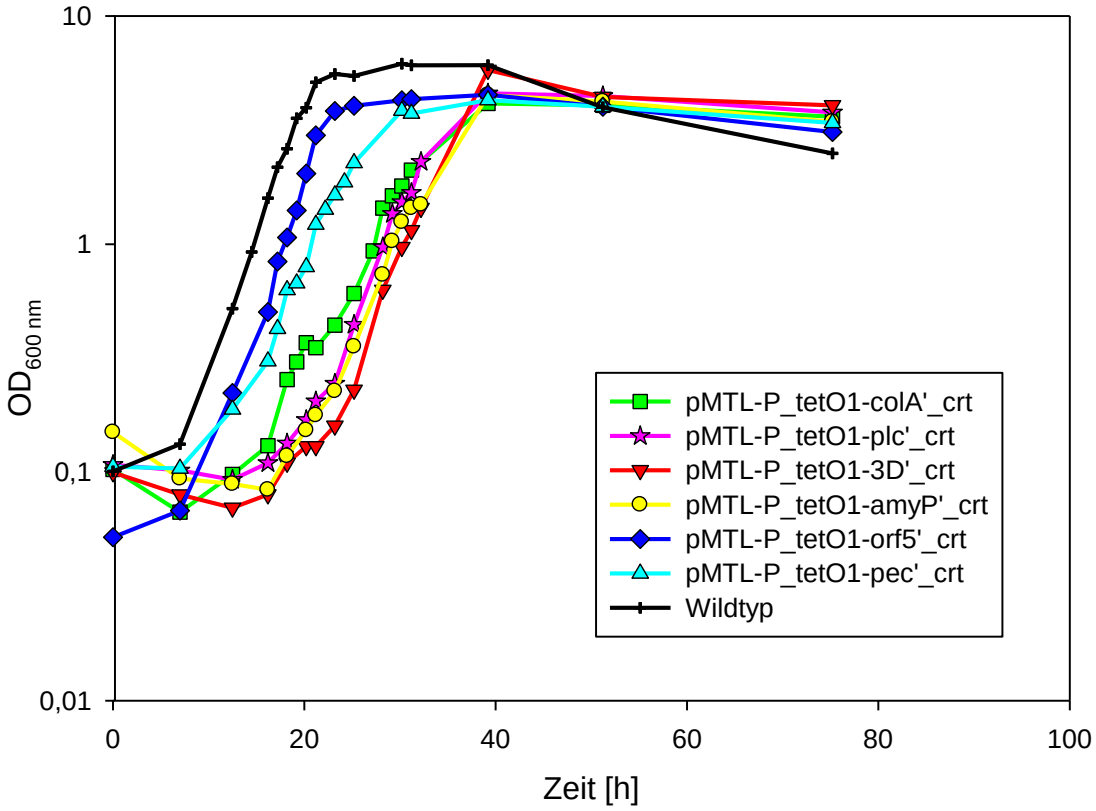

Abbildung 17: Wachstum von *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-sp_crt und Wildtyp in 50 ml MES-Medium und 5 µg/ml Clarithromycin und 15 µg/ml Thiamphenicol

Bei dem in Abbildung 17 dargestellten Wachstumsverlauf sind, im Vergleich zum Wildtyp und auch zum Wachstumsversuch mit *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANr2-P_help-tetR_F1) mit den verschiedenen pMTL-P_tetO2-sp_crt-Konstrukten nach Zugabe des Induktors (siehe Abbildung 7), keine Wachstumsdefizite durch die diversen pMTL-P_tetO1-sp_crt-Konstrukte festzustellen. Bei einigen war lediglich eine längere „lag“-Phase, verglichen mit dem Wildtyp, zu beobachten. Dies ist jedoch darauf zurückzuführen, in welchem Stadium des Wachstums sich die entsprechende Vorkultur beim Animpfen befand.

In der Literatur ist kein Wert für das pH-Optimum der Crotonase aus *C. acetobutylicum* beschrieben. Bei anderen Clostridien liegt dieser in einem Bereich von pH ~5-7. In diesem Bereich liegen auch die in diesem Wachstumsversuch gemessenen pH-Werte (siehe Abbildung 18), bei denen jeweils Proben für eine anschließende Western-Blot-Analyse entnommen wurden. Aus der Abbildung 17 zeigt sich, das mit Steigen der optischen Dichte (entsprechend Abbildung 18) der pH-Wert sinkt.

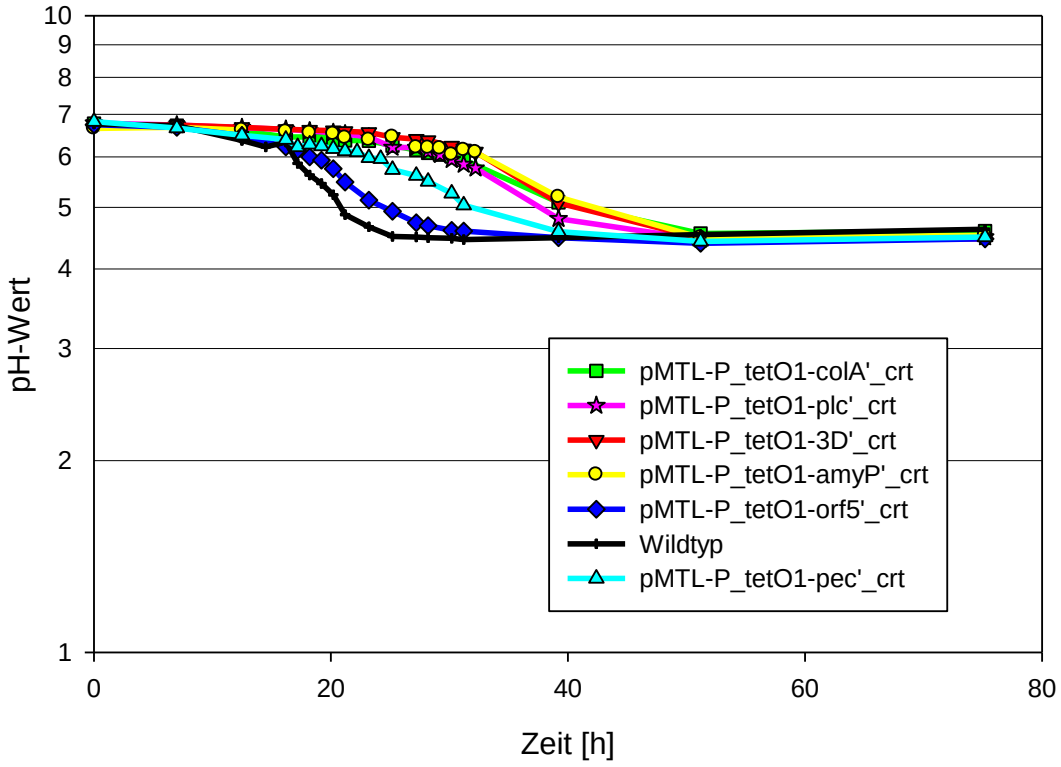

Abbildung 18: Verlauf des pH-Wertes beim Wachstum von *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-sp_crt und Wildtyp in 50 ml MES-Medium und 5 µg/ml Clarithromycin und 15 µg/ml Thiamphenicol

Das Wachstum erfolgte dabei auf MES-Medium, da in vorangegangenen Wachstumsversuchen mit dem Klon *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX das Toxin CPE nur dann im Überstand durch Western-Blot-Analysen detektiert werden konnte, sofern das Wachstum auf MES-Medium erfolgte und nicht auf CGM.

Für einen anschließenden Nachweis der Crotonase im Überstand wurden Proben während des Wachstums im Verlauf der exponentiellen Phase und in der stationären Phase entnommen. Aber auch diesmal war es nicht möglich, die Crotonase mittels Western-Blot-Analyse nachzuweisen. Auch die Untersuchung der Cytoplasma- und Membranfraktion führte zu keinem positiven Resultat.

3.5. Pre- und Pro-Sequenz einer *Staphylococcus hyicus*-Lipase

Ein anderer Versuchsansatz, die Crotonase bzw. das CPE zu sezernieren, bestand in der Verwendung der Pre- und Pro-Sequenz einer *Staphylococcus hyicus*-Lipase. In der Literatur ist beschrieben, dass die Kombination aus dem Signalpeptid (prelip) und dem Pro-Bereich (prolip) der *S. hyicus*-Preprolipase als ein sehr effektives Sekretionssignal, generell in Gram-positiven Bakterien, agieren kann (Kouwen *et al*., 2010). Das Pre-Peptid fungiert hierbei als Signalpeptid und das Pro-Peptid übernimmt die Rolle eines Chaperons.

3.5.1. Konstruktion von pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc

Für die Konstruktion des pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc-Plasmids wurde als Ausgangsvektor der pMTL-P_bdhA-Vektor gewählt. Dieser besitzt bereits den konstitutiv schwachen Promoter P_*bdhA* der Butanol-Dehydrogenase bdhA aus *C. acetobutylicum.* Hinter diesen wurden schrittweise zunächst die Pre-Pro-Sequenz, dann das Crotonase-Gen und zuletzt die Sequenz des Terminators T_{adc} der Acetacetat-Decarboxylase kloniert. Das Klonierungsschema ist der Abbildung 19 zu entnehmen.

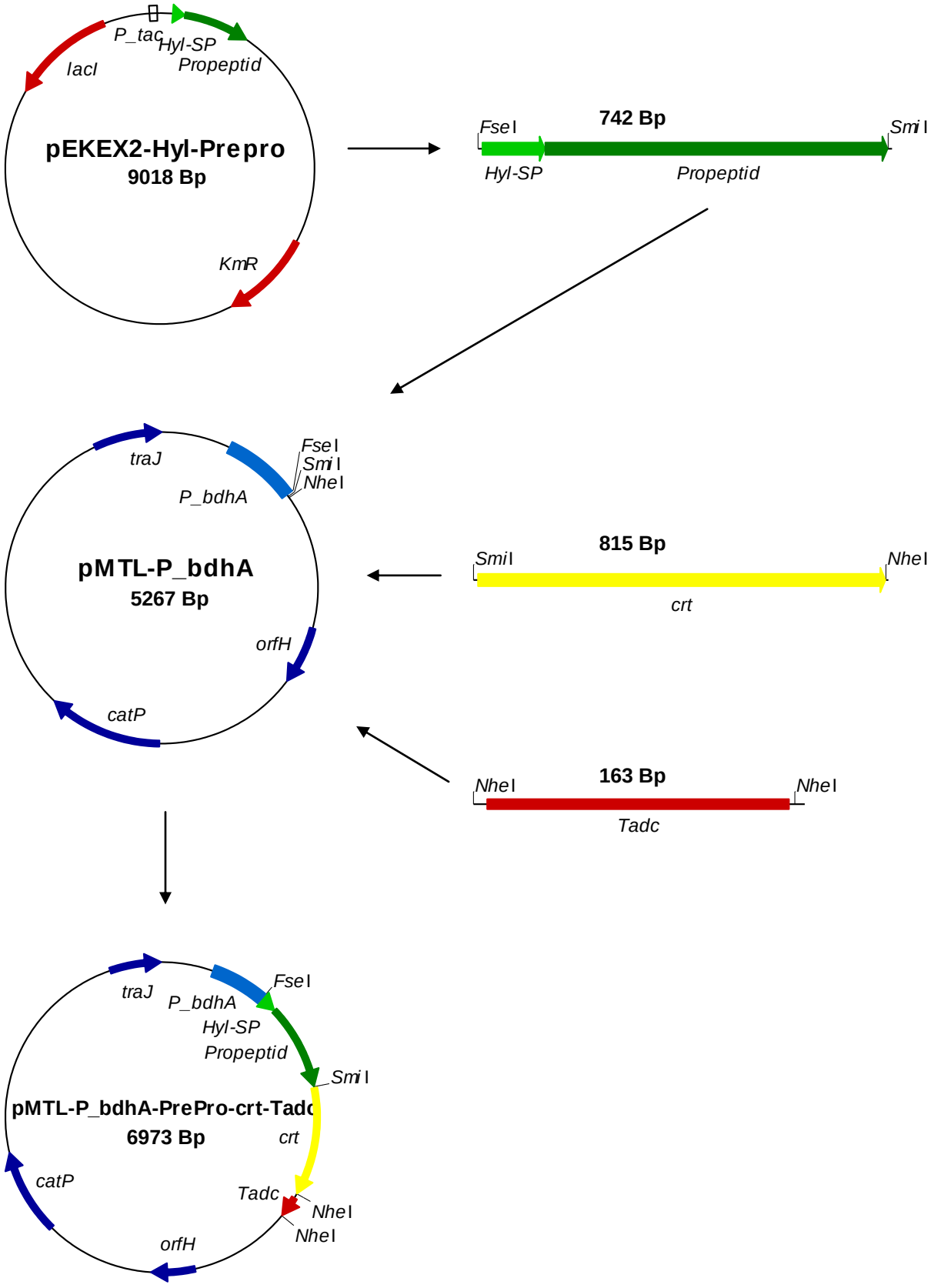

Abbildung 19: Klonierungsschema für das Plasmid pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc

Die Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF' erwies sich als erfolgreich. Auch eine anschließende Sequenzanalyse ergab, dass einschließlich der Promoterregion alle eingefügten Fragmente mutationsfrei vorlagen.

3.5.2. Transformation von pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc in *C. acetobutylicum*

Nach erfolgreicher Transformation des Plasmidkonstruktes pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc in *C. acetobutylicum* wurden zehn Kolonien gepickt und aus diesen die chromosomale DNA isoliert. Durch eine Kontroll-PCR auf die Pre-Pro-Sequenz (siehe Abb. 20) konnte das Vorhandensein des Plasmids in allen zehn *C. acetobutylicum* pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc-Klonen bestätigt werden. Hierbei ist bei allen Klonen und der Positivkontrolle eine entsprechende Bande bei einer Größe von 750 Bp zu erkennen.

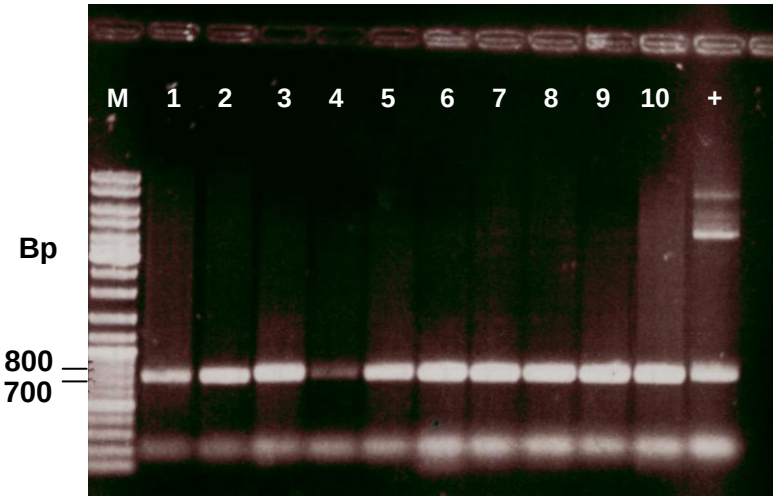

Abbildung 20: Gelbild der Kontroll-PCR zur Amplifikation des PrePro-Fragmentes
M: („GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
1-10: Überprüfte *C. acetobutylicum* pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc-Klone
+: Positivkontrolle (Plasmid pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc als „Template“)

3.5.3. Detektion der Crotonase mittels Western-Blot-Analyse

Durch eine Western-Blot-Analyse sollte überprüft werden, ob die Crotonase im Überstand, in der Cytoplasma- oder Membranfraktion nachweisbar ist. Allerdings konnte nach der Immunfärbung erneut nur die Positivkontrolle detektiert werden. Auch die Überprüfung der Funktionalität der Pre-Pro-Sequenz in *E. coli* brachte keinen erfolgreichen Nachweis.

