Entwicklung rekombinanter *Clostridium sporogenes*-Sporen als neuer Therapieansatz für die Behandlung nekrotisierender Tumore

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

Vorgelegt von
Dominik Meisohle
aus Überlingen

Ulm, Juli 2010

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

Amtierende Dekan:	Prof. Dr. A. Groß
Erstgutachter:	Prof. Dr. P. Dürre
Zweitgutachter:	Prof. Dr. B. Eikmanns

Tag der Promotion:

Für meine Familie

Wissen ist der einzige Rohstoff, der sich bei Gebrauch vermehrt.

Albert Einstein

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 4

2.1. Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Materialien und Geräte 4

2.1.1. Chemikalien 4
2.1.2. Spezielle Chemikalien 4
2.1.3. Enzyme 5
2.1.4. Antikörper 6
2.1.5. Molekularbiologische Hilfsmittel 6
2.1.6. Geräte 8

2.2. Puffer und Lösungen 10

2.2.1. Puffer für die Agarosegelelektrophorese 10
2.2.2. Puffer für die Herstellung kaltkompetenter *E. coli* 10
2.2.3. Waschpuffer für Zellen 11
2.2.4. Lösungen für Plasmidpräparationen 11
2.2.5. Lösungen und Puffer für die Elektroporation von *C. sporogenes* 12
2.2.6. Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung 13
2.2.7. Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE 14
2.2.8. Puffer und Lösungen für „Westernblots“ und Immunfärbungen 15
2.2.9. Lösungen für die Anfärbung von Proteinen 16

2.3. Bakterienstämme, Plasmide und Oligodesoxynukleotide 17

2.3.1. Verwendete Bakterienstämme 17
2.3.2. Oligodesoxynukleotide 18
2.3.3. Plasmide 26

2.4. Zellanzucht 31

2.4.1. Nährmedien für *E. coli* 31
2.4.2. Nährmedien für *C. sporogenes* 32
2.4.3. Medienzusätze 33
2.4.4. Anzuchtbedingungen 34
2.4.5. Bestimmung von Wachstumsparametern 35
2.4.6. Stammhaltung 35
2.4.7. Sporenpräparationen 36
2.4.8. Plasmid „clearing“ 36

2.5. Arbeiten mit DNA 36

2.5.1. Vorbereitung von Lösungen, Geräten und Materialien 36
2.5.2. Plasmidpräparation aus *E. coli* 37
2.5.2.1. Plasmidpräparation nach Birnboim et al. (1979, mod.) 37
2.5.2.2. Plasmidpräparation nach Zhou et al. (1990) 38
2.5.2.3. „GFX™ Micro Plasmid Prep-Kit“ 38
2.5.2.4. „E.N.Z.A.® Plasmid Miniprep Kit I“ 39
2.5.2.5. „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ 39
2.5.3. Fällung und Reinigung von DNA 40
2.5.3.1. Ethanolfällung 40
2.5.3.2 Isopropanolfällung 41
2.5.3.3. Phenol-Chloroform-Extraktion 41
2.5.3.4. Mikrokonzentratoren 42
2.5.3.5. „DNA Clean & Concentrator™-5 Kit“ 42
2.5.3.6. „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” 42
2.5.3.7. „UltraClean™ 15 DNA Purification Kit“ 43
2.5.4. Präparation chromosomaler DNA 44
2.5.4.1. „AquaGenomic™ Solution for isolation and purification of genomic DNA“ 44
2.5.5. Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese 45
2.5.6. Bestimmung der Konzentration von DNA 46
2.5.7. Enzymatische Modifikation von DNA 46
2.5.7.1. Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen 46
2.5.7.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (Sambrook und Russell, 2001, mod.) 48
2.5.7.3. Ligation von DNA-Fragmenten (Weiss et al., 1968) 48
2.5.7.4. „QIAGEN PCR Cloning Kit” (QIAGEN GmbH; Hilden) 49
2.5.7.4. Sequenzierung von DNA (Sanger et al., 1977) 49
2.5.8. Amplifikation von DNA mittels der Polymerasekettenreaktion 50
2.5.8.1. Die Standard-PCR 50
2.5.8.2. Die Gradienten-PCR 52
2.5.8.3. „PureTaq Ready-to-Go PCR-beads-Kit“ 52
2.5.8.4. „FailSafe™ Enzyme Mix“ 53

2.6. Arbeiten mit RNA 54

2.6.1. Vorbereitung von Lösungen, Geräten und Materialien 54
2.6.2. Präparation von RNA aus *C. sporogenes* 54

2.6.3. DNase-Verdau 55
2.6.4. Ethanolfällung von RNA 55
2.6.5. Konzentrationsbestimmung von RNA 56
2.6.6. RT-PCR 56
2.6.7. Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese mit RNA 57

2.7. DNA-Transfer in Zellen 57

2.7.1. Herstellung kaltkompetenter *E. coli* (Inoue et al., 1990) 57
2.7.2. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* (Dower et al., 1988) 58
2.7.3. Herstellung schnellkompetenter *E. coli*-Zellen 58
2.7.4. Transformation kaltkompetenter *E. coli* 59
2.7.5. Elektrotransformation elektrokompetenter *E. coli* 60
2.7.6. X-Gal-Färbung zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone 61
2.7.7. Konjugation von *C. sporogenes* mit *E. coli* CA434 (Purdy et al., 2002) 62
2.7.8. Elektrotransformation von *C. sporogenes* (Oultram et al. 1988, mod.) 62
2.7.9. Elektrotransformation von *C. sporogenes* (Liu et al., 2002) 63

2.8. Arbeiten mit Proteinen 64

2.8.1. Herstellung von Zelllysaten 64
2.8.1.1. French® Pressure Cell-Press 64
2.8.1.2. Ribolyser™ Cell Disruptor 65
2.8.2. BCA-Proteinbestimmung 65
2.8.3. Mikrokonzentratorsäulen 66
2.8.4. Überexpression plasmidkodierter Proteine in *E. coli* 66
2.8.5. Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA 67
2.8.6. Isolation bakterieller Cytosol- und Membranproteine (Penecky und Coon, 1996, mod.) 68
2.8.7. Denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 69
2.8.7. „Semi-Dry-Western-Blot" (Towbin et al., 1979, mod.) 70
2.8.8. Immunfärbung von Proteinen 71
2.8.9. Anfärbung von Proteinen 72
2.8.9.1. Coomassie-Färbung ohne Methanol und Eisessig 72
2.8.9.2. Silberfärbung (Blum et al., 1987) 72

3. Experimente und Ergebnisse 74

3.1. Stand des Projektes zu Beginn dieser Arbeit 74

3.2. Zielsetzung dieser Arbeit 76

3.3. Versuche zur Etablierung eines asRNA-Systems zur Dämpfung der schädlichen CPE-Produktion in *E. coli* 77

3.3.1. Konstruktion eines T7-asRNA-Systems 77

3.3.2. Konstruktion eines Zwei-Vektor-Systems zur asRNA-Produktion..... 78

3.3.3. Modifikation des pDM1-Vektors zur Bildung stabilisierter asRNA..... 81

3.4. Identifizierung der schädlichen Wirkung der CPE-Bildung..... 81

3.4.1. Potentielle membranassoziierte Zielproteine für CPE 81

3.4.2. „Plasmid clearing“ des Klones *E- coli* XL1-Blue (p7BIG2TOX) und Transformationsexperimente mit p7BIG2TOX..... 82

3.4.3. Wachstumsversuche mit CPE- und Sp-CPE-Überexpressionsvektoren . 83

3.5. Alternative Zwischenwirte für kritische Klonierungsschritte..... 84

3.6. Etablierung des DNA-Transfers in *C. sporogenes* und Sequenzierung von pMTL007..... 86

3.7. Alternative Signalpeptide für die aktive Sekretion von CPE und CPE-T durch *C. sporogenes* 87

3.8. Konstruktion induzierbarer Promotoren.....100

3.8.1. Das TetR-Projekt.....100

3.8.2. Das T7-Projekt.....107

3.8.3. Das P_{bdhA}-Projekt.....111

3.8.4. Das *abrB310*-Projekt 114

3.9. Das P23-Projekt.....117

4. Diskussion 118

4.1. Tumortherapien mit viralen Vektoren **.....118**

4.2. Tumortherapie mit bakteriellen Vektoren 120

4.2.1. Clostridien in der Tumortherapie 120

4.2.1.1. Geschichtliches.....120

4.2.1.2. Die „Clostridial Directed Enzyme Prodrug/Drug Therapy“ (CDEPT) 121

4.2.1.2. Die „Clostridial Directed Toxin Therapy“ (CDTT) 123

4.2.2. Bifidobakterien in der Tumortherapie.....126

4.2.3. Salmonellen in der Tumortherapie.....127

4.2.4. Abschließende Gegenüberstellung und Bewertung der einzelnen Vektor-basierten Therapiemethoden.....128

4.3. Problemstellung des Projektes 130

4.3.1. Lösungsansatz 1: Spezifische asRNA 131

4.3.2. Lösungsansatz 2: Test alternativer Signalpeptidsequenzen 132

4.3.3. Lösungsansatz 3: Etablierung eines neuen Gram-positiven Zwischenwirtes für die Klonierungsvorhaben 134

4.3.4. Lösungsansatz 4: Identifizierung und Entwicklung neuer Promotoren ... 135

5a. Zusammenfassung 138

5b. Summary 140

6. Literaturverzeichnis 141

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
ATP	Adenosintriphosphat
B.	*Bacillus*
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
β	Beta
bzgl.	bezüglich
C	Cytosin; Kohlenstoff
c	centi, 10^{-2}
C.	*Clostridium*
°C	Grad Celsius
©	„copyright“, Recht auf Vervielfältigung
ca.	circa
Ca^{2+}	Calciumion
CDEPT	„Clostridial-Directed-Enzyme-Prodrug/Drug-Therapy“
CDTT	„Clostridial-Directed-Toxin-Therapy“
Cl^-	Chlorid
cm	Zentimeter
co.	Corporation
CPE	*Clostridium perfringens*-Enterotoxin
d	desoxy-
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
E.	*Escherichia*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	„et alii“; und andere

evtl.	eventuell
F	Farad
g	Gramm, Einheit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
G	Guanin, Glucose
GB	„Great Britain“; Großbritannien
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
H_2O	Bidestilliertes Wasser
Inc.	„Incorporated Company“; eingetragenes Unternehmen
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
k	Kilo- (10^3)
K	Kalium
KFE	Kolonie-formende Einheit
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KG	Kommanditgesellschaft
L	Liter
L.	*Lactococcus*
LB	Luria-Bertani
m	Meter, Milli- (10^{-3})
µ	Mikro- (10^{-6})
M	molar
min	Minute(n)
MKS	Multiple Klonierungsstelle
mol	Mol (6,023 * 10^{23} Teilchen)
N	Stickstoff, Normal
n	nano, 10^{-9}
Na^+	Natrium-Ion
NCBI	National Center for Biotechnology Information
O	Sauerstoff
OD_x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
Ω	Ohm, Einheit des elektrischen Widerstands

p	Plasmid
P	Phosphat
PCR	"Polymerase Chain Reaction"; Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+-Konzentration
®	"registered"; eingetragenes Warenzeichen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
s	Sekunde(n), sensitiv
SAP	„Shrimp Alkaline Phosphatase“
SDS	Sodiumdodecylsulfate; Natriumdodecylsulfat
sp	Signalpeptid
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymin, Trypton
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	„Terrific Broth“
TE	Tris-EDTA
™	„Trademark“; Warenzeichen
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit; Einheit; Umdrehungen
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
USA	„United States of America“; Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid
Y	„yeast“; Hefe
YT	„yeast tryptone“, Hefe und Trypton
z. T.	zum Teil
z. Z.	zur Zeit
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Krebs hat sich in den Industrienationen im Laufe der letzten Jahrzehnte zur häufigstens Todesursache für ältere Personen entwickelt (Jemal et al., 2007, 2008 und 2009). Trotz einiger Erfolge bei der Senkung der Mortalitätsraten für bestimmte Krebsarten (Lungen-, Prostata-, Darm-, und Brustkrebs) besteht dieser Sachverhalt weiter. Die Sterblichkeitsraten gingen hierbei bei Männern zw. 1990 und 2005 um 19,2 % und bei Frauen um 11,4 % zurück (Jemal et al., 2007, 2008 und 2009). Beim derzeitigen Stand der medizinischen Versorgung können zw. 30 und 40 % aller Krebspatienten geheilt werden. Laut dies bedeutet jedoch nur, dass diese ehemaligen Patienten fünf Jahre nach einer erfolgreichen Therapie noch keinen Rückfall hatten.

Täglich entstehen auch in einem gesunden Menschen eine große Zahl primärer Krebszellen. Diese werden im Regelfall schnell und effektiv von der zellulären Immunantwort (Natürliche Killerzellen, T-Lymphozyten) und zellulären Schutzmechanismen durch Einleitung der Apoptose (Programmierte Zelltod) beseitigt. Da das Auftreten maligner und benigner Tumore nachweislich in engem, aber nicht ausschließlichem Zusammenhang mit dem Lebensalter steht (mehr als 60 % aller Neuerkrankten sind älter als 60 Jahre), lassen diese körpereigenen Abwehrmechanismen bei gleichzeitig steigender Häufigkeit der Entartungen im Laufe der Zeit nach. Neben dem Alter spielt die Lebensführung (Ernährung, Alkohol- und Nikotinkonsum, usw.) zusammen mit einer evtl. vorhandenen genetischen Prevalenz eine bedeutende Rolle bei der Krankheitentstehung. Der Einfluss der Prevalenz für einige Krebsarten ist mitunter entweder aufgrund eines gehäuften Auftretens dieser Erkrankung innerhalb einer Familie oder anhand der Identifizierung bekannter und in dieser Hinsicht negativer Allele abschätzbar. Für die Mehrzahl der bisher ca. 100 bekannten Krebsarten ist dies jedoch bisher nicht möglich. Vermutlich sind bei diesen nicht einzelne Gene, sondern ein gewisses Muster vieler Allele für die Prevalenz verantwortlich. Die enorme Vielfalt möglicher Ursachen und die Unwissenheit bzgl. der zellulären Abläufe stellt die moderne Medizin vor ein schwerwiegendes Problem. Jede Therapieform kann nie nur die Ursache bekämpfen, sondern nur die Symptome in Form der entarteten Zellen und Tumore!

Wie im ersten Abschnitt erwähnt, könnten in den letzten Jahren Erfolge im Bereich der Krebsbehandlung erzielt werden. Intensive Forschungsbemühungen haben in den letzten Jahren eine große Zahl an Therapiemöglichkeiten eröffnet, so dass sich

die Heilungschancen erheblich verbessert haben. Besonderes Augenmerk muss aber auf die Früherkennung gelegt werden, da ein Patient so die größten Chancen auf eine Genesung erhält. Wird die Krankheit früh diagnostiziert, so lassen sich bisher Methoden aus drei verschiedenen Bereichen zu einer wirksamen Kombinationstherapie verknüpfen. Diese drei Eckpfeiler der Krebsbekämpfung sind die

chirurgische Entfernung des Tumors,
Behandlung mit Zytostatika (Chemotherapie),
Strahlentherapie.

Eine chirurgische Entfernung des Tumors und des umliegenden Körpergewebes hat die besten Heilungschancen, sofern keine Metastasen vorhanden sind und die Geschwulst gut zu erreichen ist. Sobald sich der Patient von der Operation erholt hat, erfolgt im Allgemeinen eine Chemotherapie und/oder Strahlentherapie.

Da Krebszellen meist sehr hohe Zellteilungsraten aufweisen können diese durch die systemische Gabe von Zytostatika im Rahmen einer Chemotherapie besonderst stark geschädigt werden. Im optimalen Fall führt dies zu einer Verkleinerung der Hauptgeschwulst und zur Inaktivierung aller Mikro- und Makrometastasen. Tumore können jedoch Resistenzen gegen diese Wirkstoffe entwickeln, so dass die Therapie abgebrochen oder auf andere Verbindungen umgeschwenkt werden muss. Zudem werden bei dieser Behandlung alle gesunden und schnell proliferienden Gewebe eines Organismus geschädigt. Dies verursacht schwere Nebenwirkungen wie z.B. gastrointestinalen Störungen, Nausea, Marasmus, Alopezie, Immundefizienz und die irreversible Schädigungen der spermatogenen Zellen. Im Extremfall können die Symptome direkt oder indirekt zum Tod führen, so dass diese Belastung nur aufgrund der ansonsten sicher letal verlaufenden und schmerzhaften Krankheit toleriert werden kann.

Die gezielte Schädigung von Geschwüren mit energiereicher Strahlung (Strahlentherapie) ergänzt meist die beiden anderen Behandlungsmethoden. Moderne Geräte ermöglichen es auch tief im Körperinneren liegende Tumore gezielt zu bestrahlen, ohne das gesunde Gewebe massiv zu schädigen. Trotzdem sind die Nebenwirkungen aufgrund der Strahlendosis sehr hoch und können bis hin zur Ausbildung neuer Tumore gehen. Zudem können nicht alle Tumore erreicht werden, und es kann auch hier zur Ausprägung von Resistenzen kommen.

Die großen Fortschritte der molekularen Biologie in den letzten Jahrzehnten ermöglichten es, neue Methoden oder zumindest deren Ansätze zu entwickeln.

Diese sollen die klassischen Therapien ergänzen und die Probleme der bisherigen Behandlungen, wie die Resistenzbildung und das Auftreten starker Nebenwirkungen, minimieren. Einige dieser Ansätze beinhalten die Verwendung von Bakterien, um Krebserkrankungen die durch die Standardmethoden nicht ausreichend therapiert werden können, zu bekämpfen. So sollen z.B. anaerobe Bakterien für die Therapie von Tumoren mit nekrotisierenden und hypoxischen Bereichen verwendet werden. Diese Zonen innerhalb der massiven und schnell wachsenden Geschwüre stellen den einzigen Bereich im menschlichen Körper dar, in dem anaerobe Organismen überleben und sich vermehren können. Eine gezielte Suche nach geeigneten Bakterien für die Besiedelung von Tumoren rückte u.a. die Spezies der Gattungen *Salmonella*, *Bifidobacterium* und *Clostridium* (Jain und Forbes, 2001) in den Fokus.

Ziel dieser Arbeit war ein für *Clostridium acetobutylicum* entwickeltes und auf dem potentiell therapeutisch wirksamen Protein *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) basierendes System zur Thearpie bestimmter Tumore auf *C. sporogenes* zu adaptieren und zu verbessern. Der Grund hierfür liegt in der unzureichenden Tumorbesiedelung des erstgenannten Organismus. *C. sporogenes* ist dagegen in der Lage Tumore effizient zu besiedeln. Ein detailliertes Schema dieses Vorhabens wird in Rahmen der Diskussion beschrieben.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Materialien und Geräte

2.1.1. Chemikalien

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden Chemikalien folgender Anbieter verwendet:

- GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
- Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
- Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
- GE Healthcare; München
- Invitrogen GmbH; Karlsruhe
- Merck KGaA; Darmstadt
- Otto Nordwald GmbH; Hamburg
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

2.1.2. Spezielle Chemikalien

Folgende chemische Verbindungen wurden für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Spezielle Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
dNTPs	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Aurintricarbonsäure	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
IPTG	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Oligodesoxynukleotide	Biomers.net GmbH; Ulm
Polyanetholsulfonsäure	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Polyethylenglykol 3350	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
ATP	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot

X-Gal	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe

Neben oben genannten Chemikalien wurden zudem verschiedene Antibiotika verwendet, die in der unten stehenden Tabelle 2 aufgelistet sind.

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	**Bezugsquelle**
Ampicillin	Roche Diagnostic GmbH; Mannheim
Chloramphenicol	Roche Diagnostic GmbH; Mannheim
Clarithromycin	Abbott Laboratories; Abbott Park, USA
Colistin Natriummethansulfonat	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Erythromycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Spectinomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Tetracyclin-HCl	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Thiamphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim

2.1.3. Enzyme

Ein Großteil der verwendeten Restriktionsendonukleasen wurde von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, bezogen. Von anderen Anbietern stammende Enzyme können der folgenden Auflistung (Tabelle 3) entnommen werden.

Tabelle 3: Restriktionsenzyme anderer Anbieter

Restriktionsenzym	**Bezugsquelle**
*Asi*SI	New England Biolabs GmbH; Schwalbach
*Fse*I	New England Biolabs GmbH; Schwalbach
*Pme*I	New England Biolabs GmbH; Schwalbach
*Pml*I	New England Biolabs GmbH; Schwalbach
*Sbf*I	New England Biolabs GmbH; Schwalbach
*Sgf*I	Promega GmbH; Mannheim
*Pci*I	New England Biolabs GmbH; Schwalbach

Neben diesen wurden zudem weitere Enzyme zur Modifikation von DNA-Fragmenten verwendet. Deren Bezeichnungen und Bezugsquellen sind in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Sonstige verwendete Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs GmbH; Schwalbach
High Fidelity-*Taq*-DNA-Polymerase	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Klenow-Fragment	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Lysozym	Fluka Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Powerscript DNA-Polymerase	PAN Biotech GmbH; Aidenbach
ReproFast DNA-Polymerase	Genaxxon Bioscience GmbH; Ulm
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
Taq- Polymerase E	Genaxxon Bioscience GmbH; Ulm

2.1.4. Antikörper

Für die Durchführung von Immunfärbungen wurden folgende Antikörper verwendet (Tabelle 4):

Tabelle 5: Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Polyclonal Goat Anti-CPE Immunoglobulins	Acris Antibodies GmbH; Hiddenhausen
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark; Glostrup, Dänemark

2.1.5. Molekularbiologische Hilfsmittel

Für Agarose-Gelelektrophoresen fanden ausschließlich die entsprechenden Produkte von Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Verwendung. Hierbei wurde der „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ als Größenstandard für dsDNA-Fragmente und als Ladepuffer die „6x Loading Dye Solution“ verwendet.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA und die Aufreinigung von DNA wurden folgende „Kits“ benutzt (Tabelle 6):

Tabelle 6: Plasmidpräparation und DNA-Reinigung

„Kit“	**Bezugsquelle**
DNA Clean & Concentrator™-5 Kit	Hiss Diagnostics GmbH; Freiburg
E.N.Z.A.® Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab Biotechnologie GmbH; Erlangen
GFX™ *Micro* Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg
UltraClean™ 15 DNA Purification Kit	MO BIG Laboratories; USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Hiss Diagnostics GmbH; Freiburg
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Hiss Diagnostics GmbH; Freiburg

Die genomische DNA von Gram-positiven und Gram-negativen Organismen wurde u.a. mit folgendem „Kit“ isoliert (Tabelle 7):

Tabelle 7: Isolierung chromosomaler DNA

„Kit“	**Bezugsquelle**
AquaGenomic™ Solution for isolation and purification of genomic DNA	MoBiTec GmbH; Göttingen

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Sequenzierungs-/Zwischenvektoren wurden die folgenden „Kits“ aus Tabelle 8 verwendet:

Tabelle 8: Ligation

„Kit“	**Bezugsquelle**
CloneJet™ PCR Cloning Kit	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
QIAGEN PCR Cloning Kit	QIAGEN GmbH; Hilden

Für einige PCR-Ansätze wurde auf die in Tabelle 9 aufgelisteten Hilfsmittel zurückgegriffen:

Tabelle 9: Verwendete PCR-„Kits“

„Kit“	Bezugsquelle
FailSafe™ Enzyme Mix	EPICENTER® Biotechnologies, über Biozym Scientific GmbH; Buchs, Schweiz
PureTaq Ready-to-Go PCR-beads-Kit	GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg

2.1.6. Geräte

Im Rahmen der Laborarbeiten wurden folgende Geräte verwendet (Tabelle 10):

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Gerät	Name & Bezugsquelle
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Werkstatt der Universität Ulm; Ulm
Anaerobenkammer	Werkstatt der Universität Ulm; Ulm
Autoklaven	Münchner Medizin Mechanik GmbH; Planegg
	ZIRBUS technology GmbH; Bad Grund
Brutschränke	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Eismaschine	Scotsman AF-20, Scotsman Ice Systems Frimont S.p.a.; Mailand, Italien
Elektroporationsgerät	Gene Pulser® XcellTM, Bio-Rad Laboratories GmbH; München
French® Pressure Cell-Press	French® Pressure Cell-Press, G. HEINEMANN Ultraschall- und Labortechnik; Schwäbisch-Gmünd
Gradienten-PCR-Maschine	PTC-200® Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Heizblock	Thermoblock 1.0, Störk GmbH & Co. KG; Stuttgart
Inkubationsschüttler	Haake Fisons SWB-20, Thermo Fisher Scientific Inc.; Karlsruhe
Schüttel- und Mischgerät	Vortex-Genie™, VWR International; Darmstadt
Magnetrührer	IKAMAG REO, IKA® Werke GmbH & Co. KG;

	Staufen
Mikroskop	Axiostar*plus,* Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Göttingen
Netzgerät	Pharmacia Gene Power Supply GPS 200/400, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
pH-Meter	WTW pH 521, Wissenschaftliche-Technische Werkstätten; Weilheim
Photodokumentationsanlagen	MWG Biotech GmbH; Ebersberg
	Decon Science Tec GmbH; Hohengandern
Photometer	Ultrospec® 3100 *pro*, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
	Genesys 10*vis*, Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich
	Ultrospec® 3000; GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
Reagenzglasschüttler	HT, Infors GmbH; Einsbach
	G24, New Brunswick Scientific Co. Inc., über Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Nürtingen
	Excella E24 Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific, über Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Nürtingen
Reinstwasseranlage	Elgastat Maxima, USF Deutschland GmbH; Ransbach-Baumbach
Ribolyser	Hybaid Ribolyser™ Cell Disrupter; Hybaid GmbH; Heidelberg
Sterilbank	HLB 2448 GS, Heraeus Instruments GmbH; Hanau
UV-Schirm	Bachhofer; Reutlingen
Vakuumzentrifuge	SpeedVac Concentrator SVC 100H, Thermo electron corporation; Cheshire, GB
Waagen	Waage BP2100 S, Sartorius AG; Göttingen
	Waage BP8100, Sartorius AG; Göttingen
	Feinwaage AE 163, Mettler-Toledo GmbH; Gießen

Zentrifugen	L8-60M Ultracentrifuge, Beckman Coulter GmbH; Krefeld
	miniSpin, Eppendorf AG; Hamburg
	Heraeus Biofuge pico, DJB Labcare Ltd; Newport Pagnell, GB
	EBA 20 Zentrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Tuttlingen
	ZK401, HermLe Labortechnik; Wehingen

2.2. Puffer und Lösungen

Die für die Versuche dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung sind nachstehend aufgelistet:

2.2.1. Puffer für die Agarosegelelektrophorese

50x TAE-Puffer

Tris	242,3 g	2 M
Eisessig	57,1 ml	1 M
EDTA	14,6 g	50 mM
H_2O	ad 1000 ml	

Dieser Puffer wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt und nach einer 1:50-Verdünnung als Laufpuffer für Agarosegelelektrophoresen verwendet.

2.2.2. Puffer für die Herstellung kaltkompetenter *E. coli*

Für die Herstellung kaltkompetenter *E. coli*-Bakterien aller verwendeten Stämme wurden folgender Puffer verwendet:

TB-Puffer

Lösung 1

PIPES	756 mg	10 mM
$CaCl_2$	420 mg	15 mM

H_2O	ad 125	ml	

Lösung 1 wurde mit KOH auf pH 6,7 eingestellt

Lösung 2

KCl	4,66	g	250 mM
$MnCl_2$ x 4 H_2O	1,72	g	34,7 mM
H_2O	ad 125	ml	

Beide Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert und anschließend steril vereinigt.

2.2.3. Waschpuffer für Zellen

Für das Waschen von Zellsedimenten wurden folgende Puffer verwendet:

TE-Puffer

Tris	1,21	g	10 mM
EDTA	380	mg	1 mM
H_2O	ad 1000	ml	

Der Puffer wurde mit HCl auf eine pH-Wert von 8 eingestellt.

1x PBS-Puffer

KH_2PO_4	204	mg	1,5 mM
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	747	mg	4,2 mM
NaCl	8	g	137 mM
KCl	111	mg	1,5 mM
H_2O	ad 1000	ml	

2.2.4. Lösungen für Plasmidpräparationen

Für die Isolierung bakterieller Plasmid-DNA wurden, sofern kein „Kit“ verwendet wurde, folgende Lösungen benutzt:

Lösung L1

RNase A (10 mg/ml)	1	ml	100 µg
Tris	0,61	g	50 mM

EDTA (0,5 M, pH 8)	1	ml	5 mM
H_2O	ad 100	ml	

Der Puffer wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 8 eingestellt.

Lösung L2

SDS (10 %)	10	ml	1 % (w/v)
NaOH (10 M)	2	ml	200 mM
H_2O	ad 100	ml	

Diese Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Lösung L3

Kalium-Acetat	29,40	g	3 M
H_2O	ad 100	ml	

Diese Lösung wurde mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt.

TENS

Tris	1,21	g	10 mM
Na-EDTA (0,5 M, pH 8)	2	ml	1 mM
NaOH (1 M)	100	ml	0,1 M
SDS	5	g	17 mM
H_2O	ad 1000	ml	

Birnboim Acetat

Kalium-Acetat	29,4	g	3 M
90 %ige Ameisensäure	5	ml	4,5 % (v/v)
H_2O	ad 100	ml	

2.2.5. Lösungen und Puffer für die Elektroporation von *C. sporogenes*

Für die Elektroporationsversuche von *C. sporogenes* wurden folgende Puffer verwendet:

Elektroporationspuffer (Oultram et al., 1988, mod.)

Saccharose	92,42	g	270 mM

$MgCl_2$ x 6 H_2O	203	mg	1 mM
Na_2HPO_4	2,51	g	7 mM
Aurintricarbonsäure	100	mg	250 µM
H_2O	ad 1000	m	

Die Aurintricarbonsäure wurde mit NH_4OH als Stammlösung (10 mg/ml) angesetzt. Die Zugabe erfolgte kurz vor Benutzung des Puffers

Waschpuffer (Liu et al., 2002)

PEG 3250	100	g	10 % (w/v)
Polyanetholsulfonsäure	1	g	
H_2O	ad 1000	ml	

Elektroporationspuffer (Liu et al., 2002)

PEG 3250	100	g	10 % (w/v)
Polyanetholsulfonsäure	1	g	
Aurintricarbonsäure	100	mg	250 µM
H_2O	ad 1000	ml	

Die Aurintricarbonsäure wurde mit NH_4OH als Stammlösung (10 mg/ml) angesetzt. Die Polyanetholsulfonsäure wurde mit H_2O als Lösungsmittel ebenfalls als Stammlösung (100 mg/ml) angesetzt. Die Zugabe beider Lösungen erfolgte kurz vor Benutzung des Puffers.

2.2.6. Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die Aufreinigung von Proteinen mittels Ni-NTA-Agarose und deren anschließende Konzentrierung verwendet:

Basispuffer (für die Verdünnung des Imidazolpuffers)

NaH_2PO_4 x 1 H_2O	6,9	g	50 mM
NaCl	17,53	g	300 mM
H_2O	ad 1000	ml	

Der Puffer wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt.

Imidazolpuffer 1 M

Imidazol	68	g	1 M
NaH_2PO_4 x 1 H_2O	6,9	g	50 mM
NaCl	17,53	g	300 mM
H_2O	ad 1000	ml	

Der Puffer wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt.

Dialysepuffer

PBS-Puffer	50	ml	
Glycerin 100 %	50	ml	1,36 M
H_2O	ad 500	ml	

Der Puffer wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt.

2.2.7. Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die Durchführung einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet:

Trenngelpuffer

Tris	90,86	g	1,5 M
SDS	2	g	0,4 % (w/v)
H_2O	ad 500	ml	

Der Puffer wurde mit HCl auf pH 8,8 eingestellt.