3.5.4. Austausch des *bdhA*-Promoters durch den *thlA*-Promoter

Da es sich bei dem *bdhA*-Promoter um einen sehr schwachen Promoter handelt und es deshalb sein kann, dass die Aktivität für die Expression zu gering ist, sollte dieser durch den starken, konstitutiv aktiven Promoter P_*thlA* der Thiolase A aus *C. acetobutylicum* substituiert werden. Das resultierende Plasmidkonstrukt wurde pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc genannt (Abb. 21).
Die Transformation in den Zwischenwirt *E. coli* zeigte bereits einen deutlichen Unterschied zu der Transformation von pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc, was auf den stärkeren Promoter schließen lassen könnte. Hier konnten lediglich insgesamt zehn Klone auf vier Selektivagarplatten identifiziert werden. Dagegen kam es bei der Transformation des pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc-Konstruktes zur Ausbildung eines Rasens. Unabhängig davon konnten positive Klone mittels Sequenzierung bestätigt und diese auch erfolgreich in *C. acetobutylicum* transformiert werden.

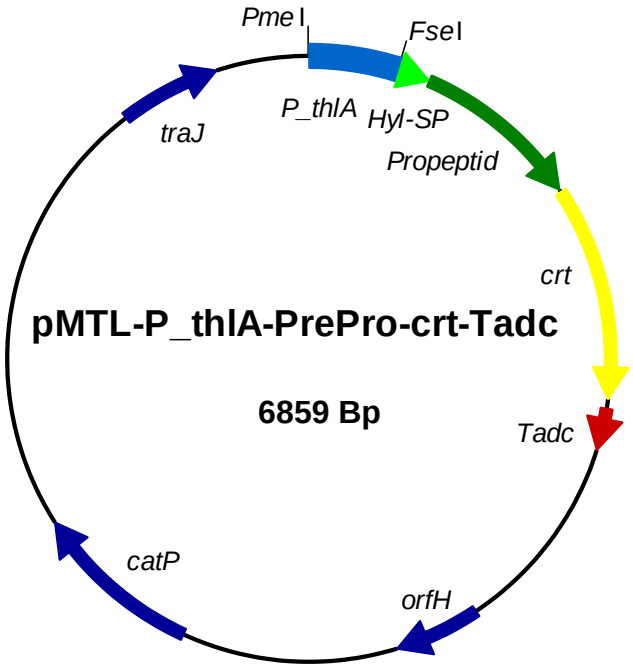

Abbildung 21: Plasmidkarte von pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc mit dem *thlA*-Promoter

3.5.5. Transkript-Nachweis der Crotonase mittels RT-PCR

Um die Funktionalität des *thlA*-Promoters zu überprüfen, wurde von diesem Klon am Ende der exponentiellen Wachstumsphase die Gesamt-RNA isoliert und in eine RT-PCR eingesetzt. Das Ergebnis dieses Experiments ist der Abbildung 22 zu entnehmen.

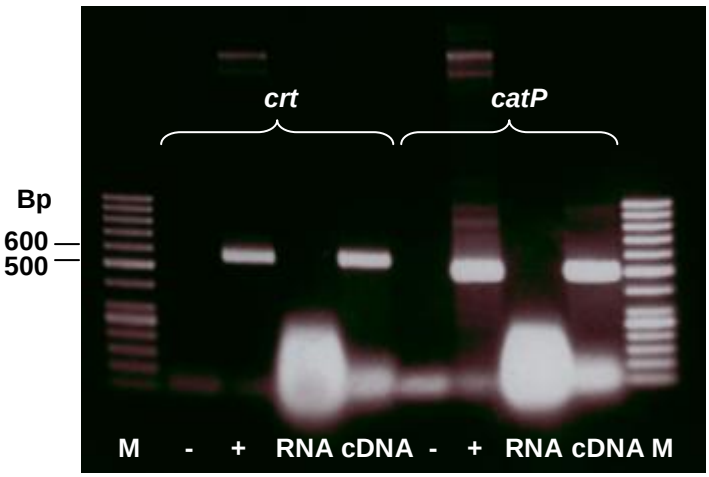

Abb. 22: Gelbild zur RT-PCR zum Nachweis von 566-Bp-Fragmenten der Crotonase- und 502-Bp-Fragmenten von *catP*-Transkripten.
M: Marker („GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
- : Negativkontrolle für PCR (H_2O als „Template“)
+: Positivkontrolle (Vektor als „Template“, Funktionskontrolle der Oligodesoxynukleotide)
RNA (Kontrolle für DNase-Verdau)
cDNA (cDNA als „Template“)

Aus der Abbildung 22 geht hervor, dass das Transkript der Crotonase in *C. acetobutylicum* pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc detektiert werden konnte. Ebenso konnte das Transkript des Resistenz-Gens *catP*, welches auf dem gleichen Vektor kodiert ist und als Kontrolle für die RT-PCR diente, nachgewiesen werden.

3.5.6. SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse

Nachdem durch die RT-PCR das Transkript der Crotonase nachgewiesen werden konnte, sollte das Protein im Kulturüberstand mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse ebenfalls detektiert werden. Für die Detektion erfolgte zunächst eine Anreicherung der Crotonase aus dem Kulturüberstand mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie, welche analog zu 2.9.3. durchgeführt wurde.
Die verschiedenen Eluate durch Waschen mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (30 mM, 75 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM, 1 M) wurden in eine SDS-PAGE eingesetzt. Das Polyacrylamid-Gel wurde anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Der Abbildung 23 ist das Ergebnis dieser Färbung zu entnehmen.

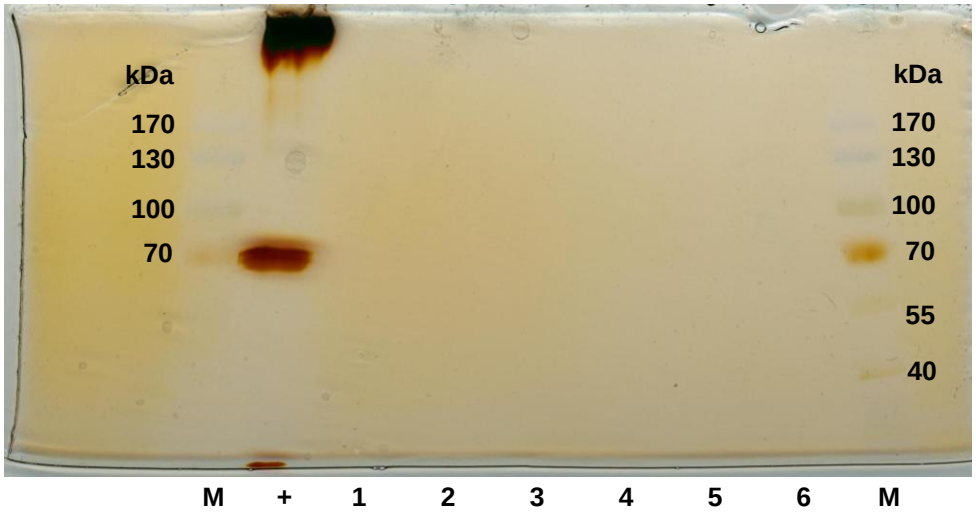

Abbildung 23: Gelbild zur Silberfärbung
M: Marker (Prestained Protein Ladder“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
+: Positivkontrolle (BopA-His_6)
1-6: Eluate mit steigender Imidazolkonzentration (30 mM, 75 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM, 1M)

Aus obiger Abbildung geht hervor, dass in keiner Fraktion eine Bande für die Crotonase detektiert werden konnte. Lediglich die Positivkontrolle (BopA-His_6) ist sichtbar.

Beim anschließenden Immunblot konnte ebenfalls nur die Positivkontrolle detektiert werden.

3.6. Transformation von *C. sporogenes*

Da Clostridien generell genetisch unterschiedlich zugänglich sind, wurde in einem parallelen Versuchsansatz die Funktionalität folgender Plasmidkonstrukte in *C. sporogenes* untersucht:

- pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc
- pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc
- pMTL-P_tetO1-pec_crt (pANr2-P_help-tetR-F1)

Für die Konjugation in *C. sporogenes* wurden die Plasmidkonstrukte zunächst in den Konjugationsstamm *E. coli* CA434 transformiert.
Die Konjugation erwies sich als erfolgreich und nach Isolierung der chromosomalen DNA konnte durch eine Kontroll-PCR das Vorhandensein der Plasmide bestätigt werden.
Daraufhin wurden die drei verschiedenen *C. sporogenes*-Klone in 50 ml 2YT-Medium angezogen und bei Erreichen der stationären Phase geerntet. Es wurden für die Detektion der Crotonase Proben aus dem Kulturüberstand, der Cytoplasma- und Membranfraktion verwendet. Diese wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Das Ergebnis einer anschließenden Coomassie-Färbung ist der Abbildung 24 zu entnehmen.

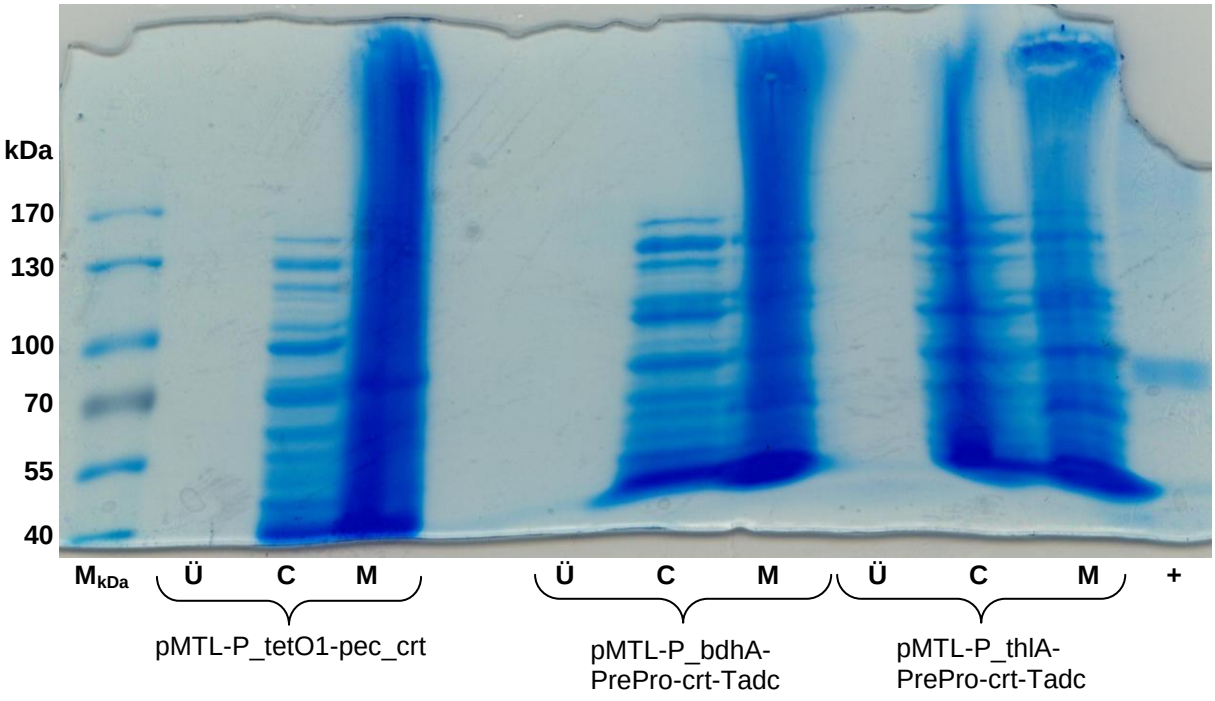

Abbildung 24: Gelbild zur Coomassie-Färbung
M_{kDa}: Marker („Prestained Protein Ladder“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
Ü: Überstand
C: Cytoplasmafraktion
M: Membranfraktion

Der Abbildung 24 ist zu entnehmen, dass für alle drei Klone sowohl in der Cytoplasma- als auch in der Zellmembranfraktion Proteine detektierbar waren. Dagegen konnten für keinen Klon im Kulturüberstand Proteine nachgewiesen werden. Da sich allerdings der Marker ab 40 kDa nicht weiter auftrennte, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob für das Fusionsprotein eine entsprechende Bande vorlag. In einem Western-Blot mit anschließender Immunfärbung sollte dies überprüft werden. Ein Nachweis der Crotonase im Kulturüberstand bzw. in der Cytoplasma- oder Membranfraktion war jedoch auch hier nicht möglich.

Im Folgenden wurden RT-PCR-Versuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob die verschiedenen *C. sporogenes*-Klone ein entsprechendes Transkript für die Crotonase bilden. Das Ergebnis hierzu ist in Abbildung 25 zu sehen.

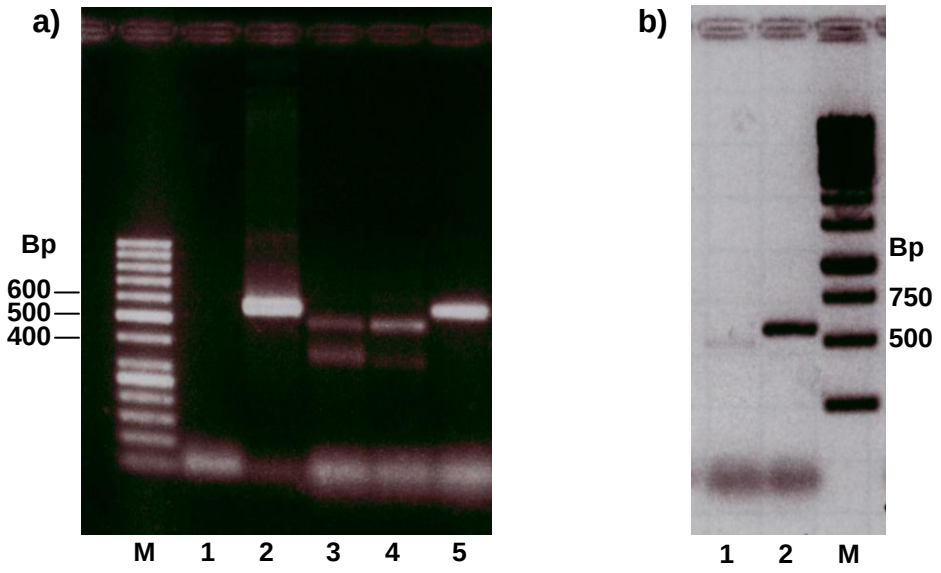

Abbildung 25: Gelbilder zu RT-PCR-Versuchen zur Detektion von 566-Bp-Fragmenten von Crotonase-Transkripten
a) M: („GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder“, Fermentas GmbH; St. Leon-Roth)
1: Negativkontrolle (H_2O als „Template“)
2: Positivkontrolle für die PCR (Vektor als „Template“, Funktionskontrolle der Oligodesoxynukleotide)
3: cDNA als „Template” (*C. sporogenes* pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc)
4: cDNA als „Template” (*C. sporogenes* pMTL-P_tetO1-pec'-crt)
5: Positivkontrolle der RT-PCR (cDNA aus *C. acetobutylicum* pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc als „Template)
b) 1: cDNA als „Template” (*C. sporogenes* pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc)
2: Positivkontrolle der RT-PCR (cDNA aus *C. acetobutylicum* pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc als „Template)

Es ist ersichtlich, dass es sich bei den Banden der untersuchten Proben aus den verschiedenen *C. sporogenes*-Klonen um unspezifisch amplifizierte Fragmente handeln muss, da diese, im Vergleich zu den Kontrollen, nicht die erwartete Größe von 566 Bp aufwiesen.

Zur Überprüfung, ob es eventuell nach der Konjugation zu Sequenzveränderungen in den jeweiligen Plasmidkonstrukten kam, sollte eine „plasmid recovery“ in *E. coli* erfolgen, um eine anschließende Sequenzierung durchführen zu können. Auch nach mehrmaligen Transformationsversuchen blieben diese ohne Erfolg bzw. die Kolonien, die nach zehn Tagen Inkubation wuchsen, konnten nicht als positiv bestätigt werden.

4. Diskussion

Bereits 1813 berichtete Vautier, dass es zu einer Regression des Tumors bei Patienten kam, die auf Grund einer clostridiellen Infektion an Gasgangrän litten (Nowotny, 1985; Mengesha, 2007).

Im Jahr 1935 verwendete Connell sterile Filtrate von *C. histolyticum* zur Behandlung fortgeschrittener Tumore (Connell, 1935). Die beobachtete Tumorregression wurde hierbei auf die Produktion proteolytischer Enzyme zurückgeführt, so dass 1947 erstmalig Clostridiensporen in tumortragende Mäuse injiziert wurden (Parker *et al*., 1947). Diese Studien wiesen bereits auf ein hohes Potential bei der Verwendung clostridieller Sporen zur induzierten Tumor-Lyse hin. In späteren Untersuchungen wurden Sporen von *C. tetani* sowohl tumortragenden als auch tumorfreien Mäusen intravenös verabreicht. Dabei starben alle Mäuse mit einem Geschwür an den Folgen einer Tetanusvergiftung, wohingegen die gesunden Mäuse die Injektion unbeschadet überlebten (Malmgren und Flanigan, 1955). Dementsprechend waren ein Auskeimen der Sporen und die Vermehrung der vegetativen Bakterien nur im hypoxischen Tumorgewebe möglich (Moese und Moese, 1959). In einer Versuchsreihe sollten verschiedene nicht-toxische und apathogene Clostridien-Stämme identifiziert und sowohl bezüglich ihres Vermögens, spezifisch Tumore zu besiedeln und selektiv zu bewachsen, als auch auf ihr Onkolysepotential hin überprüft werden. Diese Eigenschaften konnten u. a. dem proteolytischen Bakterium *C. sporogenes* (ehemals *C. butyricum* (M-55) bzw. *C. oncolyticum*) zugewiesen werden (Moese und Moese, 1964). In darauf folgenden Versuchen wurden verschiedene Clostridien in diversen Tiermodellen auf ihre Onkolyseeigenschaften untersucht (Gericke und Engelbart, 1964; Thiele *et al*., 1964). Daran schlossen sich klinische Studien mit Krebspatienten an, bei denen gezeigt wurde, dass systemisch verabreichte, apathogene Clostridien-Stämme in nekrotisierenden Bereichen des Tumors auskeimen und den Tumor lysieren konnten (Heppner *et al*., 1966; 1978). Trotz der guten Verträglichkeit bei den Patienten wurden, auf Grund erneuten Tumorwachstums durch verbleibende Tumorzellen, die klinischen Studien eingestellt.

Die unzureichende Tumorregression durch alleinige Verabreichung von Sporen führte zu der Idee, nicht-pathogene Clostridien als Vektor für therapeutische Proteine zu

verwenden (Minton *et al*., 1995). Dazu wurden hauptsächlich der saccharolytische Stamm *C. acetobutylicum* und der proteolytische Stamm *C. sporogenes* genetisch modifiziert. Basierend auf der CDEPT wurde jeder Stamm mit der genetischen Information beispielsweise für das bakterielle Enzym Cytosindeaminase (CD) (Fox *et al*., 1996; Theys *et al*., 2001; Liu *et al*., 2002) oder die Nitroreduktase (NRT) (Theys *et al*., 2006) versehen, um mit Hilfe dieser Enzyme die jeweilige Wirkstoffvorstufe in seine aktive Form umzuwandeln. Daneben wurden Gene für bestimmte Cytokine, wie z. B. der Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α, Theys *et al*., 1999) oder das Interleukin-2 (IL-2, Barbé *et al*., 2005), eingebracht.

Neben Clostridien finden auch eine Reihe weiterer Bakterien Verwendung im Kampf gegen den Krebs. Dazu zählen einige Arten der Gattung *Bifidobacterium* (*B. longum, B. adolescentis* und *B. infantis*), welche zu der menschlichen Darmflora gehören und seit Jahren u. a. als Probiotika Verwendung finden (Koop-Hoolihan, 2001; Tamime, 2002). Da die Tumorbesiedelung *per se* keine onkolytischen Effekte hervorbrachte, wurden auch hier das Gen für die bereits erwähnte Cytosindeaminase eingebracht (Nakamura *et al*. 2002; Fujimori *et al*., 2003) und deren Produktion und Funktionalität bestätigt.
Auch das Gram-negative, fakultativ anaerobe Bakterium *Salomonella typhimurium* wurde bereits genetisch modifiziert und produzierte u. a. das bakterielle Enzym CD (Luo *et al*., 2001). Eine klinische Studie scheiterte jedoch mutmaßlich an einer unzureichenden Tumorbesiedelung (Nemunaitis *et al*., 2003). Neben den Virulenzfaktoren (z. B. LPS) sind Salmonellen in der Lage, auch gesundes Gewebe zu besiedeln, was zu Nebenwirkungen führen kann. Diese Problematik besteht ebenfalls bei der Verwendung von *L. monocytogenes* und *E. coli* (Wei *et al*., 2008).

Der Einsatz viraler Vektoren in der Tumortherapie basiert auf der klassischen Gentherapie. Unter den derzeit in klinischen, gentherapeutischen Studien eingesetzten Virustypen (Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Retroviren und Herpes-Simplex-Viren) besitzen alle ihre eigenen Vor- und Nachteile. Unter den Bestehenden sind die Replikations-kompetenten onkolytischen Vektoren die vielversprechendsten (Seth, 2005; Colombo *et al*., 2005).
Dabei zieht das Tumorsupressor-Gen *p53* als Krebstherapeutikum die größte Aufmerksamkeit auf sich. In präklinischen Studien konnte so die Funktion des p53

wieder hergestellt werden. Die dadurch ausgelöste Apoptose führte zur Zerstörung der Tumorzellen (Fujiwara *et al*., 1994; Zhang *et al*., 1994).
Weitere Ansätze greifen auf heterologe Suizid-Gene zurück, wie beispielsweise das HSV-TK-Gen (Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase), das für ein Enzym kodiert, welches das Nukleosid-Analogon Ganciclovir in eine toxische Verbindung umwandelt. Diese induziert die Apoptose und bewirkt dadurch das Absterben der betroffenen Zellen (Sterman *et al*., 1998).
Durch die intratumorale Injektion ist die Anwendbarkeit viraler Vektoren jedoch sehr begrenzt. Des Weiteren sind nicht alle in der Lage, die Zellen effizient zu transfizieren, so dass ein Teil des Tumors unversehrt bleibt und dann erneut wachsen kann (Clark, 1991). Zusätzlich wird der effektive Einsatz solcher Viren manchmal durch die Wirtsimmunität oder schon bereits vorhandene Antikörper gegen das entsprechende Virus verhindert (Parato *et al*., 2005). Auch unter dem Sicherheitsaspekt betrachtet, besteht immer die Möglichkeit, dass theoretisch durch eine Rekombination mit endogener Virus-DNA die Replikationsdefizienz aufgehoben werden kann.

Bei allen soliden Tumoren kommt es ab einem Tumordurchmesser von etwa 2 mm auf Grund einer Mangelversorgung zur Angiogenese. Dabei entstehen eine irreguläre Gefäßbildung mit blinden Enden, heterogene Tumorzellen und hypoxische Bereiche (Vaupel und Harrison, 2004). Für diese Bereiche ist eine Sauerstoffkonzentration von unter 1 %, im Vergleich zu 3-15 % bei gesunden Geweben, charakteristisch (Ryan *et al*., 2006). Dieses Milieu stellt für die Infektion mit Viren einen weiteren Nachteil dar. Dagegen bietet es optimale Bedingungen für anaerobe Bakterien. Im direkten Vergleich weisen die Therapieansätze mit Bakterien daher einige Vorteile gegenüber denen mit viralen Vektoren auf.
Unter diesen nehmen die Clostridien eine Sonderstellung innerhalb der bakteriellen Vektorsysteme ein. Gegenüber den Bifidobakterien und Salmonellen weisen die strikt anaeroben Clostridien eindeutige Vorzüge auf (Wei *et al*., 2007). Nach Applikation der Endosporen keimen diese selektiv im hypoxischen Bereich solider Tumore aus und induzieren nativ die Lyse der Tumorzellen.
Durch die voranschreitende Technologie in Bezug auf die genetische Zugänglichkeit der Clostridien ist es nur noch eine Frage der Zeit, bis der Einsatz rekombinanter Clostridiensporen klinische Realität wird.

Verschiedene Stämme wurden dazu, wie oben beschrieben, genetisch modifiziert, so dass sie therapeutische Proteine, Cytokine oder Enzyme, die die inaktive Vorstufe eines Wirkstoffs in seine aktive Form umwandeln („prodrug-converting"-Enzyme), produzieren.

Bei den therapeutischen Proteinen handelt es sich meistens um Toxine aus unterschiedlichen Bakterien. Aus *E. coli* wurden beispielsweise die Colicine isoliert und bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf eine mögliche Behandlung in der Krebstherapie untersucht (Lancaster *et al*., 2007). In einer Studie zeigte sich, dass bei elf getesteten humanen Tumorzelllinien das Colicin E1 und A das Zellwachstum inhibieren (Chumchalová und Smarda, 2003). Ebenso werden das Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* und das Diphterietoxin (DT), ein Exotoxin aus *Corynebacterium diphteriae*, u. a. als potentielle Therapeutika diskutiert (Michl und Gress, 2004). Für ihre Anwendung werden sie entweder mit einem Wachstumsfaktor oder mit einem Antikörper gekoppelt (Kreitman, 2001).

Unter den verschiedenen Toxinen liegt ein deutliches Interesse, auf Grund der nativen Bindeeigenschaft zu Claudin-3- und -4-Rezeptoren, bei dem Enterotoxin CPE aus *C. perfringens*. Der C-terminale Bereich dieses Toxins (C-CPE) verfügt über eine ausreichend hohe Affinität zum Rezeptor, ohne dabei eine Cytolyse zu initiieren (Sonoda *et al*., 1999; Kondoh *et al*. 2005).

Studien haben gezeigt, dass es sich bei diesem Fragment um einen wirksamen „Enhancer" bei der zellulären Aufnahme handelt, dessen Aktivität um ein 400-faches stärker ist als klinisch eingesetzte Enhancer (Kondoh *et al*., 2006). So konnte C-CPE die Wirksamkeit der Cytostatika Taxol und Carboplatin verstärken und signifikant das Zellwachstum bei epithelialem Ovarialkarzinom inhibieren (Gao *et al*., 2011).

Auch wurde dieses Fragment bereits an den PSIF („protein synthesis inhibitory factor") gekoppelt (Ebihara *et al*., 2006; Saeki *et al*., 2009; 2010), bei dem es sich um das *Pseudomonas* Exotoxin A handelt, dem die Zell-Bindedomäne fehlt (Ogata *et al*., 1990). Aber auch Fusionen mit einem verkürzten Fragment des Diphterietoxin A (DTA) (Kakutani *et al*., 2010) oder dem *P. aeruginosa* Exotoxin A (ETA') (Yao *et al*., 2010) wurden bereits getestet. Die Arbeitsgruppe um Yuan verwendete das C-CPE als Ligand sowohl für den Tumornekrosefaktor TNF als auch für das pflanzliche Toxin Gelonin aus *Gelonium multiflorum* (Yuan *et al*., 2009; 2011). Bei all diesen Ansätzen wurde die C-terminale Domäne des CPE genutzt, um gezielt die jeweiligen toxischen Proteine in den Tumorzellen einzusetzen. Dies erwies sich sowohl *in vitro* als auch *in*

vivo als effektiv. Die Strategie richtet sich hierbei auf die Verbesserung der Cytotoxizitäten der jeweiligen Proteine, nicht auf die toxische Wirkung von CPE selbst. Dabei kombiniert CPE *per se* schon die für eine *in vivo*-Anwendung wichtige Spezifität und effiziente Cytotoxizität. Darauf basierend wurde CPE erstmalig in der Gentherapie unter Verwendung eines non-viralen Vektors eingesetzt (Walther *et al*., 2011). Durch die *cpe*-Expression konnte schließlich *in vitro* und *in vivo* eine schnelle und selektive Eradikation der Tumorzellen hervorgerufen werden. Bemerkenswert hierbei war, dass die CPE-Produktion zu einem Bystander-Effekt führte und nicht-transfizierte Zellen ebenfalls schädigte, was die Wirksamkeit des Toxins noch verstärkte.
In diesem und auch in den diversen Versuchsansätzen mit unterschiedlichen C-CPE-Fusionen wurden mit verschiedenen humanen Krebszelllinien, welche Claudin-3- und -4-Rezeptoren überexprimieren, und teilweise zusätzlich mit tumortragenden Mausmodellen gearbeitet. Bei diesen erfolgte die Applikation durch intratumorale Injektion. Dies bietet eine therapeutische Option der lokalen Behandlung von refraktären soliden Tumoren, aber verfügt nicht über die Möglichkeit, schwerzugängliche Tumore, wie beispielsweise das Pankreaskarzinom, zu behandeln. Ein vielversprechender und innovativer Ansatz hierzu ist die Kombination aus CPE und einem auf Clostridien basierenden Vektorsystem.
Daher wurde in diesem Dissertationsprojekt angestrebt, ein entsprechendes Expressionssystem zu entwickeln, welches durch die Produktion des Enterotoxins und dessen Interaktion mit den Claudin-3- und -4-Rezeptoren einen effektiven Therapieansatz, insbesondere zur Behandlung des Pankreaskarzinoms, ermöglicht.

Für *C. acetobutylicum* konnte bereits ein schwaches *cpe*-Expressionssystem erstellt werden (Box, 2006). Da das CPE natürlicherweise in *C. perfringens* sporulationsabhängig gebildet wird, wurde das Toxin mit einem Signalpeptid (AmyP') versehen. Eine direkte Klonierung in den Zielorganismus *C. acetobutylicum* ist auf Grund unzureichender Transformationseffizienzen aber nicht möglich. Deshalb erfolgten alle Klonierungsarbeiten im Zwischenwirt *E. coli*.
Während dieser Klonierungsarbeiten zeigte sich allerdings, dass das Signalpeptid-CPE-Fusionsprotein außerordentlich wachstumshemmend für diesen Zwischenwirt ist, so dass lediglich ein einziger positiver Klon erhalten werden konnte.
Zur Vermeidung solcher Klonierungsschwierigkeiten im Zwischenwirt und um die Sekretion zu optimieren, wurden über eine computergestützte *in silico*-Suche potentiell

bessere clostridielle Signalsequenzen identifiziert, welche sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien ohne Nebeneffekte exprimiert und prozessiert werden können (König, 2008). Dabei wurden die zehn vielversprechendsten Signalsequenzen mit dem Gen für die Crotonase fusioniert. Obwohl in *E. coli* keine Rezeptoren für das CPE bekannt sind, wurde dieses Reporterprotein ausgewählt, um toxische Effekte des Enterotoxins auf den Zwischenwirt ausschließen zu können.

Es ist mittlerweile bekannt, dass das CPE über elektrostatische Anziehung mit der zweiten extrazellulären Schleife der Claudin-Rezeptoren interagiert (Kimura *et al*., 2010). Entscheidend dabei ist ein zentrales Bindemotiv (Winkler *et al*., 2009), welches durch gezielte Mutagenese als essentiell für die Bindung bestätigt wurde (Robertson *et al*., 2010). In *E. coli* wurde eine putative Permease identifiziert, die eine hohe Sequenzhomologie mit der zweiten extrazellulären Schleife aufweist, aber nicht über das entscheidende Bindemotiv vefügt (Meisohle, 2010). Demnach sollte das CPE *per se* für den Klonierungszwischenwirt *E. coli* keine negativen Auswirkungen haben.