Sammelgelpuffer

Tris	30,28	g	0,5 M
SDS	2	g	14 mM
H_2O	ad 500	ml	

Der Puffer wurde mit HCl auf pH 6,8 eingestellt.

SDS-Laufpuffer 10x

Tris	30,28	g	0,25 M
Glycin	142,6	g	1,9 M
SDS	10	g	35 mM
H_2O	ad 1000	ml	

4x Denaturierungspuffer

Tris	1,51	g	0,25	M
β-Mercaptoethanol	5	ml	1,43	M
SDS	3	g	200	mM
Glycerin	20	ml	5,5	M
Bromphenolblau	10	mg	0,6	M
H_2O	ad 50	ml		

2.2.8. Puffer und Lösungen für „Westernblots“ und Immunfärbungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden für den Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulosemembran und die anschließende Immunfärbung verwendet:

„Semidry“-Transferpuffer

Tris	5,8	g	48	mM
100 % Methanol	200	ml	4,93	M
SDS	3,8	g	13,3	M
Glycin	2,8	ml	37	mM
H_2O	ad 1000	ml		

„Blocking“-Reagenz

KH_2PO_4	204	mg	1,5	mM
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	747	mg	4,2	mM
NaCl	8	g	137	mM
KCl	111	mg	1,5	mM
Magermilchpulver	50	g	5	% (w/v)
H_2O	ad 1000	ml		

Natriumphosphat-Tween-Puffer, pH 7,4

NaCl	5,84	g	100	mM
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	1,8	g	15	mM
Tween 20	500	µl	0,05	% (v/v)
H_2O	ad 1000	ml		

2.2.9. Lösungen für die Anfärbung von Proteinen

Folgende Lösungen wurden für die Anfärbung von Proteinen in einem Polyacryamid-Gel verwendet:

CBB-Lösung

Coomassie Brilliant Blue (CBB) G250	60-80	mg	70-94	µM
H_2O	ad 1000	ml		

Diese Lösung wurde für 2-3 h bei RT gerührt. Dann erfolgte die Zugabe von 3 ml 37 %iger Salzsäure (~ 35 mM Endkonzentration). Bis zum Gebrauch wurde die Lösung im Dunkeln bei RT gelagert.

Fixierlösung

Methanol	500	ml	12,33	M
Eisessig	120	ml	2,1	M
Formaldehyd (37 % (v/v))	0,5	ml	5	mM
H_2O	ad 1000	ml		

Silbernitratlösung

$AgNO_3$	200	mg	12	mM
Formaldehyd (37 % (v/v))	75	µl	0,75	mM
H_2O	ad 1000	ml		

Thiosulfatlösung

$Na_2S_2O_3 \times 5\ H_2O$	200	mg	0,81	mM
H_2O	ad 1000	ml		

Entwicklerlösung

Na_2CO_3	60	g	0,57	M
Thiosulfatlösung	20	ml	16,2	mM
Formaldehyd (37 % (v/v))	0,5	ml	5	mM
H_2O	ad 1000	ml		

Stopplösung

EDTA	18,6	g	50	mM
H_2O	ad 1000	ml		

2.3. Bakterienstämme, Plasmide und Oligodesoxynukleotide

2.3.1. Verwendete Bakterienstämme

Die in der Tabelle 11 verwendeten Bakterienstämme wurden für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet:

Tabelle 11: Bakterienstämme

Stamm	Geno- oder Phänotyp[(1)]	Herkunft/Referenz
Escherichia coli XL-1 Blue MRF'	*Δ(mrcA)183 Δ(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 [F' proAB laqI^{q}ZΔM15m Tn10(Tc^R)]*	Stratagene GmbH; Braunschweig
E. coli XL-2 Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^{q}ZΔM15 TN10 Tc^R) Amy Cam^R]*	Stratagene GmbH; Braunschweig
E. coli HB101	*F$^-$ mcrB mrr hsdS20(r$_B^-$ m$_B^-$) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44 λ$^-$*	Boyer u. Roullanddusoix, 1969
E. coli BL21 DE3	*F$^-$ ompT gal dcm lon hsdS$_B$(r$_B^-$ m$_B^-$) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*	Novagen R&D systems; Wiesbaden
E. coli 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 GmbH; Braunschweig
E. coli CA434	*hsdS (rB$^-$mB$^-$) supE44 thi-1 recAB ar-14 leuB5proA2 lacY1 galK rpsL20 (str^R) xyl-5 mtl-1 (pACYC184::Sau5) mit konjugativem Plasmid R702 (Tc^R*	Purdy et al., 2002

	Sm^R Su^R Hg^R Tra+ Mob+)	
E. coli DH5α	*F' mcrAΔ-(mrr hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK λ' rspL endA1 nupG*	Hanahan, 1985
Lactococcus lactis DSM 4644	Typstamm	DSMZ; Braunschweig
Clostridium acetobutylicum ATCC 824	Typstamm	American Type Culture Collection; Manassas, USA
Clostridium perfringens (Typ A) DSM 11784	Typstamm	DSMZ; Braunschweig
Clostridium sporogenes NCIMB 10696	Typstamm	NCIMB Ltd.; Aberdeen, GB

(1) für die Genotypabkürzungen siehe Berlyn et al., 1996

2.3.2. Oligodesoxynukleotide

In der nachstehenden Tabelle 12 sind die für diese Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide („Primer“) aufgelistet. Die ggf. an das 5'-Ende angefügten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind hervorgehoben.

Tabelle 12: Oligodesoxynukleotide

Bezeichnung	**Sequenz 5' → 3'**	**Schnitt-stellen**
Tadc-f-SgfI	AATAGCGATCGCGAACTTAGACCCATGGCTG	*Sgf*I
Tadc-r-SgfI	AATAGCGATCGCCTAGCTCTCACATTCTTGC	*Sgf*I
P-16S-for-BglII	ATAAGATCTGGTAGTAACCAACCAGTCTGGC	*Bgl*II
P-16S-for-BbvCI-AflII	ATACTTAAGAAACCTCAGCCAATTTAAAAGTTTGATGCTC	*Bbv*CI, *Afl*II
PT-amyP-f-BbvCI	ACACCTCAGCAATTGTGAGCGGATAACAATTTCAGGAGGAATTAACCATGCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGCCGCGCATTTTCGAACACCATTGG	*Bbv*CI, *Not*I

PT-amyP-r- SgfI-AflII	ACACTTAAGAAATTTGCGATCGCACTAGTAGGAG GAATTAACCATGCAGTGGTGGTGGTGGTGGTTG CCTGCAGGTTGAGTAAACGTTCTAAATTG	*Sbf*I, *Sgf*I, *Afl*II
T-for-SgfI-2	ACAGCGATCGC GCTTAACCTTACAACGCCGAAGC	*Sgf*I
T-rev-AflII-2	ACACTTAAG GCTAGTTTACCGTATCTGTGGGG	*Afl*II
PT-for-BbvCI	ACACCTCAGCAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA GG	*Bbv*CI
PT-rev-SgfI-AflII	ACACTTAAGAAATTTGCGATCGCACTAGTAGGAG GAATTAAGG	*Sgf*I, *Afl*II
T-for-SgfI-2	ACAGCGATCGCGCTTAACCTTACAACGCCGAAG C	*Sgf*I
T-rev-AflII-2	ACACTTAAG GCTAGTTTACCGTATCTGTGGGG	*Afl*II
PT-Konstrukt	AATTGTGAGCGGATAACAATTTCAGGAGGAATTA ACCATGCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGCC GCAAACCTGCAGGCACCACCACCACCACCACTG CATGGTTAATTCCTCCTACTAGT	*Not*I, *Sbf*I
P-16S-for-BbvCI	ATACCTCAGCCAATTTAAAAGTTTGATGCTC	*Bbv*CI
PT-amyP-f-BbvCI-BglII	ACAAGATCTACACCTCAGCAATTGTGAGCGGATA ACAATTTCAGGAGGAATTAACCATGCAGTGGTGG TGGTGGTGGTGGCGGCCGCGCATTTTCGAACAC CATTGG	*Bbv*CI, *Bgl*II, *Not*I
PT-amyP-r- SgfI	ACAGCGATCGCACTAGTAGGAGGAATTAACCAT GCAGTGGTGGTGGTGGTGGTTGCCTGCAGGTTG AGTAAACGTTCTAAATTG	*Sgf*I, *Sbf*I
T-for-SgfI-2-BglII	ACAAGATCTACAGCGATCGCGCTTAACCTTACAA CGCCGAAGC	*Sgf*I, *Bgl*II
T-rev-2-AflII	ACACTTAAGGCTAGTTTACCGTATCTGTGGGG	*Afl*II
PT-amyP-f-BbvCI	ACACCTCAGCAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA GGAGGAATTAACCATGCAGTGGTGGTGGTGGTG GTGGCGGCCGCGCATTTTCGAACACCATTGG	*Bbv*CI, *Not*I
asPT-r-P1-MssI-AflII	TACACTTAAGCTGTGTTTAAACCTGTTAGATCACA AGCAAAGG	*Mss*I, *Afl*II
asPT-f-P2-MssI	CTTGTGATCTAACAGGTTTAAACACAGGTCCATA TCC	*Mss*I

PT-amyP-r-SgfI-AflII	ACACTTAAGAAATTTGCGATCGCACTAGTAGGAG GAATTAACCATGCAGTGGTGGTGGTGGTGGTTG CCTGCAGGTTGAGTAAACGTTCTAAATTG	*Afl*II, *Sgf*I, *Sbf*I
pET29f-cpe-NdeI	ACACATATGCTTAGTAACAATTTAAATCCAATGGT GTTCG	*Nde*I
pET29f-cpeT-NdeI	ACACATATGGATAAAGGAGATGGTTGGATATTAG GGGAACC	*Nde*I
pET29r-cpe-XhoI	ACACTCGAGAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAG GGTAATTTCC	*Xho*I
P_CPEtutti-f-AatII	ACAGACGTCTTAAGTTGGGTAACGCCAGG	*Aat*II
P_CPEtutti-r-AatII	ACAGACGTCCACAGGAAACAGCTATGACC	*Aat*II
pOri-SpCpe-BamHI	GTAGGATCCTTGAGTAAACGTTCTAAATTGTTAA AAAGAAGAATGC	*Bam*HI
pOri-SpCpe-SalI	GTAGTCGACGCTATTAAAATTTTTGAAATAATATT GAATAAGGGTAATTTCC	*Sal*I
P-f-cpe-NotI	AGAGCGGCCGCATGCTTAGTAACAATTTAAATCC AATGG	*Not*I
P-r1-cpe-XhoI	TCCCTCGAGCTATTAAAATTTTTGAAATAATATTG AATAAGGG	*Xho*I
P-r2-cpe-XhoI	TCCCTCGAGCTAAAATTTTTGAAATAATATTGAAT AAGGG	*Xho*I
P-f-cpeT-NotI	AGAGCGGCCGCGATAAAGGAGATGGTTGGATAT TAGGGGAACC	*Not*I
P-orf5-C.ac-For	CATATGAATTTATTAAATCTTTTTACATACGTCATA CC	*Nde*I
P-orf5-C.ac-Rev	ACACTCGAGTGCGGCCGCTATTGCTTCTATCACC CTTATTAAAGCTTGT	*Xho*I, *Not*I
P-amyP-C.ac-For	CATATGAGTAAACGTTCTAAATTGTTAAAAAGAAG AATGC	*Nde*I
P-amyP-C.ac-Rev	ACACTCGAGTGCGGCCGCTCGGAAGTTCTCTAT TCTCACTTGAATATGTCATTACC	*Xho*I, *Not*I
P-Chit-C.ac-For	CATATGAGTACTCGTAAAAAACTTTTAACATTCTT GGCC	*Nde*I
P-Chit-C.ac-Rev	ACACTCGAGTGCGGCCGCTAGTAGCAGTTAGGC CTGTAGGCGCTGGCGG	*Xho*I, *Not*I

P-Pec-C.ac-For	CATATGAAATACTTAACTAAAAAGCTATTTCTTATATCTACC	*Nde*I
P-Pec-C.ac-Rev	ACACTCGAGTGCGGCCGCTGTCATTTCCATTTGGTGAGATGTAAAAGCTAGAGGC	*Xho*I, *Not*I
P-Coll-C.spo-For	CATATGAAGAAAAAATTTATTAAAGTGCTATGT	*Nde*I
P-Coll-C.spo-Rev	ACACTCGAGTGCGGCCGCTATTAGACTTAATTTTAGTATTATTAATAGG	*Xho*I, *Not*I
P-plc-C.per-For	CATATGAAAAGAAAGATTTGTAAGGCGCTTGTTTGTGCC	*Nde*I
P-plc-C.per-Rev	ACACTCGAGTGCGGCCGCTATGAGTTCCTGTTCCATCAATTTTTCCATCCCAAGC	*Xho*I, *Not*I
P-3D-C.per-For	CATATGCAAAAAAGAATTTTGTCAGCATTAATTGCTATGGC	*Nde*I
P-3D-C.per-Rev	ACACTCGAGTGCGGCCGCTTTCATTATCTAATTGTGAATATTTTACTTTATTCTCC	*Xho*I, *Not*I
P-amyP-C.ac-Rev2	ACAGCGGCCGCTAAAAGCATGAAGCATAACACCGTCTTTGG	*Not*I
P-chiti-C.ac-Rev2	ACAGCGGCCGCTAACTGTTTGCCAGCTTAAGGATATGTCACTAGAGG	*Not*I
P-orf5-C.ac-Rev2	ACAGCGGCCGCTAATAGGACTTTTTACTAATTTTGATAGTATTTCTAGGG	*Not*I
P-Pec-C.ac-rev2	ACAGCGGCCGCTTTCTTGAGCTTTTGATATAGTTAAAAAAGG	*Not*I
P-plc-C.perf-Rev2	ACAGCGGCCGCTTTCTGGTTCATTTTTGGACATATCATTTTCTAAGATTGAAACACC	*Not*I
P-colla-C.sp-Rev2	ACAGCGGCCGCTAGAATTAGTAGAAGGCATTCTTTCCAATTTATTGC	*Not*I
P_CR-f-BglII	ATAAGATCTGATCCCATTATGCTTTGGC	*Bgl*II
P_CR-r-BbvCI-AflII	ATACTTAAGAAACCTCAGCCCTAATAATGCCAAATACCG	*Bbv*CI, *Afl*II
P_CR-f2-BglII	ATAAGATCTGATCCCATTATGCTTTGGC	*Bgl*II
P_CR-r2-BbvCI	ATACCTCAGCCCTAATAATGCCAAATACCG	*Bbv*CI
SpCPE-2-f-EcoRI	ACAGAATTCTTGAGTAAACGTTCTAAATTGTTAAAAAGAAGAATGC	*Eco*RI

SpCPE-2-r-XhoI	ACACTCGAGTTAAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAGGG	*Xho*I
CPE-2-f-EcoRI	ACAGAATTCCTTAGTAACAATTTAAATCCAATGGTGTTCG	*Eco*RI
CPE-2-r-XhoI	ACACTCGAGTTAAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAGGG	*Xho*I
73/2-for	CACTTACTTGGTCATTAAGG	
73/2-rev	GGTTGTCATCCGATAGAGG	
73/2-for-2	TCTTCGTTCGTCTGGAAGGC	
73/2-rev-2	AAGAGCAACCCTAGTGTTCG	
P73/2-for-3	TAGGCCGACAGGCTCATGCC	
P73/2-rev-3	ATAACGCGTTGGGAAATGGC	
P73/2-for-4	TCTGAAAATTCAACATTTCC	
P73/2-rev-4	ACAATCAAAAGAGAGTTTGG	
P73/2-for-5	CGTTGGTGCGGATATCTCGG	
P73/2-rev-5	CAATGGGAGTGTAGAACTCC	
P73/2-for-6a	CTGTAGGTATCTCAGTTCGG	
P73/2-for-6b	GTATCTCAGTTCGGTGTAGG	
P73/2-rev-6a	AAAGATAGCTCATGGTTTCC	
P73/2-rev-6b	AGTGTAGAACTCCTTATTCC	
P73/2-for-7	GAAATCCGTCACATACTGCG	
P73/2-rev-7	TCGAAAGACTGGGCCTTTCG	
P73/2-for-8	TTTGGAAACGGCTTTGGACG	
P73/2-rev-8	ATGCGAGAGTAGGGAACTGC	
P-f-pMTL-SpCPE	GTCGACGTCACCTGCAGGTAGGAGGATTAGTCATGAGTAAACGTTCTAAATTGTTAAAAAGAAGAATGC	*Aat*II, *Sbf*I
P-r1-pMTL-SpCPE	ACAGACTATCGTCGCTATTAAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAGGGTAATTTCC	*Box*I
P-r2-pMTL-SpCPE	ACACACGTGAGACTATCGTCATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGG	*Pml*I, *Box*I
Seq_dlacI	TTGTGATGCTCGTCAGGGGG	