Dennoch zeigte sich, dass das gebildete Fusionsprotein für *E. coli* letal ist. Bei separaten Klonierungen der jeweiligen Signalpeptidsequenzen und *crt* bzw. *cpe* konnte dagegen kein Wachstumsnachteil beobachtet werden. Wurden beide Fragmente jedoch in einem Vektor zusammengefügt, so war es nicht möglich, positive Klone zu identifizieren. Wachstumsversuche, bei denen die jeweilige Fusion unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promoters stand, führten nach Induktion zum Stagnieren und Absterben der Kulturen. Der letale Effekt wird vermutlich durch Akkumulation der gebildeten Fusionsproteine in der Zellmembran verursacht (König, 2008).

Um diese Problematik bei der Überproduktion der verschiedenen Signalpeptid-Crotonase-Fusionen im Zwischenwirt *E. coli* zu umgehen, ist es notwendig, ein Expressionssystem zu verwenden, welches im Zwischenwirt reprimiert wird, dagegen im Zielorganismus *C. acetobutylicum* angeschaltet vorliegen soll.

Da das Tet-System derzeit das effizienteste induzierbare System für die Regulation der Transkription ist, wird es allgemein sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten angewendet (Orth *et al*., 2000). Dabei erwies es sich als sehr effektiv in vielen Organismen (Bertram und Hillen, 2008). Da dies ebenso in *E. coli* eines der am striktesten regulierten Systeme ist (Skerra, 1994), fiel die Wahl auf dieses Expressionssystem.

Dazu wurde ein 2-Vektor-System konstruiert (siehe Abbildung 5), bei dem ein Plasmid die Sequenz der zwei *tet*-Operatoren und die Information der jeweiligen Fusionsproteine trägt. Das andere verfügt über die genetische Information des Repressors TetR und wird auf Grund des Replikationsursprungs nur in Gram-negativen Bakterien abgelesen, in diesem Fall also nur im Zwischenwirt.

In Wachstumsversuchen konnte nach Induktion erneut festgestellt werden, dass die Produktion der Fusionsproteine einen außerordentlich hemmenden Einfluss auf den Zwischenwirt ausübt (siehe Abbildung 7).

Eine Detektion der produzierten Fusionsproteine erfolgte durch eine Western-Blot-Analyse mit anschließender Immunfärbung. Dabei konnte mit Ausnahme des Konstruktes pMTL-P_tetO2-amyP'-crt und der Negativkontrolle die Crotonase in den Zellmembranfraktionen aller *E. coli*-Stämme nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8). Bei den ermittelten Banden auf der Höhe der 35-kDa-Markerbande könnte es sich um das jeweilige Fusionsprotein handeln. Demnach könnte es sich bei der Bande darunter um die Crotonase (28 kDa), bei der das Signalpeptid bereits abgespalten wurde, handeln. Dass es bei diesem Wachstumsversuch teilweise zur Abspaltung des Signalpeptids kam, verglichen mit dem Wachstumsversuch unter dem Einsatz des T7-Systems (König, 2008), könnte an der Verwendung eines anderen *E. coli*-Stammes liegen. Ob es ansonsten zu einer Anreicherung des Fusionsproteins in der Zellmembran und/oder im Periplasma kam, blieb ungeklärt. Jedoch ist eine solche Anreicherung auf das enorme Wachstumsdefizit und letztendlich auf die Schädigung des Zwischenwirtes zurückzuführen.

Bei *E. coli* handelt es sich um einen sehr gut erforschten und leicht kultivierbaren Mikroorganismus. Weiterhin ist er genetisch gut zugänglich und wird daher bei gentechnologischen Verfahren zur Gewinnung von Proteinen eingesetzt. Nachteilig ist jedoch bei dieser Gattung, dass die gebildeten Proteine oft nicht in die Umgebung ausgeschleust werden (Meyer *et al*., 1988). In der industriellen Anwendung erfolgt die Herstellung heterologer Proteine daher meistens innerhalb der Zelle von *E. coli* (Sørensen und Mortensen, 2005; Graumann *et al*., 2006). *E. coli* und alle anderen Gram-negativen Bakterien zeichnen sich in ihrem Zellwandaufbau durch eine Doppelmembran aus. Deshalb müssen für die Sekretion zwei Hürden genommen werden: zum einen die Cytoplasmamembran und zum anderen die äußere Membran. Eine hohe Sekretion ist aus *E. coli* nicht unmöglich, nur generell eher problematisch (Choi und Lee, 2004).

Durch die Verwendung des Tet-Systems konnte diese Problematik jedoch umgangen werden. Gleichzeitig wurde durch diesen Wachstumsversuch die Funktionalität des auf zwei Vektoren basierenden Expressionssystems bestätigt, da es erst nach Induktion zur Produktion der jeweiligen Fusionsproteine kam bzw. eine potentiell minimale Basalexpression vor Induktion keinen nachteiligen Einfluss auf *E. coli* ausübte. Darauf aufbauend ist eine Sekretion der Fusionsproteine verbunden mit der Tatsache, dass der Zielorganismus *C. acetobutylicum* bzw. *C. sporogenes* einen Gram-positiven Zellwandaufbau besitzt, sehr wahrscheinlich.

Für eine Transformation, zunächst in *C. acetobutylicum*, war jedoch vorab eine *in vivo*-Methylierung der verschiedenen Plasmidkonstrukte notwendig, um die Plasmid-DNA aus *E. coli* vor einen Restriktionsabbau in *C. acetobutylicum* zu schützen (Mermelstein *et al*., 1993). Da der Methylierungsvektor pANS1 jedoch nicht mit den beiden Tet-System-Plasmiden (pMTL-P_tetO2-sp_crt und pANr2-P_help-tetR_F1) kompatibel ist, sollte das Φ3T I-Methyltransferase-Gen, welches ursprünglich aus dem *Bacillus subtilis* Phagen Φ3T I stammt (Tran-Betcke *et al*., 1986), zusätzlich in den Vektor pANr2-P_help-tetR_F1 kloniert werden. Dabei gestaltete sich dieser Klonierungsschritt als äußerst schwierig. Die einzelnen Versuchsansätze (3.3.4.1.-3.3.4.4.) wurden in Tabelle 30 noch einmal zusammengestellt.

Hierbei wurde zunächst über die Verwendung verschiedener Restriktionsschnittstellen und über einen Wechsel zu einem anderen *E. coli*-Stamm versucht, das Φ3T I-Methyltransferase-Gen in den Vektor pANr2-P_help-tetR_F1 zu klonieren. Nachdem ebenfalls der Einsatz eines „Type-One™ Restriction Inhibitors“ (siehe 3.3.4.2.) nicht den erhofften Erfolg brachte, wurde der Klonierungsschritt umgekehrt (siehe 3.3.4.3.). Aber auch hier war die gewünschte Klonierung nicht möglich, so dass sowohl das Gen der Φ3T I-Methyltransferase als auch das Gen des P_help-TetR-Repressors in den pDrive-Klonierungsvektor zwischenkloniert wurde. Durch die Verwendung dieses Klonierungsvektors ist ein effizienteres Schneiden der Restriktionsenzyme möglich, was bei PCR-Fragmenten nicht gewährleistet werden kann.

Die Klonierung des Φ3T I-Methyltransferase-Gens führte auch bei der Verwendung eines anderen Vektors, wie in diesem Fall des Klonierungsvektors pDrive, zu keinen positiven Klonen. Durch die hohe Kopienzahl des pDrive-Klonierungsvektors wird die potentiell toxische Wirkung der Φ3T I-Methyltransferase noch verstärkt. Bei Transformationsversuchen mit dem pANS1-Vektor wurden allgemein deutlich

geringere Transformationseffizienzen beobachtet, was die Vermutung einer gewissen Unverträglichkeit der Φ3T I-Methyltransferase gegenüber *E. coli* bestätigt.
Auch der Versuch einer gleichzeitigen Klonierung des β-Lactamase-Gens und der damit vermittelten Ampicillin-Resistenz scheiterte, obgleich durch den Aufbau eines zusätzlichen Selektionsdrucks eine leichtere Identifikation positiver Klone möglich ist.

Nachdem es schließlich doch gelang, zumindest die Sequenz des P_help-TetR-Repressors mutationsfrei in den Methylierungsvektor pANS1 zu klonieren, war das nächste Ziel die Transformation der pMTL-P_tetO2-sp-crt-Plasmidkonstrukte in *C. acetobuytlicum*. Hierbei führte auch nach mehrmaligen Wiederholungen lediglich die Transformation des Kontrollplasmids pMTL007 zur Koloniebildung, was zumindest für eine funktionierende Transformation sprach. In der Literatur ist nichts über eine Überproduktion der Crotonase bzw. entsprechend über eine potentiell schädigende Wirkung beschrieben, so dass das gebildete Fusionsprotein die mögliche Ursache sein könnte.
Zur Überprüfung dieser These wurde daher das Crotonase-Gen durch das Gen des Enterotoxins von *C. perfringens cpe* bzw. die verkürzte Form *cpeT* ausgetauscht. Dabei konnte ein Klon (*C. acetobutylicum* pMTL-P_tetO2-colA'_cpe) durch eine Kontroll-PCR (siehe Abb. 11) auf die Fusionssequenz als positiv bestätigt werden.
Ein entsprechendes Protein konnte dennoch nicht mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden. Daraufhin gelang es nicht mehr, diesen Klon erneut anzuziehen, so dass zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen wurde, dass der Stamm das Plasmid nicht mehr trug.
In einer weiteren Versuchsreihe sollte lediglich die Crotonase (ohne Signalpeptid-Fusion) überproduziert werden, um zum einen die Funktionalität des Tet-Systems in *C. acetobutylicum* zu überprüfen. Zum anderen sollte so der Ausschleusvorgang als mögliche Ursache für das Ausbleiben von Kolonien nach der Transformation bestätigt bzw. ausgeschlossen werden. Parallel dazu wurde versucht, mit der Chitinase (deren Signalsequenz *chi'* wurde bereits verwendet) eine Positivkontrolle für die Sekretion zu entwickeln. Die Transformation dieser Plasmide, wie auch das ohne Insert (pMTL-P_tetO2) zur Überprüfung, ob eine Überproduktion eine mögliche Ursache darstellt, führte zu keinen Kolonien. Nachdem jedoch die Transformation mit dem Kontrollvektor pMTL007 stets erfolgreich war, lag eine Vermutung darin, dass die Φ3T I-Methyltransferase (pANS1-P_help-tetR_F1) nicht funktionsfähig ist. Das

Ergebnis der darauffolgenden Sequenzierung zeigte erhebliche Mutationen im Gen der Φ3T I-Methyltransferase auf, so dass keine korrekte Sequenz mehr bestätigt werden konnte.

Die Klonierung des Repressorgens in den pANS1-Vektor erfolgte über die *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle, da diese nicht im Klonierungsvektor pDrive vorhanden ist und dieser als Zwischenklonierungsschritt nötig war. Das Φ3T I-Methyltransferase-Gen hat eine Größe von 1332 Bp, es wurde aber bei der Konstruktion des Methylierungsvektors die komplette *Bacillus* Phagensequenz von 2360 Bp kloniert. In einem Bereich davon ist auch die *Bgl*II-Schnittstelle lokalisiert. Bei der schrittweisen Klonierung des Methylierungsvektors wurden keine Angaben dazu gemacht, ob die komplette Phagensequenz für die Funktionalität der Φ3T I-Methyltransferase nötig ist (Noyer-Weidner *et al*., 1985; Mermelstein und Papoutsakis, 1993). Allgemein konnten in der Literatur keine Hinweise dazu gefunden werden.

Es zeigte sich jedoch, dass der Wechsel zu einer anderen Schnittstelle außerhalb des kritischen Bereichs zwar mittels Kolonie-PCR die richtige Bandengröße erbrachte, aber die Bande für die Φ3T I-Methyltransferase etwa 300 Bp größer als erwartet war. Da es noch zu weiteren Unstimmigkeiten kam, wurde schließlich der gesamte pANS1-Vektor sequenziert.

Das Resultat dieser Sequenzierung zeigte, dass die bis dato vorliegende Sequenz in einigen Bereichen nicht korrekt bzw. unvollständig war (siehe Abbildung 12).

Unabhängig davon führte der Einbau der Repressorsequenz unter der Kontrolle des Promoters P_*help* dennoch zu einer Veränderung im Gen der Φ3T I-Methyltransferase.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, das Repressorgen *tetR* unter der Kontrolle des Promoters P_*help* in die verschiedenen pMTL-P_tetO2-sp_crt-Plasmide zu klonieren. Da die Expression der Fusionsgene hierbei nur nach Zugabe des Induktors erfolgen kann, diente dieser Versuch lediglich der Überprüfung des Tet-Systems in *C. acetobutylicum*. Allerdings konnte während der dafür notwendigen Klonierungsarbeiten erneut die Problematik, wie bereits bei dem Methylierungsplasmid beschrieben, beobachtet werden. Diesmal kam es zu Veränderungen in den Genbereichen der Fusionsproteine.

Durch die Verwendung des sehr starken, konstitutiv aktiven Promoters P_*help* (Riedel *et al*., 2007) konnte eine starke *tetR*-Expression und damit verbunden ein für den

Zwischenwirt verträgliches Expressionssystem gewährleistet werden. Dennoch führt die Klonierung dieses Promoters zu ungewollten Veränderungen in entscheidenden Genbereichen, was eine Verwendung für die vorgesehenen Zwecke unmöglich macht. Bei weiteren Arbeiten, aufbauend auf diesem System, wäre also ein Wechsel des Promoters unumgänglich. Ein geeigneter Promoter sollte in jedem Fall konstitutiv aktiv und stark genug sein, dass eine ausreichende Produktion von TetR und damit verbunden eine entsprechende Repression im Zwischenwirt gewährleistet ist.

Zu diesem Zeitpunkt erschien eine Veröffentlichung, in der beschrieben wurde, wie der Stamm *C. acetobutylicum* DSM1731 dahingehend modifiziert werden konnte, dass er in der Lage war, mit unmethylierter DNA transformiert zu werden (Dong *et al*., 2010). Durch die Verwendung eines solchen Stammes könnten die Suche eines geeigneten Promoters und die dadurch bisher resultierenden Probleme bei der Klonierung bzw. die dabei entstandenen Mutationen in anderen Genbereichen vermieden werden. Zusätzlich kann so der Schritt der *in vivo*-Methylierung durch die Φ3T I-Methyltransferase eingespart werden. Dieser ist sonst aufgrund der in *C. acetobutylicum* vorhandenen Typ II-Restriktionsendonuklease Cac824I (Mermelstein *et al*., 1993) notwendig, da diese bei Transformationen in *C. acetobutylicum* Fremd-DNA abbaut. Das Gen CAC1502 kodiert putativ für die Typ II-Restriktionsendonuklease Cac824I (Dong *et al*., 2010). Neben CacI (Azeddoug *et al*., 1989) und CacII (Mermelstein *et al*., 1992) ist diese die dritte in Clostridien entdeckte Restriktionsendonuklease. Ein Ausschalten des Gens CAC1502 in dem Stamm *C. acetobutylicum* DSM1731 führte zum Verlust dieses Enzyms. Ebenso sollte der Stamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 generiert werden. Die Konstruktion dieser Mutante erfolgte durch Verwendung des „ClosTron™ Gene Knockout Systems“. Bei diesem System handelt es sich um eine speziell für Clostridien angepasste Methode zur gezielten Geninaktivierung und basiert auf einer Insertion eines Gruppe-II-Introns (Heap *et al*., 2007).