Sp-f1-SdaI-AatII	ACAGACGTCCCTGCAGGTTTGTTTAACTTTAAGA AGG	*Aat*II, *Sbf*I
Sp-f2-SdaI-AatII	ACAGACGTCCCTGCAGGTAATACGACTCACTATA GGG	*Aat*II, *Sbf*I
Sp-r-PmlI	ATACACGTGCTAAAATTTTTGAAATAATATTGAAT AAGGG	*Pml*I
P_bdhA-Tox-f1	ACAGGCCGGCCGAATTGTGAGCGGATAACAATT CCC	*Fse*I
P_bdhA-tox-f2	ACAGGCCGGCCGAAATAATTTTGTTTAACTTTAA GAAGGAG	*Fse*I
P_bdhA-Tox-r	ACAATTTAAATTAGCAGCCGGATCTCAGTGG	*Sma*I
P_bdhA-tox	TGGCTGCTGCATCTCTTCGC	
T7-Promotor	GTTTAAACTCGATCTCGATCCCGCGAAATTAATA CGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAAC AATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAA GAAGGAGATCCTGCAGGACAGGCGCGCCCCAC CGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGC CTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTGCGATCGC	*Mss*I, *Sbf*I, *Asc*I, *Sgf*I
P-P_T7-MssI-for	ACAGTTTAAACTCGATCTCGATCCCGCG	*Mss*I
P-P_T7-SgfI-rev	ACAGCGATCGCAAAACCCCTCAAGACCC	*Sgf*I
Seq-pMTL-P_T7	CATGAATCCATAAAAGGCGC	
bdhA-lacO-P	GCTAGCTTTATATAATAGTAGTTTGCATGAAATTT CGTTGTTTATTCATATTAGATGCTTGTATTAAAAT AATAAAATAGTAAAATATAAGAATTGTGAGCGGA TAACAATTCCCGTAGACAAACTATAAATCTATTAC TAGGAGGTAGGAGATGGCCGGCCACAATTTAAA T GCTAGC	*Nhe*I, *Fse*I, *Sma*I
P-P_bdhA-NheI-for	ACAGCTAGCTTTATATAATAGTAGTTTGC	*Nhe*I
P-P_bdhA-NheI-rev	ACAGCTAGCATTTAAAT TGT GGCCGGCC	*Nhe*I
P-T7-Pol-FseI-for	ACAGGCCGGCCATGAACACGATTAACATCGC	*Fse*I
P-T7-Pol-SmiI-rev	ACAATTTAAATTTACGCGAACGCGAAGTCCG	*Sma*I
Seq-T7Poly-f	TGAGCGGATAACAATTCCCG	

Seq-T7Poly-r	CTATTCAGCACTGTTATGCC	
P-lacI-SbfI-for	ACACCTGCAGGATGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGC	*Sbf*I
P2-lacI-SbfI-for	ACACCTGCAGGAAGGAGATATATATATGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGC	*Sbf*I
P-lacI-SgfI-rev	ACAGCGATCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCG	*Sgf*I
Seq-pAN-lacI-f	GGTATAATCACATACGGCCG	
Seq-pAN-lacI-r	AACTCAACTGTCGTTTCTGC	
P-pLysE-SgfI-for	ACAGCGATCGCAATTGCTAACGCAGTCAGGC	*Sgf*I
P2-pLysE-SgfI-for	ACAGCGATCGCTGTAGCACCTGAAGTCAGCC	*Sgf*I
P-pLysE-SgfI-rev	ACAGCGATCGCAAACAAGCGCTCATGAGCCC	*Sgf*I
Seq-pAN-lysE	TCATTAATGCAGCTGGCACG	
pec-for-SbfI	ACACCTGCAGGATGAAATACTTAACTAAAAAGC	*Sbf*I
colla-for-SbfI	ACACCTGCAGGATGAAGAAAAAATTTATTAAAGTGCTATGTTCAGTAGCCC	*Sbf*I
orf5-for-SbfI	ACACCTGCAGGATGAATTTATTAAATCTTTTTACATACGTCATACC	*Sbf*I
amyP-for-SbfI	ACACCTGCAGGATGTTGAGTAAACGTTCTAAATTGTTAAAAAGAAGAATGC	*Sbf*I
plc-for-SbfI	ACACCTGCAGGATGAAAAGAAAGATTTGTAAGGCGC	*Sbf*I
chiti-for-SbfI	ACACCTGCAGGATGAGTACTCGTAAAAAACTTTTAACATTCTTGGCC	*Sbf*I
cpe-rev-AscI	ACAGGCGCGCCTCGAGCTAAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAGGG	*Asc*I
Pf-pMTL-SgfI-SbfI	ACACCTGCAGGACAGCGATCGCTTCTCGGAGCACTGTCCGACC	*Sgf*I, *SbfI*
Pr-pMTL-MssI	ACAGTTTAAACTAATGAATCGGCCAACGCGC	*Mss*I
P-tetO2	GTTTAAACACAGAATTCGATCCCCATCCAAAAACTAAAAAAAATATTGACACTCTATCATTGATAGAGTATAATTAACGACTCTATCATTGATAGAGTCGCCAAGCTTGGGATCCCCAGCTTGTTGATACACTAATGCCTGCAGG	*Mss*I, *Sbf*I
Pf-tetO2-MssI	ACAGTTTAAACACAGAATTCGATCCCCATCC	*Mss*I

Pr-tetO2-SdaI	ACACCTGCAGGGCATTAGTGTATCAACAAGCTGGGG	*Sbf*I
Pf-pMTLTox-SdaI	ACACCTGCAGGTTTGTTTAACTTTAAGAAGG	*Sbf*I
Pr-pMTLTox-SgfI	ACAGCGATCGCTAGCAGCCGGATCTCAGTGG	*Sgf*I
Seq-pMTLtox	CTATCATTGATAGAGTCGCC	
Pf-pMTLP-SbfI	ACACCTGCAGGTTTGTTTAACTTTAAGAAGG	*Sbf*I
Pr-pMTLP-SgfI	ACAGCGATCGCCTAAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAGGG	*Sgf*I
RT-PCR-cpe-for	GTATCTACAACTGCTGGTCC	
RT-PCR-cpe-rev	TTTTACTCCATCACCTAAGG	
RT-PCR-catP-for	TTGTACCTACAGCATGACCG	
RT-PCR-catP-rev	GAAATCCGTCACATACTGCG	
pANS1-f-SbfI-SgfI	ACACCTGCAGGACAGCGATCGCGTGAGGAAGATGGATAGTTACCC	*Sbf*I, *Sgf*I
pANS1-r1-MssI	ACAGTTTAAACCTCCATATATTTTATTTTTACTC	*Mss*I
pANS1-r2-MssI	ACAGTTTAAACAAAGTTGATCCGCAACGCCC	*Mss*I
Seq-pANS1-dmeth	GATGTGATCGGAGATCTGCC	
tetR-f-BbvCI	ACACCTCAGCATGTCTAGATTAGATAAAAGTAAAGTG	*Bbv*CI
tetR-r-AflII	ACACTTAAGTTATGCTGCTTTTAAGACCC	*Afl*II
P-bla-f-SgfI	ACAGCGATCGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGC	*Sgf*I
P-bla-r-SgfI	ACAGCGATCGCTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC	*Sgf*I
Pf-A1A2-PmeI	ACAGTTTAAACTTTGTATTAATATGAAAAAAAGCATTGACTTTTCAATTATATGG	*Pme*I
Pf-A2-PmeI	ACAGTTTAAACTTGTAACTAAATTTAAAACATTATATTTTATTCATTGAC	*Pme*I
Pr-A-SbfI	ACACCTGCAGGACTCTATCATTGATAGAGTAACATTGCAATTAAATAATAACAAATATTACATTAAAAGTC	*Sbf*I
Pf-P_bdhA-SgfI	ACAGCGATCGCTGCCAAGCTTAAATGGGGATGG	*Sgf*I

Pr1-P_bdhA-NheI	ACAGCTAGCATTTAAATACAGGCCGGCCATCTCC TACCTCCTAGTAATAGATTTATAGTTTGTCTAC	*Nhe*I, *Smi*I, *Fse*I
Pr2-P_bdhA-FseI	ACAGCTAGCATTTAAATACAGGCCGGCCATCTCC GGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCTACCTCCTA GTAATAGATTTATAGTTTGTCTAC	*Nhe*I, *Smi*I, *Fse*I
Pf-pIP404	TCCTTGAGAGTTTTCGCCC	
Pr-pIP404-SmiI	ACAATTTAAATGATAAGGGGTACAAATTCCC	*Smi*I
Seq-pD2	GATATAAGCTTAGATGCTGG	

2.3.3. Plasmide

In den folgenden beiden Tabellen 13 und 14 sind die Plasmide aufgeführt, die in dieser Arbeit Verwendung fanden oder konstruiert wurden:

Tabelle 13: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe [kBp]	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pANS1	6,2	pACYC184/p15A ori (*rep*), *spcE*, *Methyltransferase*-Gen des Phagen Φ3T I	Mermelstein und Papoutsakis, 1993
pDrive	3,9	pMB1/ColE1 ori (*rep*), f1 ori, *bla, aph, lacPOZ'*	QIAGEN GmbH; Hilden
pJIR750	6,6	pMB1/ColE1 ori (*rep*), pIP404 ori (*repL*), *catP*	Bannam und Rood, 1993
p7BIG2TOX	9,2	P7BIG2 mit MLSr und *cpe* aus pUC-*cpe-ermC*2 als *Xba*I-Fragment	Box, 2005
pMTL007	11,9	pMB1/ColE1 ori (*rep*), pCB102 ori (*orfH*), oriT (*traJ*), *catP*, *lacI*, P_{fac}, Gruppe II Intron (*ltrA*)	Heap et al., 2007
pET28a	5,4	*aph*, pMB1/ColE1 ori (*rep*), f1 ori, lacI, P_{T7}, T_{T7}	Novagen Inc.; Madison, USA
pET29a	5,4	*aph*, pMB1/ColE1 ori (*rep*), f1 ori, *lacI*, P_{T7}, T_{T7},	Merck KGaA; Darmstadt

pOri23	6,0	*ermC*, ori ColE1, P23, *repD*, *repE,*	Que et al., 2000
pIMP1	4,7	*ermC*, *bla*, pMB1/ColE1 ori (*rep*), pIM13 ori (*repL*)	Mermelstein et al., 1992
pIMPoriTori2	5,5	*ermC*, *bla*, pMB1/ColE1 ori (*rep*), pIM13 ori (*repL*), oriT (*traJ*)	Purdy et al., 2002
pJET	3,0	pMB1/ColE1 ori (*rep*), *bla*, P_{lacUV5}, *eco47IR*	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot

Tabelle 14: Konstruierte Plasmide

Plasmid	Größe [kBp]	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pANr2	4,7	Vektor: pANS1Δ*Φ3T*-*Methytransferase*-Gen; p15A ori (*rep*), *spcE*	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}	4,9	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-lacI^{RBS-}	6,0	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *lacI* (ohne RBS)	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-lacI^{RBS+}	6,0	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *lacI* (mit RBS)	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-lacI^{RBS+}-lysE	7,1	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *lacI* (mit RBS), *lysE*	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-lacI^{RBS+}-lysE-bla	8,2	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *lacI* (mit RBS), *lysE*, *bla*	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-lacI^{RBS-}-lysE	7,1	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *lacI* (ohne RBS), *lysE*	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-lacI^{RBS-}-lysE-bla	8,2	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *lacI* (ohne RBS), l*ysE*, *bla*	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-$tetR_{F1}$	5,6	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *tetR* (mit RBS)	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-$tetR_{F1}$-bla	6,7	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *tetR* (mit RBS), *bla*	Diese Arbeit
pANr2-P_{help}-$tetR_{F2}$	5,6	Vektor: pANr2; Insert: P_{help}, *tetR* (ohne RBS)	Diese Arbeit
pD1	5,3	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_nat-lacO}$	Diese Arbeit
pD1-colIa''-cpeT	6,4	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_nat-lacO}$, *colIa'', cpeT*	Diese Arbeit

pD2-colla''-cpeT	8,1	Vektor: pMTLΔorfH; Insert: $P_{bdhA_nat\text{-}lacO}$, *colla''*, *cpeT*, *repL*	Diese Arbeit
pDrive-P_{16S}	4,6	Vektor: pDrive; Insert: P_{16S}	Diese Arbeit
pDrive-$P_{help\text{-}Pf}$	4,1	Vektor: pDrive; Insert: P_{help}	Diese Arbeit
pDrive-$P_{help\text{-}Tf}$	4,1	Vektor: pDrive; Insert: P_{help}	Diese Arbeit
pDrive-T_{rrnB}	4,1	Vektor: pDrive; Insert: T_{rrnB}	Diese Arbeit
pET28a-cpe	6,3	Vektor: pET28a; Insert: *cpe*	Diese Arbeit
pET28a-sp-cpe	6,4	Vektor: pET28a; Insert: *amyP'*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-amyP''-cpe	6,4	Vektor: pET29a; Insert: *amyP''*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-amyP'-cpe	6,3	Vektor: pET29a; Insert: *amyP'*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-amyP''-cpeT	6,2	Vektor: pET29a; Insert: *amyP''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pET29a-chiti''-cpe	6,4	Vektor: pET29a; Insert: *chiti''*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-chiti'-cpe	6,3	Vektor: pET29a; Insert: *chiti'*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-chiti''-cpeT	6,2	Vektor: pET29a; Insert: *chiti'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pET29a-colla''-cpe	6,4	Vektor: pET29a; Insert: *colla''*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-colla'-cpe	6,3	Vektor: pET29a; Insert: *colla'*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-colla''-cpeT	6,2	Vektor: pET29a; Insert: *colla''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pET29a-colla'-cpeT	6,1	Vektor: pET29a; Insert: *colla'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pET29a-cpe-his	6,2	Vektor: pET29a; Insert: *cpe* mit C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET29a-cpeT-his	6,1	Vektor: pET29a; Insert: *cpeT* mit C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET29a-orf5''-cpe	6,4	Vektor: pET29a; Insert: *orf5''*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-orf5''-cpeT	6,2	Vektor: pET29a; Insert: *orf5''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pET29a-orf5'-cpeT	6,1	Vektor: pET29a; Insert: *orf5'*, *cpeT*	Diese Arbeit

pET29a-pec''-cpe	6,4	Vektor: pET29a; Insert: *pec''*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-pec'-cpe	6,3	Vektor: pET29a; Insert: *pec'*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-pec''-cpeT	6,2	Vektor: pET29a; Insert: *pec''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pET29a-pec'-cpeT	6,1	Vektor: pET29a; Insert: *pec'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pET29a-plc''-cpe	6,4	Vektor: pET29a; Insert: *plc''*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-plc'-cpe	6,3	Vektor: pET29a; Insert: *plc'*, *cpe*	Diese Arbeit
pET29a-plc''-cpeT	6,2	Vektor: pET29a; Insert: *plc''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pET29a-plc'-cpeT	6,1	Vektor: pET29a; Insert: *plc'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTLΔlacI		Vektor: *E. coli/Clostridium*-Schaukelvektor pMTL007Δ*lacI*; pMB1 ori, *orfH*, *catP*, *traJ*, oriT	Diese Arbeit
pMTLΔlacIΔClosTron	5,9	Vektor: *E. coli/Clostridium*-Schaukelvektor pMTL007Δ*lacI*Δ*ClosTron*; pMB1 ori, *orfH*, *catP*, *traJ*, oriT, P_{fac}	Diese Arbeit
pMTL	5,6	Vektor: *E. coli/Clostridium*-Schaukelvektor pMTL007Δ*lacI*Δ*Pfac*Δ*ClosTron*; pMB1 ori, *orfH*, *catP*, *traJ*, oriT	Diese Arbeit
pMTL-$P_{abrB310\text{-}A1A2\text{-}tetO}$	5,8	Vektor: pMTL; Insert: $P_{abrB310_A1A2\text{-}tetO}$	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$	5,8	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-amyP''-cpe	7,0	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *amyP''*, *cpe*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-amyP''-cpeT	6,9	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *amyP''*, *cpeT*	Diese Arbeit

pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-chiti''-cpe	7,0	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *chiti''*, *cpe*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-chiti''-cpeT	6,9	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *chiti''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-colla''-cpeT	6,9	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *colla''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-orf5''-cpeT	6,9	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *orf5''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-pec''-cpe	7,0	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *pec''*, *cpe*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-pec''-cpeT	6,9	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *pec''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-plc''-cpeT	6,9	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *plc''*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}	8,6	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *T7 Polymerase*-Gen, P_{T7}	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}-amyP'-cpe	9,7	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *T7 Polymerase*-Gen, P_{T7}, *amyP'*, *cpe*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}-colla'-cpeT	9,6	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *T7 Polymerase*-Gen, P_{T7}, *colla'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}-orf5'-cpeT	9,6	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *T7 Polymerase*-Gen, P_{T7}, *orf5'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}-pec'-cpeT	9,6	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *T7 Polymerase*-Gen, P_{T7}, *pec'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}-plc'-cpe	9,7	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *T7 Polymerase*-Gen, P_{T7}, *plc'*, *cpe*	Diese Arbeit
pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}-plc'-cpeT	9,6	Vektor: pMTL; Insert: $P_{bdhA_syn\text{-}lacO}$, *T7 Polymerase*-Gen, P_{T7}, *plc'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-P_{tetO2}	5,7	Vektor: pMTL; Insert: P_{tetO2}	Diese Arbeit
pMTL-P_{tetO2}-amyP'-cpeT	6,8	Vektor: pMTL; Insert: P_{tetO2}, *amyP'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-P_{tetO2}-colla'-cpe	6,9	Vektor: pMTL; Insert: P_{tetO2}, *colla'*, *cpe*	Diese Arbeit

pMTL-P_{tetO2}-colla'-cpeT	6,8	Vektor: pMTL; Insert: P_{tetO2}, *colla'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-P_{tetO2}-orf5'-cpeT	6,8	Vektor: pMTL; Insert: P_{tetO2}, *orf5'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-P_{tetO2}-pec'-cpeT	6,8	Vektor: pMTL; Insert: P_{tetO2}, *pec'*, *cpeT*	Diese Arbeit
pMTL-P_{tetO2}-plc'-cpe	6,9	Vektor: pMTL; Insert: P_{tetO2}, *plc'*, *cpe*	Diese Arbeit
pMTL-P_{tetO2}-plc'-cpeT	6,8	Vektor: pMTL; Insert: P_{tetO2}, *plc'*, *cpeT*	Diese Arbeit

2.4. Zellanzucht

2.4.1. Nährmedien für *E. coli*

E. coli-Zellen wurden überwiegend in LB-Medium kultiviert. Diesem Medium wurden bei der Herstellung von Plattenmedien vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugegeben. Für Überexpressionsversuche wurde aufgrund der erzielbaren höheren Zelldichten TB-Medium verwendet. Um die Effizienz von Transformationen zu erhöhen, wurden die Zellen während der Regenerationsphase in SOC-Medium kultiviert. Zur Herstellung kaltkompetenter Bakterien wurde SOB-Medium verwendet. Die Medienzusammensetzungen sind nachfolgend aufgeführt.

LB-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

Trypton	10	g	1,0	% (w/v)
Hefeextrakt	5	g	0,5	% (w/v)
NaCl	10	g	172	mM
H_2O	ad 1000	ml		

TB-Medium (Tartoff und Hobbs, 1987)

Trypton	12	g	1,2	% (w/v)
Hefeextrakt	24	g	2,4	% (w/v)
KH_2PO_4	2,2	g	16	mM
K_2HPO_4	9,4	g	54	mM
Glycerin	8	ml	109	mM
H_2O	ad 1000	ml		

Die Kaliumphosphatlösung wurde getrennt hergestellt, autoklaviert und anschließend in das restliche Medium überführt.

SOC-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

Trypton	20	g	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	5	g	0,5 % (w/v)
NaCl	500	mg	8,6 mM
KCl	186	mg	2,5 mM
Glucose x H_2O	4	g	20,0 mM
H_2O	ad 1000	ml	

SOB-Medium (Sambrook und Russel, 2001)

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

Die Medienkomponenten $MgSO_4$ und $MgCl_2$ wurden getrennt von den übrigen Bestandteilen angesetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde diese mit dem restlichen Medium vereinigt.

2.4.2. Nährmedien für *C. sporogenes*

C. sporogenes wurde in verschiedenen Medien kultiviert, wobei überwiegend 2YT-Medium (Bertram et al., 1990; mod.) Verwendung fand. Für die Herstellung von Plattenmedien wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt. Da die Nährmedien für *C. sporogenes* anaerob sein mussten, wurde das verwendete H_2O für ca. 10 min gekocht, anschließend im Eisbad unter ständiger Begasung mit N_2 abgekühlt und luftdicht verschlossen. Die Fertigstellung der Medien erfolgte in der Anaerobenkammer.

2YT-Medium (Bertram et al., 1990; mod.)

Trypton	30 g	3 % (w/v)
Hefeextrakt	20 g	2 % (w/v)
Na-Thioglycolat	1 g	8,7 mM
H_2O	ad 1000 ml	

2YT-Medium (Oultram et al., 1988; mod.)

Trypton	16 g	1,6 % (w/v)
Hefeextrakt	10 g	1,0 % (w/v)
NaCl	5 g	86 mM
H_2O	ad 1000 ml	

2YTG-Medium (Oultram et al., 1988; mod.)

Glucose × H_2O	5 g	25 mM
Trypton	16 g	1,6 % (w/v)
Hefeextrakt	10 g	1,0 % (w/v)
NaCl	5 g	86 mM
H_2O	ad 1000 ml	

2.4.3. Medienzusätze

Die Blau-Weiß-Selektion kann als erster Hinweis dienen, um nach der Ligation eines DNA-Fragments in die multiple Klonierungsstelle (engl: multiple cloning site) eines entsprechenden Plasmids (z.B. pUC18, pDrive, u.a.m.) potentiell positive Klone zu identifizieren. Hierfür wurden die in der nachfolgenden Tabelle 15 aufgeführten Substanzen verwendet. Das jeweilige Lösungsmittel zur Herstellung der Stammlösung ist ebenfalls in der entsprechenden Spalte aufgeführt:

Tabelle 15: Medienzusätze bei der Blau-Weiß-Selektion

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

Die in der Zellkultivierung eingesetzten Antibiotika sind in der unten stehenden Tabelle 16 aufgelistet. In der Spalte „Stammlösung“ sind zudem die benutzten

Lösungsmittel angegeben. Clarithromycin wurde in mit HCl angesäuertem H_2O gelöst und anschließend mit NaOH auf pH 6,5–7,0 eingestellt.

Tabelle 16: Verwendete Antibiotika

Substanz	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]
Ampicillin, Na-Salz	100 (H_2O)	100
Chloramphenicol	15 (Ethanol, 96 % (v/v))	15
Thiamphenicol	15 (Ethanol, 96 % (v/v))	15
Clarithromycin	15 (H_2O)	7,5
Kanamycin	30 (H_2O)	30
Erythromycin	50 (Ethanol, 50 % (v/v))	250
Spectinomycin	50 (H_2O)	50
Tetracyclin-HCl	20 (H_2O)	20
Colistin-Natriummethansulfat	10 (H_2O)	10

Tetracyclin wurde aufgrund seiner Lichtsensitivität dunkel gelagert. Bei der Herstellung von Plattenmedien wurden nach Abkühlung der Medien auf ca. 50 °C die Antibiotika in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben.

2.4.4. Anzuchtbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium. Diese wurden meist bei 37 °C auf einem Rundschüttler bei 170-200 U/min inkubiert. Sofern für diesen Organismus schädliche Plasmide bzw. Gene eingebracht wurden, erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur. Dadurch wurde die Wachstumsgeschwindigkeit und somit die Kopienzahl der Plasmide pro Zelle reduziert.

Sollte die Kultivierung von *E. coli* in größeren Volumina erfolgen, wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Volumen der Kolben das 10fache der Füllmenge betrug, um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgte bei 18 °C (für kaltkompetente Zellen) oder bei 37 °C (Überexpressionsversuche).

Zur Anzucht von *C. sporogenes* wurden 0,1-0,2 ml einer sporenhaltigen Stammhaltungskultur mittels einer Spritze steril entnommen und in ein neues, mit 5 ml anaerobem Medium befülltes Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc.; Vineland, USA) injiziert. Größere Zellmengen wurden in 125-ml-, 500-ml- oder 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen (Müller & Krempel; Bülach, Schweiz) mit Naturgummistopfen und Edelstahlschraubdeckel kultiviert. Aufgrund der starken Bildung von Gasen während der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterienkulturen wurden die größeren Flaschen mit 500 ml oder 1000 ml Volumen innerhalb dieses Zeitraums mehrmals mittels steriler Kanülen entlüftet.

2.4.5. Bestimmung von Wachstumsparametern

Um das Wachstum von Bakterienkulturen überwachen zu können, wurden deren optische Dichten photometrisch bei einer Wellenlänge (λ) von 600 nm bestimmt. Die Messungen erfolgten in 1-ml-Halbmikroküvetten (VWR International GmbH; Darmstadt) mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer. Das jeweils verwendete unbewachsene Medium diente als Leerwert. Um im linearen Bereich des Messgerätes (0,03 – 0,3) zu arbeiten wurden bei Werten über 0,3 die Proben mit sterilem Medium verdünnt.

Zur Bestimmung des pH-Werts im Verlauf des Wachstums einer Bakteriensuspension wurden 2 ml der Kultur steril entnommen, für 5 min bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand in ein Reagenzglas überführt. Die Messung erfolgte mittels eines Präzisions-pH-Meters.

2.4.6. Stammhaltung

Die Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen erfolgte, indem 500 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 500 µl 100 %igem, sterilem Glycerin (v/v) gemischt und bei -85 °C gelagert wurden.

Aufgrund der ausgeprägten Fähigkeit von *C. sporogenes,* Endosporen zu bilden wurde dieser Organismus in Hungate-Röhrchen, die steriles anaerobes Medium enthielten, bei 28 °C für 7-14 Tage inkubiert. Anschließend wurde die Sporenbildung mit einem Mikroskop kontrolliert und die Kultur bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.4.7. Sporenpräparationen

Um Sporen von *C. sporogenes* zu erhalten, wurde das Bakterium in 500 ml 2YT-Medium unter anaeroben Bedingungen angezogen und die Kultur für mindestens 14 Tage bei 28 °C gelagert. Zur Kontrolle der Sporenbildung wurde ein Tropfen der Kultur unter dem Mikroskop betrachtet. Für die Präparation wurde der gesamte Ansatz aerob zentrifugiert (8000 g, 30 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Um verbliebene vegetative Bakterien zu töten, wurde jedes Sediment in einem Volumen 80 %igem Ethanol gelöst und bei RT für 45 Minuten inkubiert. Die Ernte der Sporen erfolgte durch eine nochmalige Zentrifugation (8000 g, 30 min, 4 °C). Zur Entfernung von Verunreinigungen wurde das Sediment in einem Volumen sterilem PBS suspendiert und nochmals sedimentiert (8000 g, 30 min, 4 °C). Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt und das Sediment anschließend in 2,5 ml sterilem PBS gelöst. Zur abschließenden Kontrolle wurde wiederum ein Tropfen der Suspension auf einen Objektträger übertragen und unter dem Mikroskop betrachtet. Der Rest der Suspension wurde bei -85 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.8. Plasmid „clearing“

Um einen Klon, der bereits ein Plasmid enthielt, von diesem zu befreien wurde ein Plasmid „clearing“ durchgeführt. Hierfür wurde die Kultur zunächst auf einer selektiven Agarplatte vereinzelt, die einzelnen Klone in nicht-selektive 5-ml-Reagenzgläser übertragen und inkubiert. Dieser Übertragungsschritt wurde täglich über einen Zeitraum von 4 Wochen wiederholt. Nach dieser Zeit wurden Aliquots dieser Kulturen auf nicht-selektiven Mediumplatten vereinzelt. Die gewachsenen Klone wurden in einem festgelegten Raster auf eine neue nicht-selektive Agarplatte übertragen. Von dieser wurden nach der Inkubation die Klone mittels steriler Stempel auf selektive Agarplatten ausgebracht. Die Klone, die auf diesen Antibiotika-haltigen Agarplatten nicht mehr wuchsen, hatten ihr Plasmid verloren (Negativ-Selektion).

2.5. Arbeiten mit DNA

2.5.1. Vorbereitung von Lösungen, Geräten und Materialien

Um die für die Arbeit mit Nukleinsäuren benötigten Geräte, Materialien und Lösungen von DNasen und RNasen zu befreien, wurden alle Geräte und Lösungen, sofern

diese hitzestabil waren, bei 121 °C und 200 kPa Druck für mindestens 15 min autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wurden sterilfiltriert und hitzeempfindliche Geräte und Materialien mit Ethanol (80 %, v/v) behandelt. Die Trocknung erfolgte anschließend unter einer Werkbank. Kleinteile aus hitzebeständigem Material (Glas, Stahl, usw.) wurden in Ethanol (96 %, v/v) getaucht und abgeflammt. Elektroporationsküvetten, sofern mehrfach verwendet, wurden nach Gebrauch mit H_2O und 80 %igem Ethanol gespült und in letzterem auch gelagert. Direkt vor einer erneuten Verwendung wurden sie für 20 min mit UV-Licht (= 365 nm) bestrahlt.

2.5.2. Plasmidpräparation aus *E. coli*

Abhängig vom jeweiligen Verwendungszweck der isolierten Plasmid-DNA wurden verschiedene Methoden und „Kits“ angewandt. Sofern aus einer großen Anzahl potentieller Klone zunächst eine Vorauswahl getroffen werden sollte, wurden die Präparationen ohne ein „Kit“ durchgeführt. Sollte die DNA anschließend jedoch für Arbeiten verwendete werden, die hohe Anforderungen an deren Reinheit stellten (z.B. DNA-Sequenzierung, präparativer Verdau mit Restriktionsenzymen, u.a.m.), wurden „Kits“ verwendet.

2.5.2.1. Plasmidpräparation nach Birnboim et al. (1979, mod.)

Viele Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen basieren auf der alkalischen Lyse der Zellen. Die verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung sind unter 2.2.4. zu finden. Es wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Zentrifugation von 1,5 ml Zellkultur für 1 min bei 10000 g und RT; den Überstand verwerfen
2. Suspendieren des Sediments in 300 µl eiskaltem Puffer L1
3. Zugabe von 300 µl frisch angesetztem Puffer L2 und vorsichtiges Mischen von Hand; 5 min Inkubation auf Eis (Lyse der Zellen)
4. Zugabe von 300 µl eiskaltem Puffer L3; vorsichtiges Mischen von Hand
5. Zentrifugation (10000 g, 15 min, 4 °C)
6. Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß (ausgefällte Proteine, chromosomale DNA und Zellreste bleiben im Sediment zurück)
7. Isopropanol- oder Ethanolfällung des Überstandes (siehe 2.5.3.2. und 2.5.3.1.)