Eine Inaktivierung des CAC1502-Gens gelang durch die Integration des Gruppe-II-Introns an Position 365/366s (siehe 3.4.). Die daraus resultierende Mutante wurde *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 genannt und war in der Lage, unmethylierte DNA nach Transformation aufzunehmen. Dabei erwiesen sich die Transformationen als äußerst effizient. Nach Transformation der verschiedenen pMTL-P_tetO2-sp_crt pANr2-P_help-tetR_F1-Konstrukte (siehe 3.4.1.) in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2

kam es bei allen Transformationsansätzen zur Ausbildung eines dichten Bakterienrasens.

REBASE („The Restriction Enzyme dataBASE“, Roberts *et al*., 2007) prognostizierte für *C. acetobutylicum* ATCC 824 noch zwei weitere Restriktions-Modifikations-Systeme (RM-Systeme), das CAC824ORF3534P RM-System (Typ II) und das Cac824MrrP RM-System (Typ IV). In der Arbeit von Dong *et al*., 2010, konnte bei Transformationen in die konstruierte CAC1502::int2-Mutante SMB009 kein signifikanter Unterschied bei der Transformationseffizienz zwischen methylierter und unmethylierter DNA festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass das Typ II und Typ IV RM-System in *C. acetobutylicum* nicht funktionell sind. Durch Verwendung der in dieser Arbeit konstruierten Mutante *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 konnte dies bestätigt werden. Die Konstruktion dieser Mutante ermöglichte ein Umgehen der Problematik bei der Methylierung in Gegenwart des Promoters P_*help* und führte zu einer erfolgreichen Transformation der diversen pMTL-P_tetO2-sp_crt-Konstrukte (siehe 3.4.1.). Allgemein ermöglicht eine solche Mutante genetische Veränderungen mit unmethylierter DNA und kann so das Verständnis der Physiologie von Clostridien auf molekularer Ebene vorantreiben (Dong *et al*., 2010).

Mittels PCR konnte bestätigt werden, dass die verschiedenen pMTL-P_tetO2-sp_crt pANr2-P_help-tetR_F1-Konstrukte in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 erfolgreich transformiert werden konnten. Allerdings gelang es nicht in darauf folgenden Wachstumsversuchen, die Crotonase mittels Western-Blot-Analyse im Kulturüberstand nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde die Gesamt-RNA isoliert, um durch eine anschließende RT-PCR zu prüfen, ob ein entsprechendes Transkript gebildet wurde. Hierbei konnte aber lediglich ein Transkript für die Positivkontrolle (*catP*) detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt war über die Verwendung und die Funktionalität des Tet-Systems in Clostridien nichts beschrieben. Demzufolge ist eine potentielle Schleifenbildung zwischen den beiden *tet*-Operatorsequenzen tetO1 und tetO2, was eine entsprechende Transkriptbildung verhindern würde, nicht auszuschließen.

Daher wurde das Plasmid pMTL-P_tetO1 (siehe Abbildung 15) konstruiert, welches nur noch über die tetO1 Operatorstelle zwischen der -10- und -35-Region verfügt. Nach Fertigstellung der jeweiligen pMTL-P_tetO1-sp_crt-Plasmidkonstrukte (siehe Tabelle 31) wurden diese in *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 transformiert und die entsprechenden Transformanten auf das Vorhandensein des pMTL-PtetO1-sp_crt

geprüft und bestätigt. Für den Transkriptnachweis der Crotonase konnte aus den in Punkt 3.4.2.2. aufgeführten Klonen RNA isoliert und in eine RT-PCR eingesetzt werden. Dabei war es möglich, bei allen ein entsprechendes Transkript nachzuweisen.

In einer aktuellen Veröffentlichung wurde erstmals die Verwendung des Tet-Systems in *C. acetobutylicum* beschrieben (Dong *et al*., 2011). Hierbei beschränkt sich das Tet-System auf die Verwendung von nur einem Vektor, den Vektor pCm4. Dieser basiert auf dem *E. coli-C. acetobutylicum*-Schaukelvektor pIMP1 (Mermelstein *et al*., 1992), in den das Fragment der CAT-Expressions-Kassette (enthält den Promoter Pcm und das *cat*-Gen, welches für die Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert) aus dem pMTL007-Vektor (Heap *et al*., 2007) kloniert wurde. Die Wahl des Promoters für die Expression des Repressors *tetR* fiel auf den nativen, konstitutiv aktiven Promoter des Thiolase-Gens (Pthl) (Stim-Herndon *et al*., 1995). Dabei wurde die Minimalvariante miniPthl verwendet, bei der ein 84-Bp-Fragment zwischen dem Transkriptionsstartpunkt und der Ribosomenbindestelle (RBS) entfernt wurde, um die Ligation zusammen mit dem *tetR*-Gen zu erleichtern. Demnach könnte es sich bei diesem Promoter auch um eine geeignete Alternative zu dem, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, Promoter P_*help* handeln.
Des Weiteren wurde bei dem Vektor pCm4 der Promoter Pcm insofern modifiziert, dass schließlich fünf verschiedene Pcm-tetO-Konfigurationen erhalten wurden. Darunter waren Pcm-tetO1 und Pcm-tetO2, die tetO1 oder tetO2 zwischen der -35- und -10-Region enthielten, die zwei Basalpromotoren. Basierend auf Pcm-tetO1 wurde tetO2 stromabwärts der -10-Region zur Konstruktion von Pcm-tetO1/2 (tetO2 überlappt mit dem Transkriptionsstartpunkt) und Pcm-tetO1&2 (tetO2 nach dem Transkriptionsstartpunkt) eingebracht. Bei der letzten Variante Pcm-2tetO2 wurde Pcm-tetO2 zusätzlich stromaufwärts der -35-Region mit einer zweiten tetO2-Kopie versehen. Die resultierenden fünf Vektoren (pPcm-tetO1, pPcm-tetO2, pPcm-tetO1/2, pPcm-tetO1&2 und pPcm-2tetO2) wurden auf das Vorliegen einer Chloramphenicolresistenz getestet. Nur bei pPcm-tetO1 konnte eine entsprechende Resistenz beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Konfiguration (-35-Region)-(tetO1)-(-10-Region) die Funktion des Promoters Pcm nicht zerstört.
Interessanterweise führt der Austausch von tetO1 in Pcm-tetO1 mit tetO2 (Pcm-tetO2) zur Inaktivierung des Promoters. Dies könnte erklären, warum Pcm-2tetO2, bei dem es sich um ein Pcm-tetO2-Derivat handelt, ebenfalls die Promoteraktivität verliert. Des

Weiteren könnte dies auch ein Grund dafür sein, dass bei den beiden anderen tetO1-Derivaten (Pcm-tetO1/2 und Pcm-tetO1&2) durch das zusätzliche tetO2 die Promoterfunktion inaktiviert wird. Dabei könnte es möglicherweise sein, dass das tetO2 in Pcm mit der RNA-Polymerase in *C. acetobutylicum* nicht kompatibel ist. Auch könnte die Transkription durch ein unbekanntes Wirtsprotein inhibiert werden. Demzufolge übt das tetO2 einen negativen Effekt auf die Promoteraktivität aus.
Jedoch wurde für andere tetO2-haltige Promotoren, wie beispielsweise P_{myc1}tetO in *Mycobacterium tuberculosis* (Ehrt *et al*., 2005) und $P_{LtetO-1}$ in *E. coli* (Lutz und Bujard, 1997), das beschriebene Phänomen nicht beobachtet. In einer aktuellen Veröffentlichung konnte die Verwendbarkeit des Tet-Systems auch in *C. difficile* nachgewiesen werden. Dabei besteht das induzierbare System aus einem Paar divergenter Promotoren, P_{tetR} und P_{tet}, mit jeweils einer überlappenden *tet*-Operatorsequenz. Allerdings wurden hierbei keine Angaben über die genaue Operatorsequenz gemacht. Dagegen konnte im Rahmen dieser Arbeit unabhängig, durch den Nachweis eines entsprechenden Crotonase-Transkriptes, die von Dong oben beschriebene Konfiguration (-35-Region)-(tetO1)-(-10-Region) als funktionell bestätigt werden. Der durch tetO2 verursachte Effekt könnte demzufolge Promoter- und/oder wirtsspezifisch sein.

Da der Nachweis eines Transkripts für die Crotonase erfolgreich war, wurden mit *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL-P_tetO1-sp_crt und dem Wildtyp Wachstumsversuche auf MES-Medium durchgeführt. Das Wachstum erfolgte diesmal auf MES-Medium, da in vorangegangenen Wachstumsversuchen mit dem Klon *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX das Toxin CPE nur dann im Überstand durch Western-Blot-Analysen detektiert werden konnte, sofern das Wachstum auf MES-Medium erfolgte und nicht auf CGM. (Ob ein bzw. welches Medienbestandteil hierfür ursächlich sein könnte, blieb allerdings ungeklärt.)
Der Wachstumsverlauf zeigte, verglichen mit dem Wildtyp und dem Wachstumsversuch mit *E. coli* XL1-Blue MRF' (pANr2-P_help-tetR_F1) und den diversen pMTL-P_tetO2-sp_crt-Konstrukten nach Induktion (siehe Abbildung 18), keine Wachstumsdefizite durch die diversen pMTL-P_tetO1-sp_crt-Konstrukte auf.
Im direkten Vergleich mit dem Wildtyp war lediglich eine längere „lag“-Phase zu beobachten. Dies ist jedoch abhängig davon, in welchem Stadium des Wachstums sich die entsprechende Vorkultur beim Animpfen befand. Zum Nachweis der

Crotonase im Überstand wurden über den gesamten Wachstumsverlauf Proben entnommen. Es war jedoch auch hierbei nicht möglich, das Reporterprotein mittels Western-Blot-Analyse zu detektieren.

Die Sekretion der Fusionsproteine sollte auf Grund des Gram-positiven Zellwandaufbaus, im Gegensatz zu der bereits beschriebenen Problematik in *E. coli*, bei *C. acetobutylicum* möglich sein. Gerade wegen seines Zellwandaufbaus wird auch *Bacillus subtilis*, der Modellorganismus Gram-positiver Bakterien, für die Überproduktion heterologer Proteine eingesetzt. *B. brevis* ist dagegen weniger untersucht als *B. subtilis*, aber ein ebenso interessanter Kandidat. Heterolog produzierte Proteine werden direkt in das Medium sezerniert und sind in der Regel korrekt gefaltet, löslich und biologisch aktiv (Terpe, 2006). Aber auch hier wird ständig an der Optimierung der Proteinsekretion gearbeitet. So konnte bereits eine effizientere Proteinsekretion durch Anheften der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) an den N-Terminus (Kajino *et al*., 1999) oder durch zwei zusätzliche Arginine im N-terminalen Bereich verbunden mit mehreren Leucinen im hydrophoben Bereich der Signalpeptide (Sagiya *et al*. 1994) erreicht werden.

Generell besitzen Signalpeptide drei unterschiedliche Domänen. Die N-terminale Domäne enthält eine Reihe positiv geladener Aminosäuren, gefolgt von einer zentralen hydrophoben H-Domäne und der darauf folgenden C-Domäne mit dem Erkennungssignal für die Schnittstelle der Signalpeptidase (von Heijne, 1990). Dabei sind die Signalpeptide Gram-positiver Bakterien durchschnittlich im Mittelwert mit 30 Aminosäuren länger als die Gram-negativer mit 23 Aminosäuren (Choo und Ranganathan, 2008). Obwohl in der Literatur mittlerweile zahlreiche Modifikationen an Signalpeptiden zur Optimierung der heterologen Proteinsekretion beschrieben sind, gibt es keine Garantie dafür, dass das für ein bestimmtes Protein entwickelte System ebenso für ein anderes Protein funktionell ist (Nijland und Kuipers, 2008). Dies konnte auch bei einem systematischen Auswahlverfahren aller Signalpeptide aus *B. subtilis* auf ihr Sekretionspotential hin bestätigt werden. Hierbei wurde hervorgehoben, wie wichtig die Verwendung eines individuell optimierten Signalpeptides für jedes heterologe Protein ist (Brockmeier *et al*., 2006).

Dementsprechend könnten die verwendeten Signalpeptide in dieser Arbeit, trotz des *in silico*-Auswahlverfahrens durch das internetbasierte Programm SignalP 3.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/), zu ineffizient für die Sekretion der Crotonase bzw. des CPE sein.

Da sowohl die Crotonase als auch das CPE nativ nicht ausgeschleust werden, besteht die Möglichkeit, dass auf Grund einer vorzeitigen Reifung bzw. Faltung des Fusionsproteins dieses nicht mehr prozessiert und exportiert werden kann. Um dem entgegen zu wirken, sind in der Literatur einige Lösungsansätze zu finden, welche auf die Verwendung von Chaperonen zurückgreifen. Diese sind nicht nur für die rechtzeitige Faltung, sondern auch in einigen Fällen für die Freisetzung von der Plasmamembran nach der Translokation verantwortlich (Sarvas *et al*., 2004; Shinde und Inouye, 2000).

Um die Sekretion der Crotonase zu ermöglichen, wurde in einem neuen Versuchansatz auf die Verwendung der Pre- und Pro-Sequenz einer *Staphylococcus hyicus*-Lipase zurückgegriffen. Kouwen *et al*. konnten zeigen, dass die Kombination aus dem Pro^{lip}-Peptid mit dem Lipase-Signalpeptid zu einer wesentlich erfolgreicheren Sekretion der Alkalischen Phosphatase (PhoA) aus *E. coli* in *B. subtilis* führt und dass das Pre^{lip} effizienter als das ursprüngliche Signalpeptid von PhoA ist. Das Pre-Peptid fungiert hierbei als Signalpeptid und das Pro-Peptid übernimmt die Rolle eines Chaperons. Es ist bereits beschrieben, dass diese Kombination als ein generell in Gram-positiven Bakterien sehr effektives Sekretionssignal agieren kann (Meens *et al*., 1997; Gotz *et al*., 1998; Sandgathe *et al*., 2003).

Demzufolge wurde das Plasmid pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc (3.5.1.) konstruiert und erfolgreich in *C. acetobutylicum* transformiert (3.5.2). Bei der darauffolgenden Western-Blot-Analyse zur Überprüfung, ob die Crotonase im Überstand, in der Cytoplasma- oder Membranfraktion nachweisbar ist, konnte nach der Immunfärbung nur die Positivkontrolle detektiert werden. Ebenso führte die Funktionskontrolle der Pre-Pro-Sequenz in *E. coli* zu keinem Erfolg.

Es wurde bei der Konstruktion des pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc-Plasmids der schwache *bdhA*-Promoter gewählt, da unter Berücksichtigung der bisherigen Signalpeptid-Crotonase-Fusionen von einer geringen Verträglichkeit für den Zwischenwirt *E. coli* ausgegangen wurde. Dementgegen kam es nach Transformation in *E. coli* zur Ausbildung eines Bakterienrasens. Allerdings könnte die Promoteraktivität für die Expression zu gering gewesen sein, so dass dieser Promoter durch den starken, konstitutiv aktiven Promoter P_*thlA* ausgetauscht wurde. Das resultierende Plasmidkonstrukt wurde pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc genannt.