Die so isolierte Plasmid-DNA ist meist noch stark verunreinigt, kann aber oft schon für Agarose-Gelelektrophoresen (siehe 2.5.5.) und-/oder Kontroll-Verdaus mit Restriktionsenzymen eingesetzt werden. Traten aufgrund der Verunreinigungen Probleme bei weiterführenden Versuchen auf, so wurde entweder die Isolation mit einem „Kit“ wiederholt, oder es wurde eine nachträgliche Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.5.3.3.) vorgenommen.

2.5.2.2. Plasmidpräparation nach Zhou et al. (1990)

Diese Methode beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und weist dieselben Einschränkungen in der Verwendung der isolierten Plasmid-DNA auf (siehe 2.4.2.1.). Die verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung sind unter 2.2.4. aufgeführt. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

1. Zentrifugation von 1,5 ml Zellkultur (130000 g, 1 min, RT), Überstand bis auf 50-100 µl verwerfen
2. Suspendieren des Sediments im verbliebenen Überstand
3. Zugabe von 300 µl der TENS-Lösung und 5 s kräftig mischen (Zelllyse)
4. Zugabe von 150 µl der Birnboim-Acetat-Lösung und 5 s stark schütteln
5. Zentrifugation (bei 13000 U/min, 2 min, RT)
6. Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß (ausgefällte Proteine, chromosomale DNA und Zellreste bleiben im Sediment zurück)
7. Isopropanol- oder Ethanolfällung des Überstandes (siehe 2.5.3.2. und 2.5.3.1.)

Die Verunreinigungen der so isolierten Plasmid-DNA mit Proteinen und Salzen verursachen oftmals Probleme bei vielen weiterführenden Versuchen. Sollte die DNA weiterverwendet werden, so wurde eine Extraktion mit Phenol-Chloroform (siehe 2.5.3.3.) vorgenommen. Für Agarosegelelektrophoresen (siehe 2.5.5.) und-/oder Kontroll-Verdaus mit Restriktionsenzymen konnte sie aber meist ohne zusätzliche Reinigungsschritte verwendet werden.

2.5.2.3. „GFX™ Micro Plasmid Prep-Kit“

Zur Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA (3-6 µg) aus *E. coli* wurde u.a. der „GFX™ Micro Plasmid Prep-Kit“ (GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg) eingesetzt.

Dieses Verfahren beruht auf der durch chaotrope Salze vermittelten selektiven Bindung von DNA an eine Glasfasermatrix und der anschließenden Elution mit Wasser oder einem Puffer geringer Ionenstärke.

Hierfür wurden 1,5 ml einer Übernacht-Kultur in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und bei RT zentrifugiert (10000 g, 1 min). Das Zellsediment wurde anschließend nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll behandelt.

Die so gewonnene DNA zeichnet sich durch einen hohen Reinheitsgrad aus und ist ohne Nachbehandlung (Isopropanol- oder Ethanolfällung, Phenol-Chloroform-Extraktion) für die weitere Verwendung (präparativer Verdau mit Restriktionsenzymen, Sequenzierung, usw.) geeignet.

2.5.2.4. „E.N.Z.A.® Plasmid Miniprep Kit I“

Dieser von dem Unternehmen PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) bezogene „Kit“ beruht auf demselben Verfahren wie auch der „GFX™ Micro Plasmid Prep-Kit“.
Die Plasmid-DNA bindet nach erfolgter Zelllyse aufgrund der Anwesenheit chaotroper Salze an eine Silica-Matrix und kann anschließend von dieser mittels H_2O oder TE-Puffer eluiert werden.

Für die Gewinnung der Plasmid-DNA wurden 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Kultur in ein 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei RT abzentrifugiert (10000 g, 1 min). Das Zellsediment wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Verfahren behandelt.

Die gewonnene DNA zeichnet sich durch einen hohen Reinheitsgrad aus und ist ohne Nachbehandlung für die weitere Verwendung geeignet.

2.5.2.5. „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“

Zur Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA (3-6 µg) aus *E. coli* wurde u.a. der „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ (Hiss Diagnostics GmbH; Freiburg) eingesetzt. Dieses Verfahren beruht auf der durch chaotrope Salze vermittelten selektiven

Bindung von DNA an eine Glasfasermatrix. Die Elution der DNA kann mit Wasser oder einem Puffer geringer Ionenstärke erfolgen.

Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurden 1,5 ml einer Übernachtkultur in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und bei RT zentrifugiert (3000 g, 5 min). Die Lyse der Zellen wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt. Um die DNA-Ausbeute und deren Reinheit zu erhöhen, wurde abweichend zu dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll die Dauer aller Zentrifugationsschritte, die der Waschung dienen, verdoppelt. Zudem wurde der Zentrifugationsschritt, während dem die Bindung der DNA an die Matrix erfolgt, auf 5 min bei 2000 g verlängert.

Die so gewonnene DNA zeichnet sich durch eine hohe Reinheit aus und ist ohne Nachbehandlung (Isopropanol- oder Ethanolfällung, Phenolextraktion) für die weitere Verwendung geeignet.

2.5.3. Fällung und Reinigung von DNA

2.5.3.1. Ethanolfällung

Eine Standardmethode zur Fällung und/oder Konzentrierung von Nukleinsäuren ist die Ethanolpräzipitation. Dabei wird ausgenutzt, dass DNA in Anwesenheit von monovalenten Kationen einen unlöslichen Niederschlag bildet, welcher durch eine Zentrifugation gut von der wässrigen Phase getrennt werden kann.

Die zu fällende DNA-Lösung wurde zunächst mit 3 M Na-Acetat (pH 5,2) auf 10 % (v/v) eingestellt, so dass die Endkonzentration des Salzes 0,3 M betrug. Anschließend erfolgte die Zugabe eines 2,5- bis 3fachen Volumens der Lösung an Ethanol (96 %, v/v) und eine Inkubation für 30 min bei -20 °C. Die präzipitierte DNA konnte dann durch eine Zentrifugation (12000 g, 20 min, 4 °C) abgetrennt werden. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml 70 %igen und -20 °C kalten Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (12000 g, 20 min, 4 °C) erfolgte die Trocknung des DNA-Sediments bei 37 °C auf dem Heizblock. Dieser Schritt ist nötig, um eine vollständige Verdunstung des verbliebenen Alkohols zu gewährleisten, da dieser bei der weiteren Verwendung der DNA (Restriktionsverdau, Ligation, usw.) stören würde. Das Lösen des getrockneten Präzipitats erfolgte in 50 µl H_2O.

2.5.3.2 Isopropanolfällung

Eine weitere Möglichkeit um wässrige DNA-Lösungen zu entsalzen, stellt die Isopropanolfällung dar. Deren Vorteil ist, dass die Fällung bei Raumtemperatur stattfindet, so dass weniger Salze mit ausgefällt werden und die DNA somit reiner ist. Des Weiteren ist das Gesamtvolumen relativ klein, so dass der Aufwand geringer als bei der Ethanolfällung ist.

Zunächst wurde die Probe mit 0,8-1,0 Volumen 100 %igem Isopropanol gemischt. Während einer 30 minütigen Inkubation bei RT präzipitierte die DNA und konnte anschließend durch eine Zentrifugation (12000 g, 30 min, RT) von der wässrigen Phase abgetrennt werden. Das Sediment wurde, wie unter 2.5.3.1 beschrieben, mit 1 ml Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Das Lösen des Sediments erfolgte in 50 µl H_2O.

2.5.3.3. Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion ist eine Methode zur Entfernung von Proteinverunreinigungen aus nukleinsäurehaltigen wässrigen Lösungen. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Denaturierung der störenden Eiweiße und deren anschließende Abtrennung durch Zentrifugation.

Die verunreinigte DNA-haltige wässrige Probe wurde zunächst mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v), Sambrook und Russell., 2001; RotiPhenol™) versetzt und gründlich gemischt. Die Trennung der beiden Phasen erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt (10000 g, 5 min, RT). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, wobei darauf zu achten war, dass nichts von der proteinhaltigen Interphase mit übernommen wurde. Diese Schritte wurden wiederholt, bis keine Proteininterphase mehr zu erkennen war. Die Entfernung des restlichen Phenols aus der Probe erfolgte mittels der Zugabe von 1 Volumen eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1 (v/v)). Dieser Schritt ist essentiell, da verbliebenes Phenol alle folgenden Versuche stören würde. Nach erfolgter Mischung der Probe und anschließender Zentrifugation (10000 g, 5 min, RT) wurde die obere Phase erneut entnommen und die so erhaltene DNA-Lösung einer Fällung (2.5.3.1 oder 2.5.3.2) unterzogen.

2.5.3.4. Mikrokonzentratoren

Eine andere Möglichkeit zur Reinigung von DNA-haltigen Lösungen sind die „Microcon-100“-Konzentratoren. Diese Methode ist schnell und verzichtet auf gesundheitsschädliche Chemikalien, jedoch werden nicht alle störenden Proteine und Verunreinigungen entfernt.

Zunächst wurde die wässrige Probe auf die Separationsmembran der Konzentratoren pipettiert und diese bei 6000 g zentrifugiert, bis noch ein Restvolumen von ca. 20 µl auf der Membran vorhanden war. Eine zusätzliche Entsalzung und Reinigung erfolgte, indem zweimal 200 µl steriles H_2O dazu gegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt wurde. Die Elution der DNA erfolgte durch umgedrehtes Einsetzen des Konzentrators in ein steriles 1,5-ml-Eppendorfgefäß und einer anschließenden Zentrifugation bei 10000 g für 1 min.

2.5.3.5. „DNA Clean & Concentrator™-5 Kit“

Um Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen zu isolieren, wurde u.a. der „DNA Clean & Concentrator™-5 Kit“ verwendet. Hierbei wurde die Probe mit dem zweifachen Volumen (v/v) „DNA Binding Buffer“ versetzt, gut gemischt und anschließend auf die mitgelieferte „Zymo-Spin™“ Säule mit Sammelgefäß überführt. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde abweichend vom Protokoll des Herstellers der folgende Zentrifugationsschritt modifiziert (2000 g, 5 min, RT). Danach erfolgte zweimalig in Waschschritt, wobei je 200 µl des Waschpuffers auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 10000 g und RT zentrifugiert wurden. Vor der Elution der DNA mit 15 µl H_2O wurde die Säule in ein steriles 1,5-ml-Eppendorf überführt und bei 37 °C auf dem Heizblock vollständig getrocknet.

2.5.3.6. „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit”

Um DNA-Fragmente verschiedener Länge voneinander separieren zu können, wurde das zu trennende Gemisch auf ein entsprechendes Agarosegel geladen und elektrophoretisch getrennt (siehe 2.5.5.). Nach dem Gellauf und dessen Färbung im Ethidiumbromidbad wurde die entsprechende Bande auf einem UV-Schirm (λ = 365 nm) ausgeschnitten und in ein steriles 2-ml-Eppendorfgefäß überführt und

das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Die Exposition des Gels sollte aufgrund der DNA-schädigenden Wirkung des UV-Lichts möglichst kurz gehalten werden. Das weitere Vorgehen erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen wurde abweichend zum empfohlenen Protokoll der Zentrifugationsschritt, währenddem die DNA an die Matrix bindet, modifiziert (2000 g, 5 min, RT). Die beiden Waschschritte erfolgten mit je 200 µl des Waschpuffers und die zugehörigen Zentrifugationen bei 10000 g für 1 min bei RT. Vor der Elution der DNA mit 15 µl H_2O wurde die Säule in ein steriles 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und bei 37 °C auf dem Heizblock vollständig getrocknet.

2.5.3.7. „UltraClean™ 15 DNA Purification Kit“

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten einer bestimmten Länge wurde u.a. der „UltraClean™ 15 DNA Purification Kit“ verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der durch chaotrope Salze vermittelten selektiven Bindung von DNA an eine Glasfasermatrix, die bei diesem „Kit“ als Glasmilch vorliegt. Die Elution erfolgte mit H_2O.

Nach der elektrophoretischen Trennung der Fragmente und Färbung des Gels wurde die entsprechende Bande auf einem UV-Schirm (λ = 365 nm) ausgeschnitten und in ein steriles 2-ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Exposition des Gels sollte aufgrund der DNA-schädigenden Wirkung des UV-Lichts möglichst kurz gehalten werden. Nach der Gewichtsbestimmung des Gelstückes erfolgte die Zugabe der dreifachen Menge (w/v) „UltraSalt“-Lösung. Das Erhitzen des Ansatzes auf 55 °C diente der Verflüssigung des Gels. Anschließend wurden 8 µl „UltraBind“ (enthält die Silica-Matrix) zugegeben, die Probe gut gemischt und für 5 Minuten unter gelegentlichen leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bindet die DNA an die Glasfasermatrix. Ein Zentrifugationsschritt (10000 g, 1 min, RT) diente der Sedimentation der nun mit DNA beladenen Silica-Matrix; der Überstand wurde verworfen. Die Waschung der DNA erfolgte durch Suspendierung des Sediments in 1 ml „UltraClean“-Lösung mittels kräftigen Schüttelns und eines Zentrifugationsschrittes (10000 g, 1 min, RT); der Überstand wurde verworfen. Nach der vollständigen Trocknung des Sediments auf dem Heizblock bei 37 °C wurde es in 25 µl H_2O gelöst und unter gelegentlichem Schütteln für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Elution der DNA). Eine erneute Zentrifugation (10000 g, 1 min, RT) trennte die DNA-haltige wäßrige Phase von der Glasmilch. Erstere wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Zur Reinigung und Isolierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen konnte ebenfalls dieser „Kit“ verwendet werden. Analog zu dem bereits oben beschriebenen Vorgehen wurde das dreifache Volumen (v/v) an „UltraSalt“-Lösung (bezogen auf das Probenvolumen) zu der DNA-Lösung gegeben. Der restliche Ablauf war identisch.

2.5.4. Präparation chromosomaler DNA

2.5.4.1. „AquaGenomic™ Solution for isolation and purification of genomic DNA“

Dieser „Kit“ diente zur schnellen Isolierung geringer Mengen chromosomaler DNA aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Die Reinheit der so gewonnenen DNA ist gering, jedoch als „Template“ für eine PCR zur Amplifizierung gewünschter Sequenzen ausreichend. Zudem kann auf die Anwendung gesundheitsschädlicher Chemikalien verzichtet werden. Im Folgenden sind die verwendeten Protokolle für die Isolierung der Gesamt-DNA aufgeführt.

Gram-negative Bakterien:

1. Zentrifugation von 1 ml einer Übernachtkultur bei 10000 g für 1 min bei RT; der Überstand wurde verworfen
2. Zugabe von 100 µl der „AquaGenomic^{TM} Solution“ und gründliches Resuspendieren des Zellsediments
3. Inkubation für 15 min bei 65 °C auf dem Heizblock mit anschließendem starkem Mischen
4. Zentrifugation (bei 10000 g, 2 min, RT) und Überführung des Überstandes in ein steriles 1,5-ml-Eppendorfgefäß
5. Isopropanol-Fällung des Überstandes (siehe 2.5.3.2.)
6. Lösen des getrockneten Sediments in 100 µl H_2O

Gram-positive Bakterien:

1. Zentrifugation von 2 ml einer Übernachtkultur bei 13000 U/min für 1 min bei RT; der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml Kaliumphosphatpuffer gelöst

2. Zugabe von 10 µl Lysozymlösung (200 mg/ml) und Inkubation für 1 h bei 37 °C
3. Zugabe von 500 µl Glaskügelchen (Ø 0,1 mm, BioSpec Products Inc., Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe) und 100 µl der „AquaGenomic^{TM} Solution“ und gründliches Mischen
4. Inkubation für 15 min bei 65 °C auf dem Heizblock, danach gründliches Mischen
5. Zentrifugation (bei 10000 g, 2 min, RT) und Überführung des Überstandes in ein steriles 1,5-ml-Eppendorfgefäß
6. Isopropanol-Fällung des Überstandes (siehe 2.5.3.2.)
7. Lösung des getrockneten Sediments in 100 µl H_2O

2.5.5. Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese

Dieses Verfahren ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülgröße. Sofern ein Vergleich mit einem definierten DNA-Marker vorgenommen werden soll, muss die DNA linear vorliegen.

Agarose besteht aus glykosidisch verbundener D-Galactose und 3,6-Anhydro-galactose. Die Nukleinsäuren können in dieser Matrix in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen ihres Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats zur Anode (Pluspol) wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Molekülgröße, die Konformation der Nukleinsäure, die Agarosekonzentration sowie die Höhe der angelegten Gleichspannung beeinflusst.

Die eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente und bewegt sich zwischen 0,8 (für Fragmente > 500 Bp) und 2 % (für Fragmente < 500 Bp). Die Auflösungsgrenze wird in der Literatur (Lottspeich und Zorbas, 1998) mit ca. 100 Bp angegeben und die Nachweisgrenze liegt bei etw. 5 ng/Bande. Für die Auftrennung von analytischen Restriktionsverdauen wurden die Gele möglichst dünn gegossen, da dies eine hohe Bandenschärfe ermöglicht. Für präparative Ansätze wurden dicke Gele bevorzugt, um diese mit dem größtmöglichen Probenvolumen (~ 15 µl) beladen zu können.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 oder 2 % (w/v) verwendet, die in horizontalen Kammern eigener Bauart unter Verwendung passender Kämme gegossen wurden. Nach dem Aushärten eines Gels wurde dieses mit Laufpuffer (1x TAE-Puffer) überschichtet und der Kamm vorsichtig

entfernt. Die entstandenen Taschen wurden mit dem Puffer ausgespült. Zur Markierung der Lauffront und zur Beschwerung der Proben wurden diese vor dem Auftragen mit dem Ladepuffer „6x Loading Dye Solution“ (Fermentas GmbH; St. Leon-Rot) im Verhältnis 5:1 versetzt. Eine Größenbestimmung der Nukleinsäuren wurde durch das Auftragen von 3 µl des „GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix“-Größenstandards ermöglicht. Der Gellauf erfolgte durch das Anlegen einer Feldstärke von 10-20 V/cm über eine Distanz von 7 cm. Um die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel anschließend für 10-15 Minuten abgedunkelt in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) inkubiert. Das Verfahren beruht darauf, dass Ethidiumbromid-Moleküle zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkalieren. Dadurch wird das Anregungsspektrum des Ethidiumbromids verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit UV-Licht stark erhöht. Die sichtbar gewordenen Nukleinsäuren konnten photografiert und ausgewertet werden.

2.5.6. Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgte photometrisch bei den Wellenlängen (λ) von 260 und 280 nm. Der Quotient aus den beiden Werten sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Liegt er darunter, so ist die Nukleinsäure noch stark mit Proteinen verunreinigt und bedarf einer weiteren Reinigung. Eine Extinktion $(E)_{260\ nm}$ von 1 entspricht ca. einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook und Russell, 2001).

Für einige Methoden, bei denen nicht die absolute Nukleinsäurekonzentration sondern das Verhältnis wichtig war (z.B. bei einer Ligation), wurde eine Konzentrationsschätzung anhand des Vergleichs mit einem Größenstandard vorgenommen, da von letzterem die DNA-Menge für jede Bande bekannt ist.

2.5.7. Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.7.1. Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Die meisten verwendeten Restriktionsenzyme gehören dem Typ II an. Sie benötigen somit kein ATP für ihre Aktivität, haben spezifische Erkennungssequenzen (meist eine Abfolge von 6-8 Basenpaaren) und erzeugen definierte DNA-Enden. Die

Aktivitätsangabe erfolgt in der Einheit Unit (U), wobei 1 U der Menge des Enzyms entspricht, die benötigt wird, um innerhalb 1 h bei optimalen Reaktionsbedingungen 1 µg DNA zu spalten. Analytische Restriktionsverdaue bestanden meist aus einem 20-µl-Gesamtansatz:

Restriktionsenzym	0,5-1 µl	5-10 U
Zugehöriger 10x Enzympuffer	2 µl	
DNA	x µl	1 µg
H_2O	ad 20 µl	

Die Inkubation erfolgte überwiegend bei 37 °C für 1-3 h, gefolgt von einem Inaktivierungsschritt bei 80 °C für 20 min.

Sofern ein präparativer Verdau durchgeführt wurde, bestand ein Ansatz aus 50 µl, so dass anschließend für die weitere Verwendung ausreichend geschnittene DNA gewonnen werden konnte:

Restriktionsenzym	1-2 µl	10-20 U
Zugehöriger 10x Enzympuffer	5 µl	
DNA	x µl	2,5 µg
H_2O	ad 50 µl	

Bei allen Reaktionen wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt. Wurde ein Verdau mit zwei Enzymen gleichzeitig durchgeführt, so musste u.U. ein Puffer gewählt werden, in dem eines oder auch beide Enzyme nur eine verminderte Aktivität aufwiesen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C (oder der vom Hersteller angegebenen Temperatur) für 3 Stunden oder über Nacht. Besonders bei dem Verdau von PCR-Fragmenten wurde die letztgenannte Variante bevorzugt, da die Erkennungssequenzen der Enzyme meist am Ende der Fragmente lagen, was die Schnitteffizienz negativ beeinflusst.

Die Analyse der Restriktionsspaltung erfolgte durch Auftrennung der Proben mittels einer 0,8 %igen (w/v) Agarosegelelektrophorese (siehe 2.5.5.) und die Aufreinigung enzymatisch geschnittener DNA mittels eines der schon beschriebenen „Kits“ (siehe 2.5.3.5. – 2.5.3.7.).

2.5.7.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (Sambrook und Russell, 2001, mod.)

Um die unerwünschte und für einen hohen Hintergrund sorgende Religation des Vektors bei einem Ligationsversuch zu minimieren, wurden die nach einer Restriktionsspaltung vorhandenen 5'-Phosphatreste enzymatisch durch Phosphatasen entfernt. Überwiegend wurde dafür die „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP) verwendet, da diese in allen Puffern der verwendeten Restriktionsenzyme eine hohe Aktivität aufweist. Für die Dephosphorylierung von 1 µg DNA wurden 10 U (1 µl) des Enzyms eingesetzt und der Ansatz bei 37 °C für 30-60 min inkubiert. Auf eine anschließende Hitzeinaktivierung konnte verzichtet werden, da geschnittene Plasmide stets mittels 0,8 %iger Gele gereinigt wurde. Erfolgte die Dephosphorylierung mit der „Antarctic Phosphatase“, so wurde dies stets in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt und war mit einem Hitzeinaktivierungsschritt (65 °C für 20 min) gekoppelt.

„Shrimp Alkaline Phosphatase“	(SAP)	10 U/µl
„Antarctic Phosphatase“		10 U/µl

Nach erfolgter Dephosphorylierung wurde die DNA über ein „Kit“ gereinigt (siehe 2.5.3.5. – 2.5.3.7.) und für weitere Versuche verwendet.

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

Die Ligation von gereinigten DNA-Fragmenten erfolgte in 20-µl-Ansätzen. Hierbei wurden das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA oftmals variiert (abhängig von der Menge der zur Verfügung stehenden DNA), wobei ein Verhältnis von 1:3, 1:5 oder 1:8 bevorzugt wurde. Die Ligation erfolgte entweder bei konstanten 16 °C oder mittels einer sogenannten Gradienten-Ligation über Nacht. Bei letztgenanntem Verfahren wurden die Ligationsansätze im PCR-Block bei 22-16 °C inkubiert, wobei jede Stunde die Temperatur um 1 °C reduziert wurde. Bei 16 °C erfolgte dann die restliche Inkubation bis zum Morgen. Alle Ligationsansätze wurden anschließend einer Hitzeinaktivierung (65 °C, 20 min) unterzogen. Wurden kaltkompetente Zellen verwendet, so konnte eine Ligation ohne weitere Reinigungschritte in die Transformation eingesetzt werden, andernfalls erfolgte noch ein Entsalzungsschritt.

2.5.7.4. „QIAGEN PCR Cloning Kit" (QIAGEN GmbH; Hilden)

Dieser „Kit" wurde verwendet, um gereinigte PCR-Fragmente mittels deren A-Überhänge in den linearisierten Sequenzierungs-Vektor pDrive zu ligieren. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Ein Standard-Ansatz ist im Folgenden aufgeführt, und die Inkubationszeit betrug 30 min.

„2x Ligation Master Mix"	5	µl		
pDrive	1	µl	50	ng
PCR-Produkt	1-4	µl		
H_2O	ad 10	µl		

2.5.7.4. Sequenzierung von DNA (Sanger et al., 1977)

Das am häufigsten angewandte Sequenzierverfahren beruht auf der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). Vom Prinzip her eine Standard-PCR (siehe 2.5.8.1.), werden hierbei der DNA-Polymerase neben dNTPs, die für Synthese eines Komplementärstranges benötigt werden, auch geringe Mengen ddNTPs (Didesoxy-nukleotide) angeboten. Diese besitzen am 3'-Ende keine OH-Gruppe, wodurch nach deren Einbau die Strangsynthese nicht weitergeführt werden kann: der Strang bricht ab. Durch die nur geringe Menge an ddNTPs kommt es zu statistisch verteilten Unterbrechungen im Komplementärstrang. Die daraus resultierenden, verschieden langen DNA-Fragmente zeigen in einem Polyacrylamidgel (Sequenziergel) ein größenabhängiges Laufverhalten. Die Detektion erfolgt durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der ddNTPs. Aus den so gewonnenen Daten kann die Sequenz der eingesetzten DNA ermittelt werden.

Für Sequenzierungen von Plasmiden wurde 1 µg einer mit einem „Kit" gereinigten (und evtl. zusätzlich mit Isopropanol gefällten) Plasmid-DNA in 15 µl Gesamtvolumen aufgenommen. Die für die Sequenzierungen notwendigen Oligodesoxynukleotide wurden dem Ansatz in einer Konzentration von 20 pmol/µl zugegeben oder es wurden die entsprechenden Sequenzdaten bei der Online-Bestellung mit angegeben. Die Ansätze wurden zu der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg geschickt, welche die Sequenzierungen durchführte.

2.5.8. Amplifikation von DNA mittels der Polymerasekettenreaktion

2.5.8.1. Die Standard-PCR

Ohne die Polymerasekettenreaktion (engl.: PCR; Saiki et al., 1985 und 1988) und ihre Variationen wäre die moderne Molekularbiologie nicht denkbar. Mit dieser in vitro-Methode können spezifische DNA-Bereiche effizient vervielfältigt und ggf. modifiziert werden. Als Startpunkt der Amplifikation dienen zwei, im Regelfall 20-30 Bp lange, Oligodesoxynukleotide, die als „Primer" bezeichnet werden. Diese werden chemisch synthetisiert und sind jeweils komplementär zu einem der beiden 3'-Einzelstrangenden des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges. Im Idealfall sollte die Sequenz der künstlichen Oligodesoxynukleotide so gewählt werden, dass der (GC)-Gehalt 50 % beträgt, was jedoch abhängig vom Organismus und der zu vervielfältigenden Sequenz oft nicht möglich ist. Um nach der spezifischen Anlagerung des „Primers“ an den komplementären DNA-Einzelstrang eine effiziente Verlängerung des 3'-Endes des Oligodesoxynukleotids durch eine hitzestabile DNA-Polymerase zu ermöglichen, sollten an diesem Ende 2-3 Nukleotide liegen, die Cytosin oder Guanin als Base tragen. Dies stabilisiert den Startpunkt der Amplifikation, da diese Basen drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und so das 3'-Ende der Oligodesoxynukleotide fest an den Komplementärstrang binden. Im Gegensatz zum 3'-Ende muss das 5'-Ende der „Primer“ nicht zwingend homolog zu der Sequenz des zu amplifizierenden Stranges sein. Dies ermöglicht das Einfügen von Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, durch die die Insertion in einen gleichartig geschnittenen Vektor erfolgen kann. Um unerwünschte Sekundär-strukturen zu vermeiden, wird darauf geachtet, dass innerhalb der „Primer“ nicht mehr als vier gleiche Basen in Folge auftreten und keine Sequenzabfolgen vorliegen, die mit sich selbst hybridisieren könnten. Die Hybridisierungstemperatur wird ca. 3-5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur T_m der verwendeten „Primer“ angesetzt, welche mit folgender Formel näherungsweise berechnet werden kann (Suggs et al., 1981):

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

Eine übliche PCR umfasst 30-40 Zyklen, die jeweils aus drei Schritten bestehen:

1. Der Doppelstrang des zu amplifizierenden DNA-Fragments, auch als „Template“ oder Matrize bezeichnet, wird thermisch denaturiert und liegt

anschließend einzelsträngig vor. Dieser Schritt erfolgt initial bei 94 °C für 5 Minuten. Bei jedem weiteren Zyklus wird er auf 1 Minute bei 94 °C verkürzt.

2. Die Temperatur wird auf die gewünschte Hybridisierungstemperatur abgesenkt, so dass die Oligodesoxynukleotide aufgrund ihrer Sequenzhomologie an die einzelsträngige „Template"-DNA spezifisch binden. Die Zeit, die dafür nötig ist, ist von den „Primern" abhängig und beträgt im Mittel ca. 1 min.
3. Einstellung der Temperatur auf das Temperaturoptimum der hitzestabilen DNA-Polymerase. Eine solche Polymerase ist z. B. die sogenannte *Taq*. Sie stammt aus dem hyperthermophilen Organismus *Thermus aquaticus* und besitzt ein Aktivitätsoptimum von 72 °C. Dieses Enzym vermag, zusammen mit den ebenfalls im Ansatz enthaltenen dNTPs, die „Primer" an deren 3'-Ende zu verlängern (Elongation), wobei die Sequenz des Matrizenstrangs als Vorlage dient. Jede DNA-Polymerase kann pro Minute nur eine gewisse Anzahl von Nukleotiden in den Strang einbauen, so dass die Dauer dieses Schrittes von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes und der Geschwindigkeit des Enzyms abhängt.

Diese 3 Schritte werden 30-40mal wiederholt, wobei theoretisch mit jedem Zyklus eine Verdopplung der Zahl der DNA-Moleküle stattfindet. In der folgenden Tabelle 17 ist die Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes aufgeführt. Die Tabelle 18 zeigt ein typisches PCR-Programm:

Tabelle 17: Zusammensetzung einer PCR

Bestandteil	Volumen	Menge/Ansatz
DNA	x µl	100 ng
10x Reaktionspuffer mit $MgCl_2$	5 µl	-
„Primer 1"	2 µl	20 pmol
„Primer 2"	2 µl	20 pmol
dNTPs	5 µl	je 0,2 mmol
DNA-Polymerase	1 µl	1 U
H_2O	ad 50 µl	

Tabelle 18: Standard-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Anlagerung	x[(1)] °C	45 s
Elongation	72 °C	x[(2)] min
Finale Elongation	72 °C	10x[(3)] min

[(1)] Berechnung der Temperatur nach obiger Formel

[(2)] Elongationszeit abhängig von der DNA-Polymerase und der Fragmentlänge

[(3)] 10x die Elongationszeit

Zur Kontrolle einer PCR wurde ein Aliquot jedes Ansatzes auf ein 0,8 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen. Sofern das Amplifikat weiter verwendet werden sollte, erfolgte anschließend ein Reinigungsschritt (siehe 2.5.3.5. – 2.5.3.7.).

2.5.8.2. Die Gradienten-PCR

Um die optimale Hybridisierungstemperatur einer PCR experimentell zu bestimmen kann eine Gradienten-PCR durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wird eine PCR-Maschine mit einem Gradientenblock benötigt. Dieser ermöglicht es, für jede seiner 12, mit jeweils 8 Reaktiongefäßen bestückbaren, Spalten eine gesonderte Hybridisierungtemperatur anzugeben. Nach der PCR wurden Aliquots aller Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Temperatur jenes Ansatzes, bei dem das gewünschte Produkt in größter Reinheit und/oder Menge vorhanden ist, dient anschließend als Hybridisierungstemperatur für die weiteren PCR-Ansätze mit diesen „Primern“.