Nach Transformation in den Zwischenwirt konnten lediglich insgesamt zehn Klone auf vier Selektivagarplatten identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass durch den

stärkeren Promoter und die damit erhöhte Expression das resultierende Fusionsprotein ab einer gewissen Menge erneut zu Wachstumsdefiziten im Zwischenwirt *E. coli* führt. Es war dennoch möglich, positive Klone durch eine Sequenzierung zu bestätigen und diese wiederum erfolgreich in *C. acetobutylicum* zu transformieren.
Zur Überprüfung des *thlA*-Promoters und dem gleichzeitigen Nachweis, ob für die Crotonase ein entsprechendes Transkript gebildet wurde, erfolgte eine RT-PCR auf die isolierte RNA. Dabei konnte das Transkript für die Crotonase in *C. acetobutylicum* pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc detektiert werden (siehe Abbildung 22). Mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie sollte eine Anreicherung der Crotonase erfolgen, um diese anschließend durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse nachzuweisen. Nach der Silberfärbung konnte jedoch in keinem Eluat eine Bande detektiert werden, lediglich die Positivkontrolle war deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 23). Das gleiche Resultat wurde auch bei dem Immunblot erhalten.

Es konnte gezeigt werden, dass Probleme beim Nachweis von Proteinen durch einen Western-Blot auf die verwendeten Puffer zurückzuführen waren. Allerdings kann für den Verlauf dieser Arbeit eine solche Ursache ausgeschlossen werden, da einerseits die Crotonase zu Beginn in *E. coli*-Versuchen detektiert werden konnte und andererseits es stets möglich war, die verschiedenen Positivkontrollen nachzuweisen. Des Weiteren war es nicht möglich, nach einer SDS-PAGE durch Färbung eine entsprechende Bande zu erhalten.

Für die Crotonase konnte mittels RT-PCR, sowohl bei *C. acetobutylicum* pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc (3.5.5.) als auch bei *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 pMTL- mit verschiedenen P_tetO1-sp_crt-Konstrukten (siehe 3.4.2.2.), ein entsprechendes Transkript bestätigt werden. Allgemein konnte neben der Überprüfung des Kulturüberstandes auch bei der Untersuchung der Cytoplasma- und Zellmembranfraktion, im Gegensatz zu den Experimenten mit *E. coli* (siehe 3.3.3.3.), kein Nachweis für die Crotonase erbracht werden. Auf Grund dessen wird aktuell davon ausgegangen, dass die Ursache für diese Problematik möglicherweise bei der Translation zu suchen bzw. zu finden ist.
Die Initiation der Translation ist der Schlüsselschritt für die Proteinsynthese. In der Mehrzahl aller Fälle ist dies der limitierende und einflussreichste Schritt des gesamten

Prozesses (Malys und McCarthy, 2011). An diesem komplexen und stark regulierten Prozess sind sowohl RNA als auch Proteine mit beteiligt. Die einzige variable Komponente bei der Initiation der Translation ist die mRNA (Laursen *et al*., 2005). Hierbei bestimmen die Sequenz und die Struktur der mRNA über die Wechselwirkung mit dem Translationsapparat die Effizienz und die Häufigkeit der Translation.
Sekundärstrukturen im Bereich der Ribosomenbindungsstelle (RBS) auf der mRNA können die Proteinsynthese hemmen (Grundy und Henkin, 2006). Jedoch konnten bei den in dieser Arbeit verwendeten Signalpeptiden, über das internetbasierte Programm „Mfold“ (http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold), keine hinderlichen Strukturen im Bereich der RBS identifiziert werden.
Weiterhin konnte gezeigt werden, dass RNA-bindende Proteine in der Lage sind, durch unterschiedliche Mechanismen die Initiation der Translation zu verhindern (Babitzke *et al*., 2009). Grundsätzlich spielten aber eine Reihe von Faktoren eine Rolle bei der Initiation der Translation. Die Frage, ob und welche im Gegensatz zu *E. coli* bei *C. acetobutylicum* ursächlich für eine potentielle Inhibierung der Translation sind, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt offen.

Da Clostridien generell genetisch unterschiedlich zugänglich sind, wurde in einem weiteren Ansatz versucht, die Funktionalität der Plasmidkonstrukte pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc, pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc und pMTL-P_tetO1-pec_crt (pANr2-P_help-tetR-F1) in *C. sporogenes* zu überprüfen (siehe 3.5.). Dabei konnte mittels einer PCR die Konjugation dieser Plasmide in *C. sporogenes* als erfolgreich bestätigt werden. Durch eine SDS-PAGE sollte untersucht werden, ob die Crotonase im Kulturüberstand, in der Cytoplasma- und/oder in der Zellmembranfraktion detektierbar ist. Die anschließende Coomassie-Färbung zeigte Proteine sowohl in der Cytoplasmafraktion als auch in der Zellmembranfraktion. Dagegen konnte im Kulturüberstand für keinen Klon ein Protein nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24). Ob zumindest eine entsprechende Bande für die Crotonase in den anderen beiden Fraktionen vorlag, konnte an Hand der Auftrennung dieses Gels nicht ausgemacht werden. Daher wurde dies in einer anschließenden Western-Blot-Analyse überprüft. Aber auch hier konnte weder im Kulturüberstand noch in der Cytoplasma- oder Membranfraktion die Crotonase detektiert werden.
Ob hier, wie bereits bei *C. acetobutylicum* beobachtet wurde (3.4.2.2. und 3.5.5.), zumindest ein entsprechendes Transkript nachweisbar ist, sollte eine RT-PCR zeigen.

Das Ergebnis dieser führte zwar zu Banden, welche aber nicht der erwarteten Größe entsprachen. Dies führte zu dem Schluss, dass es sich hierbei um unspezifisch amplifizierte Fragmente handeln muss.
Durch eine „plasmid recovery“ in *E. coli* sollte eine anschließende Sequenzierung klären, ob es bei der Konjugation zu Sequenzveränderungen in den jeweiligen Plasmidkonstrukten kam. Jegliche Transformationsversuche blieben jedoch ohne Erfolg bzw. Klone, die nach zehn Tagen Inkubation entstanden, erwiesen sich als nicht positiv.

Auch der Wechsel zu einem anderen *Clostridium* brachte nicht den gewünschten Erfolg. Nach wie vor war es nicht möglich, die Crotonase bzw. das CPE auszuschleusen. Informationen über die Protein-Sekretion in Gram-positiven Bakterien beschränken sich immer noch im Wesentlichen auf den Modell-Organismus *B. subtilis*. Unter den Clostridien wurde vom physiologischen Standpunkt aus *C. acetobutylicum* bisher am intensivsten untersucht. Bei einer genomischen Analyse des Proteinsekretionssystems wurde festgestellt, dass dieser im Gegensatz zu *B. subtilis* weder über einen Twin-Arginin-Translokationsweg (Tat) noch über einen ABC-Transporter verfügt (Desvaux *et al*., 2005). Dagegen zeigte sich auch, dass der Sec-Translokationsweg der primär genutzte Weg in *C. acetobutylicum* ist. Für *C. difficile* konnte kürzlich sogar ein zweites, paralleles Sec-System identifiziert werden (Fagan und Fairweather, 2011). Eine erfolgreiche Produktion und Sekretion von heterologen Proteinen wurden bereits in der Literatur beschrieben (Barbé *et al*., 2005). Allerdings war bei einigen Ansätzen auch hier zu beobachten, dass eine schädliche Wirkung ausgeübt wurde und es zu Wachstumsdefiziten kam (Mingardon *et al*., 2011; Chanal *et al*., 2011). Dabei ist erneut hervorzuheben, dass für jedes Vorgehen das jeweilige heterologe Protein spezifisch für eine erfolgreiche Sekretion modifiziert werden muss.
Die mangelnde Verfügbarkeit an Informationen über *C. sporogenes* führte in der Vergangenheit bei Arbeiten mit diesem Organismus immer wieder zu Problemen. Bei der Planung von Experimenten konnte lediglich auf die wenigen, bis dahin vorliegenden Daten zurückgegriffen werden. Auf Grund dessen wurden für die jeweiligen Versuche andere nahe verwandte Organismen als Ausgangspunkt herangezogen. Dies ist jedoch nur bedingt möglich, da die Übertragbarkeit von einem Organismus zum anderen *per se* nicht gewährleistet ist. Daher konnten für die im

Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ergebnisse der Experimente keine durch Literatur belegbaren Erklärungen gefunden werden.

Deshalb wird aktuell die Sequenzierung des *C. sporogenes*-Genoms vorgenommen. Die anschließende Annotation wird dann nähere Einblicke in den Organismus ermöglichen, so dass beispielsweise für die Produktion und Sekretion von CPE bzw. allgemein von heterologen Proteinen ein geeignetes Signalpeptid identifiziert werden kann.

Bei den voranschreitenden Forschungsentwicklungen in der Molekularbiologie konnte insbesondere bei Clostridien in den vergangenen Jahren ein rascher Fortschritt bezüglich der genetischen Zugänglichkeit und Modifikation erzielt werden. Auf Grund dieser zahlreichen, neugewonnenen Erkenntnisse eignen sich Clostridien besonders gut für den Einsatz in der Krebstherapie. Bis zur Anwendung in der Praxis ist es daher nur noch eine Frage der Zeit.

5 a. Zusammenfassung

1.) Die Problematik einer schädigenden Wirkung durch die Überproduktion der verschiedenen Signalpeptid-Crotonase-Fusionsproteine im Zwischenwirt *E. coli* konnte durch die Verwendung des Tet-Systems, basierend auf zwei Vektoren (pMTL-P_tetO2-sp_crt und pANr2-P_help-tetR_F1) umgangen werden. Durch dieses Expressions-System konnte eine ausreichende Repression vermittelt werden, so dass es zu keinem Wachstumsdefizit kam. Eine Überproduktion der Crotonase nach Induktion konnte mittels Western-Blot-Analysen überprüft werden. Bei den getesteten Stämmen waren einige in der Lage, zumindest teilweise das Fusionsprotein auszuschleusen und auch das Signalpeptid abzuspalten. Die Anreicherung der Fusionsproteine in der Zellmembran führte jedoch zur Schädigung des Zwischenwirtes. Allerdings konnte durch diesen Wachstumsversuch die Funktionalität des Tet-Systems bestätigt werden.

2.) Für die Transformation der jeweiligen Plasmidkonstrukte in *C. acetobutylicum* war es zunächst notwendig, das Gen der Φ3T I-Methyltransferase zusätzlich in das Repressorplasmid pANr2-P_help-tetR_F1 einzubringen. Zunächst gelang es scheinbar, durch Umkehrung des Klonierungsschrittes, das Gen des TetR-Repressors zusammen mit dem Promoter P_*help* in den pANS1-Vektor zu klonieren. Darauf aufbauend wurden zahlreiche Transformationsversuche unternommen, bei denen u. a. das Tet-System überprüft und die Entwicklung einer Positivkontrolle für die Sekretion angestrebt wurde. Es zeigte sich jedoch, dass die Klonierung des Promoters P_*help* zu Veränderungen in anderen Genbereichen führt, u. a. in dem Φ3T I-Methyltransferase-Gen, das die für eine Transformation notwendige Methylierung verhindert.

3.) Durch das „ClosTron^{TM} Gene Knockout Systems“ war die Inaktivierung von CAC1502, welches putativ für die Typ II-Restriktionsendonuklease Cac824I kodiert, möglich. Die resultierende Mutante *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 war in der Lage, unmethylierte Plasmid-DNA aufzunehmen. Somit konnte die Problematik der Methylierung umgangen werden.

4.) Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung des Tet-Systems in *C. acetobutylicum* die Konfiguration, bei der das tetO1 zwischen der -35- und -10-Region liegt, für diesen Organismus funktionell ist. Dadurch war es möglich, für die Crotonase ein entsprechendes Transkript nachzuweisen.

5.) Durch den Einsatz der Pre- und Pro-Sequenz einer *Staphylococcus hyicus*-Lipase konnte in dem Zwischenwirt *E. coli* eine vom Promoter abhängige Verträglichkeit beobachtet werden. Unter der Kontrolle des *thlA*-Promoters war es möglich, in *C. acetobutylicum* für die Crotonase die zugehörige mRNA zu detektieren. Allerdings war auch hierbei ein Nachweis des Reporterproteins mittels Western-Blot-Analyse nicht erfolgreich.

6.) Die Plasmidkonstrukte pMTL-P_tetO1-pec_crt, pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc und pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc konnten erfolgreich in *C. sporogenes* transformiert werden. Dagegen war es jedoch nicht möglich, die Crotonase beziehungsweise ein entsprechendes Transkript nachzuweisen.

5 b. Summary

1.) Overexpression of the crotonase fused to the different signal peptides severely decreased the viability of the *E. coli* expression host. However, set up of the *tet*-system based on the usage of two vectors (pMTL-P_tetO2-sp_crt and pANr2-P_help-tetR_F1) was shown to circumvent this problem because of the tight repression of the target gene in the absence of inducer. Moreover, after induction crotonase could be detected in the cytosolic fraction as well as in the supernatant. Nevertheless, accumulation of this enzyme in the cytosol severely impaired host viability.

2.) Due to different methylation patterns between *E. coli* and *C. acetobutylicum*, the gene for the clostridial Φ3T I methyltransferase was subcloned into the repressor plasmid pANr-P_help-tetR_F1 to allow *C. acetobutylicum*-specific methylation pattern of the plasmids for their subsequent efficient transformation into this organism. Also, the successful introduction of the *tetR*-repressor gene into the vector pANS1 was performed. Several transformation experiments were conducted to test among others the Tet system and to develop a positive control for protein secretion. In the end, it turned out that cloning of the strong constitutive P_*help* promoter led to disruption of several genes, and thereby inhibiting the essential methylation.

3.) In order to circumvent the problem of the inefficient DNA transformation, the gene CAC1502, putatively encoding the type II restriction endonuclease Cac824I in *C. acetobutylicum*, was inactivated using the "ClosTron™ gene knockout system". The resulting knock-out mutant *C. acetobutylicum* CAC1502::int2 was shown to be indeed able to uptake the unmethylated plasmid DNA.

4.) It was shown that for the implication of the Tet system in *C. acetobutylicum* localization of the tetO1 operator between -35 and -10 region of the promoter region is crucial, as confirmed for the crotonase gene.

5.) As an alternative for previously chosen signal peptides, the combination of pre- and prosequence of the *Staphyloccus hyicus* lipase gene were introduced. Utilization increased tolerance of *E. coli* for expression in a promoter strength dependent manner. Crotonase transcript could be detected when the gene was expressed under the control of the P_*thlA* promoter, however, the attempts to detect the corresponding protein by Western blot analysis recurrently failed.

6.) The constructs pMTL-P_tet01-pec_crt, pMTL-P_bdhA-PrePro-crt-Tadc and pMTL-P_thlA-PrePro-crt-Tadc were successfully transformed in *C. sporogenes*. Nevertheless, it was not possible to detect either the crotonase itself or the corresponding transcript.

6. Literaturverzeichnis

Azeddoug, H., J. Hubert und G. Reysset. 1989. Characterization of a methyl-specific restriction system in *Clostridium acetobutylicum* strain N1-4081. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**: 323-326.

Babitzke, P., C. S. Baker und T. Romeo. 2009. Regulation of translation initiation by RNA binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 27-44.

Bachmann, B. J. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, 8. Auflage. *Microbiol. Rev.* **54**: 130-197.

Balganesh, T. S., L. Reiners, R. Lauster, M. Noyer-Weidner, K. Wilke und T. A. Trautner. 1987. Construction and use of chimeric SPR/Φ3T DNA methyltransferases in the definition of sequence recognizing enzyme regions. *EMBO J.* **6**: 3543-3549.

Barbé, S., L. Van Mellaert, J. Theys, N. Geukens, E. Lammertyn, P. Lambin und J. Anné. 2005. Secretory production of biologically active rat interleukin-2 by *Clostridium acetobutylicum* DSM792 as a tool for anti-tumor treatment. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**: 67-73.

Barbé, S., L. Van Mellaert und J. Anné. 2006. The use of clostridial spores for cancer treatment. *J. Appl. Microbiol.* **101**: 571-578.

Berlyn, M. K., K. B. Low und K. E. Rand. 1996. Linkage map of *Escherichia coli* K-12. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger (Hrsg.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, 9. Auflage. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC (USA): 1715-1816.

Bertram, J., und P. Dürre. 1989. Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 551-557.

Bertram, J., M. Strätz und P. Dürre. 1991. Natural transfer of conjugative transposon Tn*916* between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **173**: 443-448.

Bertram, R., und W. Hillen. 2008. The application of Tet repressor in prokaryotic gene regulation and expression. *Microb. Biotechnol.* **1**: 2-16.

Blum, H., H. Beier und H. J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

Böhringer, M. 2002. Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zur Regulation des Gens der Acetacetat-Decarboxylase von *Clostridium acetobutylicum*. Dissertation, Universität Ulm.

Box, G. 2006. Herstellung rekombinanter Clostridien Sporen zur Therapie nekrotisierender Tumore. Dissertation, Universität Ulm.

Brockmeier, U., M. Caspers, R. Freudl, A. Jockwer, T. Noll und T. Eggert. 2006. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerfull strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive Bacteria. *J. Mol. Biol.* **362**: 393-402.

Chakrabarti, G., X. Zhou und B. A. McClane. 2003. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* **71**: 4260-4270.

Chakrabarti, G., und B. A. McClane. 2005. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell. Microbiol.* **7**: 129-146.

Chamberlain, J. S., R. A. Gibbs, J. E. Rainer, P. N. Nguyen und C. Thomas. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl. Acids Res.* **16**: 11141-11156.

Chanal, A., F. Mingardon, M. Bauzan, C. Tardif und H.-P. Fierobe. 2011. Scaffoldin modules serving as "cargo" domains to promote the secretion of heterologous cellulosomal cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 6277-6280.

Cherepanov, P. P., und W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.

Choi, J. H., und S. Y. Lee. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 625-635.

Choo, K. H., und S. Ranganathan. 2008. Flanking signal and mature peptide residues influence signal peptide cleavage. *BMC Bioinformatics* **9**: S15.

Chumchalová, J., und J. Smarda. 2003. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiol.* **48**: 111-115.

Clark, W. H. 1991. Tumor progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer* **64**: 631-644.

Colombo, F., L. Barzon, E. Franchin, M. Pacenti, V. Pinna, D. Danieli, M. Zanusso und G. Palu. 2005. Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results. *Cancer Gene Ther.* **12**: 835-848.

Connell, H. 1935. The study and treatment of cancer byproteolytic enzymes. *Can. Med. Assoc. J.* **33**: 364-370.

Cousineau, B., D. Smith, S. Lawrence-Cavanagh, J. E. Mueller, J. Yang, D. Mills, D. Manias, G. Dunny, A. M. Lambowitz und M. Belfort. 1998. Retrohoming of a bacterial group II intron: mobility via complete reverse splicing, independent of homologous DNA recombination. *Cell* **94**: 451-462.

Czeczulin, J. R., P. C. Hanna und B. A. McClane. 1993. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61**: 3429-3439.

Dang, L. H., C. Bettegowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler und B. Vogelstein. 2001. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 15155-15160.

Desvaux, M., A. Khan, A. Scott-Tucker, R. R. Chaudhuri, M. J. Pallen und I. R. Henderson. 2005. Genomic analysis of the protein secretion systems in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biochim. Biophy. Acta* **1745**: 223-253.

Dong, H., Y. Zhang, Z. Dai und Y. Li. 2010. Engineering *Clostridium* strain to accept unmethylated DNA. *PLoS One* **5**: e9038.

Dong, H., W. Tao, Y. Zhang und Y. Li. 2011. Development of an anhydrotetracycline-inducible gene expression system for solvent-producing *Clostridium acetobutylicum*: A usefull tool for strain engineering. *Metab. Eng.* doi: 10.1016/j.ymben.2011.10.004

Dower, W. J., J. F. Miller und C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.

Duncan, C. L. 1973. Time of enterotoxin formation and release during sporulation of *Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.* **113**: 932-936.

Ebihara, C., M. Kondoh, N. Hasuike, M. Harada, H. Mizuguchi, Y. Horiguchi, M. Fujii und Y. Watanabe. 2006. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**: 255-260.

Ehrt, S., X. V. Guo, C. M. Hickey, M. Ryou, M. Monteleone, L. W. Riley und D. Schnappinger. 2005. Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucl. Acids Res.* **33**: e21.

Fagan, R. P., und N. F. Fairweather. 2011. *Clostridium difficile* has two parallel and essential Sec secretion systems. *J. Biol. Chem.* **286**: 27483-27493.

Fox, M. E., M. J. Lemmon, M. L. Mauchline, T. O. Davis, A. J. Giaccia, N. P., Minton und J. M. Brown. 1996. Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: *in vitro* activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Ther.* **3**: 173-178.

Frazier, C. L., J. San Fillippo, A. M. Lambowitz und D. A. Mills. 2003. Genetic manipulation of *Lactococcus lactis* by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection. *Appl. Environ. Microbiol*. **69**: 1121-1128.

Fujimori, M., J. Amano und S. Taniguchi. 2003. The genus *Bifidobacterium* for cancer gene therapy. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **5**: 200-203.

Fujita, K., J. Katahira, Y. Horiguchi, N. Sonoda, M. Furuse und S. Tsukita. 2000. *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett.* **476**: 258- 261.

Fujiwara, T., D. W. Cai, R. N. Georges, T. Mukhopadhyay, E. A. Grimm und J. A. Roth. 1994. Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**: 1458-1462.

Gao, Z., X. Xu, B. McClane, Q. Zeng, B. Litkouhi, W. R. Welch, R. S. Berkowitz, S. C. Mok und E. I. Garner. 2011. C-terminus of *Clostridium perfringens* enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to Taxol and Carboplatin. *Clin. Cancer Res.* **17**: 1065-1074.

Gericke, D., und K. Engelbart. 1964. Oncolysis by clostridia. II. Experiments on a tumor spectrum with a variety of clostridia in combination with heavy metal. *Cancer Res*. **24**: 217-221.

Gherna, R. L. 1994. Culture preservation. In: Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood und N. R. Krieg (Hrsg.), Method for general and molecular bacteriology. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC (USA): 278-292.

Götz, F., H. M. Verheij und R. Rosenstein. 1998. Staphylococcus lipases: molecular characterisation, secretion, and processing. *Chem. Phys. Lipids* **93**: 15-25.

Graumann, K., und A. Premstaller. 2006. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *J. Biotechnol.* **1**: 164-186.

Grundy, F. J. und T. M. Henkin. 2006. From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 329-338.

Hanna, P. C., E. U. Wieckowski, T. A. Mietzner und B. A. McClane. 1992. Mapping of functional regions of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* **60**: 2110-2114.

Heap, J. T., O. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter und N. P. Minton. 2007. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium. J. Microbiol. Methods* **70**: 452-464.

Heap, J. T., O. Pennington, S. T. Cartman und N. P. Minton. 2009. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J. Microbiol. Methods* **78**: 79-85.

Heap, J. T., S. A. Kuehne, M. Ehsaan, S. T. Cartman, C. M. Cooksley, J. C. Scott und N. P. Minton. 2010. The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J. Microbiol. Methods* **80**: 49-55.

von Heijne, G. 1990a. Protein targeting signals. *Curr. Opin. Cell Biol*. **2**: 604-608.

von Heijne, G. 1990b. The signal peptide. *J. Membr. Biol.* **115**: 195-201.

Heppner F., und J. R. Moese. 1966. Oncolysis of malignant gliomas through apathogenic clostridia (strain „M 55“). *Zentralbl. Neurochir.* **27**: 183-192.

Heppner F., und J. R. Moese. 1978. The liquefaction (oncolysis) of malignant gliomas by a non pathogenic *Clostridium*. *Acta. Neurochir.* **42**: 123-125.

Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen und L. R. Pease. 1998. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.

Horiguchi, Y., T. Akai und G. Sakaguchi. 1987. Isolation and function of a *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment. *Infect. Immun.* **55**: 2912-2915.

Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plamids. *Gene* **96**: 23-28.

Jain, R. K. 1989. Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J. Cancer Inst.* **81**: 570-576.

Jain, R. K., und N. S. Forbes. 2001. Can engineered bacteria help control cancer? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:14748-14750.

Jemal, A., M. M. Center, C. DeSantis und E. Ward. 2010. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**: 1893-1907.

Jemal, A., R. Siegel, J. Xu und E. Ward. 2010. Cancer statistics: 2010. *CA Cancer J. Clin.* **60**: 277-300.

Johnson, E. A. 1999. Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 551-575.

Kajino, T., C. Ohto, M. Muramatsu, S. Obata, S. Udaka, Y. Yamada und H. Takahashi. 1999. A protein disulfid isomerase gene expression system that increases the extracellular productivity of *Bacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**: 638-642.

Kakutani, H., M. Kondoh, R. Saeki, M. Fujii, Y. Watanabe, H. Mizuguchi und K. Yagi. 2010. Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75**: 213-217.

Kamionka, A., M. Sehnal, O. Scholz und W. Hillen. 2004. Independent regulation of two genes in *Escherichia coli* by tetracyclines and Tet repressor variants. *J. Bacteriol.* **186**: 4399-4401.

Katahira, J., N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda und N. Sugimoto. 1997. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Cell Biol.* **136**: 1239-1247.

Katahira, J., H. Sugiyama, N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda und N. Sugimoto. 1997. *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**: 26652-26658.

Kimura, J., H. Abe, S. Kamitani, H. Toshima, A. Fukui, M. Miyake, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto und Y. Horiguchi. 2010. *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J. Biol. Chem.* **285**: 401-408.

Kokai-Kun, J. F., und B. A. McClane. 1997. Deletion analysis of the *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* **65**: 1014-1022.

Kokai-Kun, J. F., K. Benton, E. U. Wieckowski und B. A. McClane. 1999. Identification of a *Clostridium perfringens* enterotoxin region required for large complex formation and cytotoxicity by random mutagenesis. *Infect. Immun.* **67**: 5634-5641.

König, S. M. 2008. Analyse clostridieller Signalsequenzen für den Export von Proteinen in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Ulm.

Kominsky, S. L., M. Vali, D. Korz, T. G. Gabig, S. A. Weitzman, P. Argani und S. Sukumar. 2004. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am. J. Pathol.* **164**: 1627-1633.

Kominsky, S. L., B. Tyler, J. Sosnowski, K. Brady, M. Doucet, D. Nell, J. G. Smedley, B. McClane, H. Brem und S. Sukumar. 2007. *Clostridium perfringens* enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res.* **67**: 7977-7982.

Kondoh, M., A. Takahashi, M. Fujii, K. Yagi und Y. Watanabe. 2005. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol. Pharmacol.* **67**: 749-756.

Kondoh, M., A. Takahashi, M. Fujii, K. Yagi und Y. Watanabe. 2006. A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 1783-1789.

Koop-Hoolihan, L. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* **101**: 229-238.

Kouwen, T. R. H. M., A. K. Nielsen, E. L. Denham, J. Y. F. Dubois, R. Dorenbos, M. D. Rasmussen, W. J. Quax, R. Freudl und J. M. van Dijl. 2010. Contributions of the pre- and pro-regions of a *Staphylococcus hyicus* lipase to secretion of a heterologous protein by *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 659-669.

Kreitman, R. J. 2001. Chimeric fusion proteins – *Pseudomonas* exotoxins-based. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2**: 1282-1293.

Kreitman, R. J. 2001. Toxin-labeled monoclonal antibodies. *Curr. Pharm. Biotechnol*. **2**: 313-325.

Lämmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 690-685.

Lambin, P., J. Theys, W. Landuyt, P. Rijken, A. van der Kogel, E. van der Schueren, R. Hodgkiss, J. Fowler, S. Nuyts, E. de Bruijn, L. van Mellaert und J. Anné. 1998. Colonisation of *Clostridium* in the body is restricted to hypoxic and necrotic areas of tumours. *Anaerobe* **4**: 183-188.

Lancaster, L. E., W. Wintermeyer und M. V. Rodnina. 2007. Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells Mol. Dis.* **38**: 15-18.

Laursen, B. S., H. P. Sørensen, K. K. Mortensen und H. U. Sperling-Petersen. 2005. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 101-123.

Levin, R., und R. W. Brauer. 1951. The biuret reaction for the determination of proteins; an improved reagent and its application. *J. Lab. Clin. Med.* **38**: 474-480.

Lemmon, M. J., P. van Zijl, M. E. Fox, M. L. Mauchline, A. J. Giaccia, N. P. Minton und J. M. Brown. 1997. Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Ther*. **4**: 791-796.

Liu, S. C., N. P. Minton, A. J. Giaccia und J. M. Brown. 2002. Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. *Gene Ther.* **9**: 291-296.

Long, H., C. D. Crean, W. H. Lee, O. W. Cummings und T. G. Gabig. 2001. Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res.* **61**: 7878-7881.

Luo, X., Z. Li, S. Lin, T. Le, M. Ittensohn, D. Bermudes, J. D. Runyab, S. Y. Shen, J. Chen, I. C. King und L. M. Zheng. 2001. Antitumor effect of VNP20009, an attenuated *Salmonella*, in murine tumor models. *Oncol. Res.* **12**: 501-508.

Lutz, R. und H. Bujard. 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* **25**: 1203-1210.

Malmgren, R. A., und C. C. Flanigren. 1955. Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer Res.* **15**: 473-478.

Malys, N., und J. E. G. McCarthy. 2011. Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 991-1003.

McClane, B. A. 2001. The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial tight junctions. *Toxicon* **39**: 1781-1791.

McDonel, J. L. und F. Dorner. 1986. The role of toxins in bacterial pathogenesis. In: **Dorner F. und J. Drews.** (Hrsg.). Pharmacology of bacterial toxins. Pergamon Press, Oxford, England; New York, USA.

Meens, J., M. Herbort, M. Klein und R. Freudl. 1997. Use of the pre-pro part of *Staphylococcus hyicus* lipase as a carrier for secretion of *Escherichia coli* outer membrane protein A (OmpA) prevents proteolytic degradation of OmpA by cell-associated protease(s) in two different Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2814-2820.

Mengesha, A., L. Dubois, R. K. Chiu, K. Paesmans, B. G., P. Lambin und J. Theys. 2007. Potential and limitations of bacterial-mediated cancer therapy. *Front. Biosci.* **12**: 3880-3891.

Meisohle, D. 2010. Entwicklung rekombinanter *Clostridium sporogenes*-Sporen als neuer Therapieansatz für die Behandlung nekrotisierender Tumore. Dissertation, Universität Ulm.

Mermelstein, L. D., N. Welker, G. Bennett und E. T. Papoutsakis. 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Nat. Biotechnol.* **10**: 190-195.

Mermelstein, L. D., und E. T. Papoutsakis. 1993. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage Φ 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1077-1081.

Meyer, T. F., R. Halter und J. Pohlner. 1988. Process for the genetic production of proteins by using of Gram-negative host cells. *WIPO* Pub. No.: WO/1988/000238.

Michl, P., M. Buchholz, M. Rolke, S. Kunsch, M. Lohr, B. McClane, S. Tsukita, G. Leder, G. Adler und T. M. Gress. 2001. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterol.* **121**: 678-684.

Michl, P., und T. M. Gress. 2004. Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. *Curr. Cancer Drug Targets* **4**: 689-702.

Milner, H. W., N. S. Lawrence und C. S. French. 1950. Colloidal dispersion of chloroplast material. *Science* **111**: 633-634.

Mingardon, F., A. Chanal, C. Tardif und H.-P. Fierobe. 2011. The issue of secretion in heterologous expression of *Clostridium cellulolyticum* cellulase-encoding genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 2831-2838.

Minton, N. P., M. L. Mauchline, M. J. Lemmon, J. K. Brehm, M. Fox, N. P. Michael, A. Giaccia und J. M. Brown. 1995. Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 357-364.

Minton, N. P. 2003. Clostridia in cancer therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**: 237-242.

Moese, J. R., und G. Moese. 1959. Oncolysis experiments with apathogenic, anaerobic spore suspensions on the Ehrlich tumor of the mouse. *Z. Krebsforsch.* **63**: 63-74.

Moese, J. R., und G. Moese. 1964. Oncolysis by clostridia. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other non-pathogenic clostridia against the Ehrlich carcinoma. *Cancer Res.* **24**: 212-216.

Monot, F., J. R. Martin, H. Petitdemange und R. Gay. 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1318 – 1324.

Nakamura, T., T. Sasaki, M. Fujimori, K. Yazawa, Y. Kano, J. Amano und S. Taniguchi. 2002. Cloned cytosine deaminase gene expression of *Bifidobacterium longum* and application to enzyme/pro-drug therapy of hypoxic solid tumors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2362-2366.

Nemunaitis, J., C. Cunningham, N. Senzer, J. Kuhn, J. Cramm, C. Litz, R. Cavagnolo, A. Cahill, C. Clairmont und M. Sznol. 2003. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *Escherichia coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther.* **10**: 737-744.

Nijland, R., und O. P. Kuipers. 2008. Optimization of protein secretion by *Bacillus subtilis*. *Recent Pat. Biotechnol.* **2**: 79-87.

Nowotny, A. 1985. Antitumour effects of endotoxins. In: Berry, L. J. (Hrsg.) Handbook of endotoxins, cellular biology of endotoxin. *Elsevier Science Inc.* New York (USA): 389-448.

Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, B. Pawlek, U. Günthert und T. A. Trautner. 1983. Restriction and modification in *Bacillus subtilis*: DNA methylation potential of the related bacteriophages Z, SPR, SPβ, Φ3T, and ρ11. *J. Virol.* **46**: 446-453.

Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, J. Kupsch, M. Bergbauer und T. A. Trautner. 1985. DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: structural relatedness and gene expression. *Gene* **35**: 143-150.

Ogata, M., V. K. Chaudhary, I. Pastan und D. J. FitzGerald. 1990. Processing of *Pseudomonas* exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. *J. Biol. Chem.* **265:** 20678-20685.

Okabayashi T., I. Nishimori, A. Nishioka, K. Yamashita, T. Sugimoto, K. Dabanaka, H. Maeda, T. Kohsaki, Y. Ogawa, M. Kobayashi, S. Onishi und K. Hanazaki. 2008. Long-term effects of multimodal treatment for patients with resectable carcinoma of the pancreas. *Oncol. Reports* **20**: 651-656.

Orth, P., D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger und W. Hinrichs. 2000. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor±operator system. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 215-219.

Parato, K. A., D. Senger, P. A. Forsyth und J. C. Bell. 2005. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 965-976.

Parker, R., H. Plummber, C. Siebenmann und M. Chapman. 1947. Effect of histolyticus infection and toxin on transplantable mouse tumors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **66**: 461-465.

Pernecky, S. J., und M. J. Coon. 1996. N-terminal modifications that alter P_{450} membrane targeting and function. *Methods Enzymol.* **272**: 25-34.

Purdy, D., T. A. T. O'Keeffe, M. Elmore, M. Herbert, A. McLeod, M. Bokori-Brown, A. Ostrowski und N. P. Minton. 2002. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. *Mol. Microbiol.* **46**: 439-452.

Ramesh, H. 2010. Management of pancreatic cancer: current status and future directions. *Indian J. Surg.* **72**: 285-289.

Riedel C. U., I. R. Monk, P. G. Casey, D. Morrissey, G. C. O`Sullivan, M. Tangney, C. Hill und C. G. M. Gahan. 2007. Improved luciferase tagging system for *Listeria monocytogenes* allows real-time monitoring *in vivo* and *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3091-3094.

Roberts, R., T. Vince, J. Posfai und D. Macelis. 2007. REBASE-enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucl. Acids Res.* **35**: 269-270.

Robertson, S. L., J. G. Smedley III und B. A. McClane. 2010. Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* **78**: 505-517.

Rood, J. I. 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 333-360.

Ryan, R. M., J. Green und C. E. Lewis. 2006. Use of bacteria in anti-cancer therapies. *BioEssays* **28**: 84-94.

Saeki, R., M. Kondoh, H. Kakutani, S. Tsunoda, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Tsutsumi, Y. Horiguchi und K. Yagi. 2009. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol. Pharmacol.* **76**: 918-926.

Saeki, R., M. Kondoh, H. Kakutani, K. Matsuhisa, A. Takahashi, H. Suzuki, Y. Kakamu, A. Watari und K. Yagi. 2010. A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **334**: 576-582.

Sagiya, Y., H. Yamagata und S. Udaka. Direct high-level secretion into the culture medium of tuna growth hormone in a biologically active form by *Bacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **42**: 358-363.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

Sambrook, J., und D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (USA).

Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Santin, A. D., S. Bellone, E. R. Siegel, J. K. McKenney, M. Thomas, J. J. Roman, A. Burnett, G. Tognon, E. Bandiera und S. Pecorelli. 2007. Overexpression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. *Clin. Cancer Res.* **13**: 3339-3346.

Santin, A. D., S. Bellone, M. Marizzoni, M. Palmieri, E. R. Siegel, J. K. McKenney, L. Hennings, F. Comper, E. Bandiera und S. Pecorelli. 2007. Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). *Cancer* **109**:1312-1322.

Sarvas, M., C. R. Harwood, S. Bron und J. M. van Dijl. 2004. Post-trans-locational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**: 311-327.

Seth, P. 2005. Vector-mediated cancer gene therapy: an overview. *Cancer Biol.* **4**: 512-517.

Shinde, U., und M. Inouye. 2000. Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**: 35-44.

Skerra, A. 1994. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**: 131-135.

Smedley, J. G. III, F. A. Uzal und B. A. McClane. 2007. Identification of a prepore large-complex in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* **75**: 2381-2390.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. **150**: 76-85.

Soini, Y. 2005. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumors. *Histopathol.* **46**: 551-560.

Sonoda, N., M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi und S. Tsukita. 1999. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* **147**: 195-204.

Sørensen, H. P., und K. K. Mortensen. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli. J. Biotechnol.* **115**: 113-128.

Sterman, D. H., J. Treat, L. A. Litzky, K. M. Amin, L. Coonrod, K. Molnar-Kimber, A. Recio, L. Knox, J. M. Wilson, S. M. Albelda und L. R. Kaiser. 1998. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum. Gene Ther.* **9**:1083-1092.

Stim-Herndon, K. P., D. J. Petersen und G. N. Bennett. 1995. Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **154**: 81-85.

Tamime, A. Y. 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. *Eur. J.Clin. Nutr.* **56**: 2-15.

Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 211-222.

Theys, J., S. Nuyts, W. Landuyt, L. van Mellaert, C. Dillen, M. Böhringer, P. Dürre, P. Lambin und J. Anné. 1999. Stable *Escherichia coli-Clostridium acetobutylicum* shuttle vector for secretion of murine tumor necrosis factor α. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4295-4300.

Theys, J., A. W. Landuyt, S. Nuyts, S., L. van Mellaert, L., P. Lambin und J. Anné. 2001. *Clostridium* as a tumor-specific delivery system of therapeutic proteins. *Cancer Detect Prev.* **25**: 548-557.

Theys, J., W. Landuyt, S. Nuyts, L. van Mellaert, E. Bosmans, A. Rijnders, W. Van Den Bogaert, A. van Oosterom, J. Anné und P. Lambin. 2001. Improvement of *Clostridium* tumour targeting vectors evaluated in rat rhabdomyosarcomas. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **30**: 37-41.

Theys, J., W. Landuyt, S. Nuyts, L. Van Mellaert, A. van Oosterom, P. Lambin und J. Anné. 2001. Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered *Clostridium acetobutylicum*. *Cancer Gene Ther.* **8**: 294-297.

Theys, J., O. Pennington, L. Dubois, G. Anlezark, T. Vaughan, A. Mengesha, W. Landuyt, J. Anné, P. J. Burke, P. Dürre, B. G. Wouters, N. P. Minton und P. Lambin. 2006. Repeated cycles of *Clostridium*-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects *in vivo. Br. J. Cancer* **95**: 1212-1219.

Thiele, E. H., R. N. Arison und G. E. Boxer. 1964. Oncolysis by clostridia. III. Effects of clostridia and chemotherapeutic agents on rodent tumors. *Cancer Res.* **24**: 222-233.

Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

Tran-Betcke, A., B. Behrens, M. Noyer-Weidner und T. A. Trautner. 1986. DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: comparison of their nucleotide sequences. *Gene* **42**: 89-96.

Trédan, O., C. M. Galmarini, K. Patel und I. F. Tannock. 2007. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**: 1441-1454.

Vaupel, P., und L. Harrison. 2004. Tumour hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* **9**: 4-9.

Walther, W., S. Petkov, O N. Kuvardina, J. Aumann, D. Kobelt, I. Fichtner, M. Lemm, J. Piontek, I. E. Blasig, U. Stein und P. M. Schlag. 2011. Novel *Clostridium perfringens* enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther.* doi:10.1038/gt.2011.136.

Weber, K., und M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.

Wei, M. Q., K. A. O. Ellem, P. Dunn, M. J. West, C. X. Bai und B. Vogelstein. 2007. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours. *Eur. J. Cancer*, **43**: 490-496.

Wei, M. Q., A. Mengesha, D. Good und J. Anné. 2008. Bacterial targeted tumour therapy - dawn of a new era. *Cancer Lett.* **259**: 16-27.

Wei, Q. M., R. Ren, D. Good und J. Anné. 2008. Clostridial spores as live “Trojan horse“ vectors for cancer gene therapy: comparison with viral delivery systems. *Genet. Vaccines Ther.* **6**: 8.

Weiss, B., A. Jacquemin-Sablon, T. R. Live, G. C., Fareed und C. C. Richardson. 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **243**: 4543-4555.

Wensche, M. 2009. Etablierung von *B. subtilis* als Zwischenwirt im Rahmen des Projektes zur Behandlung nekrotisierender Tumore mit clostridiellen Endosporen. Diplomarbeit, Universität Ulm.

Whipple, A. O. 1949. An evaluation of radical surgery for carcinoma of pancreatic and ampullary region. *Annu. Intern. Med.* **31**: 624-627.

Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph und E. T. Papoutsakis. 1988. Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2717-2722.

Winkler, L., C. Gehring, A. Wenzel, S. L. Müller, C. Piehl, G. Krause, I. E. Blasig und J. Piontek. 2009. Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J. Biol. Chem.* **284**: 18863-18872.

Woodman, M. E. 2008. Direct PCR of intact bacteria (Colony PCR). In: Coico, R., T. Kowalik, J. Quarles, B. Stevenson und R. Taylor (Hrsg.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (USA). *Curr. Prot. Microbiol.* **9**: A.3D.1-A.3D.6.

Yao, Q., S. Cao, C. Li, A. Mengesha, P. Low, B. Kong, S. Dai und M. Wei. 2010. Turn a diarrhoe toxin into a receptor-mediated therapy for a plethora of CLDN-4-overexpressing cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**: 413-419.

Yuan, X., X. Lin, G. Manorek, I. Kanatani, H. L. Cheung, M. G. Rosenblum und S. B. Howell. 2009. Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors. *Mol. Cancer Ther.* **8**: 1906-1915.

Yuan, X., X. Lin, G. Manorek und S. B. Howell. 2011. Challenges associated with the targeted delivery of gelonin to claudin-expressing cancer cells with the use of activatable cell penetrating peptides to enhance potency. *BMC Cancer* **11**: 61.

Zhang, W. W., X. Fang, W. Mazur, B. A. French, R. N. Georges und J. A. Roth. 1994. High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther.* **1**: 5-13.

7. Anhang

7.1. Weitere Informationsquellen

Im Folgenden eine Übersicht über weitere genutzte Informationsquellen[1] und Computerprogramme:

Internetadressen:

- DKFZ-Homepage: http://www.dkfz.de
  (Deutsches Krebsforschungszentrum)
- WHO-Homepage: http://www.who.int/cancer/en/
  (Weltgesundheitsorganisation)
- TargeTron® Design Site: http://www.sigma-genosys.com/targetron/
- Center for Biological Sequence Analysis: http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
- „The mfold Web Server“-Homepage: http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold

[1]Stand: 01.12.2011

Programme:

- „Clone Manager 7“ Scientifical Educational Software; Cary (USA)
- „Enhance Map Draw” Scientifical Educational Software; Cary (USA)
- „SigmaPlot 8.0“ SYSTAT Software; Erkrath

Curriculum vitae

5. Mai 1983	Geburt in Ludwigshafen
1989-1993	Besuch der Grundschule Seckenheim, Mannheim
1993-2002	Besuch der Integrierten Gesamtschule Mannheim-Herzogenried (IGMH), Mannheim
2002	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
10/2002-09/2003	Studium der Lebensmittelchemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
11/2003-12/2007	Studium der Biologie an der Universität Ulm Vordiplom 2005 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Virologie, Genetik und Philosophie
01/2008-09/2008	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm mit dem Thema „Analyse clostridieller Signalsequenzen für den Export von Proteinen in *Escherichia coli*“
10/2008	Erlangen des akademischen Grades „Diplom-Biologin“
10/2008	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Universität Ulm mit dem Thema „Entwicklung eines Therapieansatzes zur Behandlung des Pankreaskarzinoms mit rekombinanten clostridiellen Endosporen“

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Dürre möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine Anregungen und Ratschläge, sowie die Ermöglichung eines selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens bedanken. Vielen Dank für eine schöne Zeit am Institut in einer tollen Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Eikmanns danke ich für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit.

Ein spezieller Dank geht an B.Zi-Fee für den zauberhaften Zusammenhalt und eine stetig prompte Wunscherfüllung; Tobi(ber) für eine außergewöhnliche Kommunikation und den gemeinsamen Arbeiten an der Anaerobenkammer; Major Nettie für den Austausch von Buchempfehlungen; Kärin für die Organisation lustiger „PubQuiz“-Abende und das Gegenlesen dieser Arbeit; Otto, der mich jeden Tag auf`s Neue das Kleine Einmaleins lehrte; sowie Thiemo, DomDom, Flitschi und Mone für die gute und lustige Zusammenarbeit.

Mit einem herzlichen „En Garde!“ danke ich Katriiin für die vielen Freizeitbeschäftigungen schon während des Studiums und den Anregungen zum Thema Signalpeptide.

Dankeschön auch an Mark, der mit mir viele Trainingseinheiten im Fitnesstudio verbrachte und für alles stets ein offenes Ohr hat.

Ein besonderer Dank gilt Hottie, die mir eine gute und wichtige Freundin geworden ist und mit der ich über die Laborarbeit hinaus viel unternommen habe.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Knuspi für die Aktivitäten auch außerhalb der Uni und für das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Ich hoffe unser nächster gemeinsamer Urlaub lässt nicht mehr lange auf sich warten!

Natürlich bedanke ich mich bei allen anderen ehemaligen und aktuellen Kollegen des Institutes für die Hilfsbereitschaft, sämtliche Tipps und Tricks im Laboralltag und ein ausgezeichnetes Arbeitsklima. Danke Euch allen!

Bei meinen Mekong-Box-Mädels möchte ich mich für den Abbau des gelegentlichen Laborfrustes bedanken.

All meinen Freunden gilt ein großes Dankeschön für die Abwechslung und den Ausgleich vom Laboralltag.

Danke auch an meine Oma, ich weiß Du wärst stolz auf mich.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Vater bedanken, der immer für mich da ist und mich lehrte, für jede Situation im Leben einen Spruch parat zu haben.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Ulm, den

_____

Sandra Mareike König