2.5.8.3. „PureTaq Ready-to-Go PCR-beads-Kit“

Die „Beads“ dieses „Kits“ bestehen im Wesentlichen aus lyophilisierten PCR-Ansätzen. Sie enthalten die Polymerase, den Puffer inklusive $MgCl_2$, die dNTPs sowie diverse Chemikalien, die die Effizienz der PCR erhöhen sollen. Einzig die „Template“-DNA, die beiden „Primer“ und H_2O (ad 25 µl) mussten zugegeben werden. Dieser „Kit“ wurde meist dazu verwendet, um „Primer“ auf ihre Tauglichkeit

hin zu überprüfen oder um schwer zu amplifizierende DNA-Sequenzen (z.B. bei Sekundärstrukturen, bei sehr geringen DNA-Mengen und bei verschmutzter DNA) zu vervielfältigen. Die Anwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Da die in diesem „Kit“ verwendete Polymerase über keine „Proofreading“-Aktivität zur Fehlerkorrektur verfügt, wurde ggf. 1 U eines Enzyms mit dieser Eigenschaft zugesetzt.

2.5.8.4. „FailSafe™ Enzyme Mix“

Dieses „Kit“ besteht aus einem Mix hitzestabiler DNA-Polymerasen und bis zu 12 Komplettpuffern (Puffer A bis L genannt) doppelter Arbeitskonzentration. Diese enthalten neben den benötigten Salzen auch dNTPs und diverse Zusätze, die die Effizienz der Amplifikation erhöhen. Jede dieser Lösungen ist für ein bestimmtes Einsatzgebiet (Sekundärstrukturen, hoher oder niedriger (GC)-Gehalt, große Fragmentlängen, u.s.w.) vom Hersteller optimiert worden. Der Puffer E wurde für die Amplifikation von Fragmenten mit niedrigem (GC)-Gehalt entwickelt. Er wurde bei Reaktionen verwendet, bei denen clostridielle DNA-Sequenzen vervielfältigt wurden. Die besten Resultate wurden mit der Anwendung des Puffers E in Kombination mit der „ReproFast“-Polymerase erzielt. Es wurde das Standard-PCR-Programm verwendet. Die Bestandteile eines Ansatzes sind in der folgenden Tabelle 19 aufgeführt:

Tabelle 19: PCR-Ansatz mit Puffer E

Bestandteil	Volumen	Menge/Ansatz
DNA	x µl	100 ng
Puffer E	25 µl	-
„Primer 1“	2 µl	20 pmol
„Primer 2“	2 µl	20 pmol
DNA-Polymerase (ReproFast)	1 µl	1 U
H_2O	ad 50 µl	

2.6. Arbeiten mit RNA

2.6.1. Vorbereitung von Lösungen, Geräten und Materialien

Um die ubiquitär vorkommenden sehr stabilen RNasen zu inaktivieren, wurden alle benötigten Geräte, Materialien und Lösungen, sofern diese hitzestabil waren, zweimal bei 121 °C und 200 kPa Druck für mindestens 20 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Geräte und die Arbeitsbereiche wurden mit „RNase-ExitusPlus™“ (AppliChem GmbH; Darmstadt) behandelt und luftgetrocknet. Bei allen Arbeiten wurden Handschuhe getragen.

2.6.2. Präparation von RNA aus *C. sporogenes*

Für die Isolierung wurden Bestandteile des „RNeasy Midi Kit“ (QIAGEN GmbH; Hilden) verwendet.

Von einer über Nacht bei 37 °C gewachsenen *C. sporogenes*-Kultur wurden 15 ml in ein steriles 15-ml-Falcon-Röhrchen übertragen und bei 5000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde in 1 ml TE-Puffer gelöst und das Röhrchen anschließend mit TE-Puffer aufgefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 5000 g für 10 min bei 4 °C, wobei anschließend der Überstand verworfen wurde. Die Zellen wurden in 800 µl RLT-Puffer gelöst und 10 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Dieses Gemisch wurde in „Cryotubes“ verteilt und fünfmal für je 30 s im Ribolyser™ aufgeschlossen. Nach der folgenden Zentrifugation für 15 min bei 15000 g und 4 °C wurde der Überstand aus je zwei „Ribotubes“ in ein steriles 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt. In jedes dieser Röhrchen wurden anschließend 2,4 ml RLT-Puffer, 2,8 ml 100 %iger Ethanol und 24 µl β-Mercaptoethanol gegeben und vorsichtig gemischt. Der vollständige Ansatz wurde auf die „Midi Spin“-Säulen mit Sammelgefäß gegeben und für 10 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im ersten Waschschritt wurden auf jede Säule 4 ml RW1-Puffer pipettiert, im zweiten 2,5 ml RPE-Puffer. Nach der Zugabe jedes Puffers wurde für 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 5000 g diente der vollständigen Trocknung der Säulenmembran. Anschließend wurden die Säulen auf neue und sterile 15-ml-Falcon-Röhrchen verteilt. Die Elution erfolgte mit 2 x 150 µl sterilem und 50 °C

warmen H_2O pro Säule. Dabei wurden diese mit dem H_2O vor den Zentrifugationen (5000 g, RT) immer für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.6.3. DNase-Verdau

Das Enzym DNase wurde verwendet um unerwünschte DNA aus einer RNA-Präparation zu entfernen. Ein Standardansatz ist in der unten stehenden Tabelle 20 aufgeführt. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 25 °C.

Tabelle 20: Standard-DNase-Verdau

Bestandteil	Volumen	Menge/Ansatz
Eluat	50 µl	
10x DNase-Puffer	10 µl	
DNase	10 µl	100 U
H_2O	ad 100 µl	

Die RNA wurde vor der weiteren Verwendung gereinigt, wobei die Extraktion analog zu der bereits in Punkt 2.5.3.3. beschriebenen Methode erfolgte. Es war darauf zu achten, dass alle Materialien und Lösungen, sofern möglich, doppelt autoklaviert waren. Anschließend wurde eine Ethanolfällung der RNA durchgeführt. Die Überprüfung der RNA auf weitere DNA-Verunreinigungen erfolgte durch eine PCR mit den „PureTaq Ready-to-Go PCR-Beads" (siehe 2.5.8.3.).

2.6.4. Ethanolfällung von RNA

Die Fällung der RNA erfolgte analog zu der unter 2.5.3.1. beschriebenen Methode. Abweichend dazu wurde 2 M Na-Acetat verwendet und die Fällung fand über Nacht bei -20 °C statt. Des Weiteren wurde der Zentrifugationsschritt auf 2 h bei 15000 g und 4 °C ausgedehnt. Die Trocknung des RNA-Sediments wurde in der Vakuumzentrifuge ohne zusätzliches Heizen durchgeführt. Die Lösung der RNA erfolgte in 15 µl RNase-freiem H_2O.

2.6.5. Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration kann photometrisch bei den Wellenlängen (λ) 260 und 280 nm bestimmt werden. Der Quotient aus den beiden Werten sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Liegt er darunter, so ist die Nukleinsäure stark mit Proteinen verunreinigt und bedarf einer weiteren Reinigung. Eine OD_{260} von 1 entspricht ca. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook und Russell, 2001).

2.6.6. RT-PCR

Um ein Transkript nachzuweisen, muss zunächst die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies wird durch eine RNA-abhängige-DNA-Polymerase („M-MuLV Reverse Transcriptase“, Fermentas GmbH; St. Leon-Rot) katalysiert. Das zugehörige Protokoll ist nachfolgend aufgeführt.

Schritt 1:

RNA	x µl	1 µg
„Primer 1“	1 µl	100 pmol
H_2O	ad 11 µl	

Der Ansatz wurde in ein RNase-freies 0,25-ml-Eppendorfreaktionsgefäß mit Deckel geben und bei 70 °C für 30 min inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, so dass der „Primer 1“ binden kann. Zu diesem Ansatz wurden im 2. Schritt folgende Komponenten hinzugefügt:

Schritt 2:

5x Reaktionspuffer	4 µl	
RiboLock™ RNaseinhibitor	1 µl	40 U
dNTP-Mix (je 10 mM)	2 µl	0,1 mM
M-MuLV Reverse Transcriptase	2 µl	40 U

Es erfolgte eine Inkubation für 60 min bei 37 °C auf einem PCR-Block. Das Erhitzen der Reaktionsgefäße auf 70 °C für 10 min beendete die Reaktion.

Der letzte Schritt ist eine Standard-PCR, bei der die einzelsträngige cDNA als Matrize dient. Für diesen Schritt wurden ebenfalls die „PureTaq Ready-to-Go PCR-beads” (siehe 2.5.8.3.) verwendet. Der Ansatz dieser PCR ist unten aufgeführt:

„Template“	20 µl	
„Primer 2“	1 µl	100 pmol
„Ready-to-Go PCR Beads“	1 Stk.	
H_2O	ad 25 µl	

2.6.7. Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese mit RNA

Das Vorgehen erfolgte analog zu der unter 2.5.5. beschriebenen Methode. Abweichend dazu wurde die RNA-Probe mit 1 Volumen des „2x RNA-Loading Dye“ (Fermentas GmbH; St. Leon-Rot) versetzt. Dieser enthält schon Ethidiumbromid, so dass nach dem Gellauf keine weitere Färbung des Gels notwendig ist. Zudem wurde darauf geachtet, dass die verwendete Agarose frisch angesetzt und die Kammer vor der Benutzung gründlich mit RNase-ExitusPlus™ gereinigt wurde.

2.7. DNA-Transfer in Zellen

2.7.1. Herstellung kaltkompetenter *E. coli* (Inoue et al., 1990)

Die Herstellung kaltkompetenter *E. coli* erfolgte in einem mit 250 ml SOB-Medium gefüllten 1-l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Ein Wasserbad mit integriertem Schüttler wurde auf eine Inkubationstemperatur von 18 °C temperiert. Nach der Inokulation mit einer bei 37 °C über Nacht gewachsenen Kultur der gewünschten Zellen auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1 wurden diese bei 18 °C bis zu einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6-0,8 kultiviert. Dies nahm, abhängig vom verwendeten Stamm und den eingesetzten Antibiotika, zwischen 24 und 48 h in Anspruch. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurde die Kultur für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellernte erfolgte mittels einer Zentrifugation für 10 min bei 4000 g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in ca. 80 ml eiskaltem TB-Puffer suspendiert, 10 min auf Eis gehalten und abermals zentrifugiert. Das Zellsediment wurde nun in 20 ml kaltem TB-Puffer gelöst und auf Eis langsam mit sterilem DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) versetzt. Die Zugabe erfolgte in kleinen Volumina, um ein Ausfallen des DMSO zu verhindern. Anschließend wurde die Zellsuspension in 200-µl-Aliquots in sterile 1,5-ml-Eppendorfgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte bei -85 °C. Um die Qualität der kompetenten Zellen zu bestimmen, wurde eine 200-µl-Probe jeder

Charge mit 10 ng Plasmid-DNA (z. B. pUC18 in der ccc-Konformation) transformiert. Bei dieser Überprüfung sollten etwa 100 Klone pro Agarplatte wachsen.

2.7.2. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* (Dower et al., 1988)

Ein mit 250 ml LB-Medium gefüllter 1-l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurde mit einer Vorkultur des gewünschten *E. coli*-Stammes auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bis zu einer $OD_{600\ nm}$ von 0,5-0,7 bei 37 °C auf dem Schüttler und 120-150 U/min. Nach dem Erreichen dieser Zelldichte wurde die Kultur für 30 min auf Eis gehalten und anschließend in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt. Die Zellernte erfolgte durch eine Zentrifugation für 10 min bei 4000 gund 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 250 ml (1 Volumen) eiskaltem sterilen H_2O suspendiert. Nach einer Zentrifugation mit denselben Einstellungen wurde der Bodensatz in 125 ml (½ Volumen) kaltem H_2O gelöst und erneut sedimentiert. Im letzten Waschschritt wurde das Sediment in 25 ml (1/10 Volumen) sterilem, 10 %igen (v/v) und eiskalten Glycerin gelöst und nach nochmaliger Zentrifugation in 0,5 ml (1/500 Volumen) kaltem 10 %igen (v/v) Glycerin suspendiert. Das Abschütten des Überstandes wurde vorsichtig durchgeführt, da das Zellsediment mit jedem vollzogenen Waschritt instabiler wird. Die Zellsuspension wurde anschließend in 50-µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -85 °C bis zum Gebrauch gelagert. Auch hier wurde zur Überprüfung der Qualität der Zellen eine Probe mit 10 ng Plasmid-DNA in der ccc-Konformation transformiert.

2.7.3. Herstellung schnellkompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung schnellelektrokompetenter Zellen wurden 2-ml-Aliquots einer 5-ml-LB-Übernacht-Kultur von *E. coli* auf sterile 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt und diese für 1 min bei 8000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml sterilem und eiskalten H_2O suspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt, um Reste des Mediums und störende Ionen zu entfernen. Anschließend folgte eine gleichartige Waschung der Zellen mit eiskalter und steriler Glycerin-Lösung (10 % Glycerin (v/v)). Nach einer Zentrifugation wurde das Zellsediment in 100 µl eiskalter steriler Glycerin-Lösung (10 % Glycerin (v/v)) aufgenommen und konnte in 50-µl-Aliquots direkt für eine Elektroporation eingesetzt oder bei -85 °C gelagert werden. Die Transformationseffizenz dieser elektrokompenten Zellen ist merklich geringer als für

die nach dem Standardverfahren erzeugten. Aus diesem Grund wurden mit diesen Zellen keine Transformation von Ligationen durchgeführt, sondern nur Plasmidpräparationen für die DNA-Übertragung verwendet.

2.7.4. Transformation kaltkompetenter *E. coli*

Für die Hitzeschock-Transformation wurden die kaltkompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Die Zugabe der zu übertragenden DNA erfolgte in Form eines Ligationsansatzes (20 µl/Transformation) oder einer Plasmidpräparation (0,5-1,0 µl/Transformation, dies entspricht etwa 100-200 ng DNA). Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und für 30 min bewegungslos auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C auf dem Heizblock, wobei vorher in den Block etwas bidestilliertes H_2O gefüllt wurde. Anschließend wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt und für weitere 30 min inkubiert. Nach der Zugabe von SOC-Medium wurden die Ansätze für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Für CPE-Expressions-Konstrukte wurde diese Temperatur auf 25 °C erniedrigt und die Dauer auf 3 h erhöht, um die Produktion der Fusionsproteine zu minimieren. Nach dieser Zeitspanne wurden 150-µl-Aliquots den Ansätzen entnommen und mittels Glasperlen direkt auf selektiven Agarplatten ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde ggf. durch einen Zentrifugationsschritt (3000 g, 3 min, RT) geerntet und der Überstand mit einer Pipette bis auf ca. 200 µl entfernt. In diesem Rest des Mediums wurde das Sediment suspendiert und ebenfalls auf selektiven Agarplatten ausplattiert. In der Tabelle 21 sind die einzelnen Schritte für die Transformation von kaltkompetenten *E. coli* XL1-Blue MRF' und XL2-Blue gegenüber gestellt:

Tabelle 21: Transformation kaltkompetenter *E. coli*

Schritt	***E.coli* XL2-Blue**	***E. coli XL*1-Blue**
Auftauen	auf Eis	auf Eis
Aliquotgröße der Zellsuspension	12 µl	200 µl
Volumen DNA-Lösung	3 µl	20 µl
Erste Inkubation auf Eis	30 min	45 min
Hitzeschock (42 °C)	30 s	1 min 30 s
Zweite Inkubation auf Eis	2 min 30 s	10 min
Zugabe von Medium	SOC, 250 µl, RT	SOC, 800 µl, RT
Inkubation bei 37 °C	60 min	60 min

Ausplattieren	65- und 200-µl-Aliquots	200 µl, der Rest nach der Zentrifugation

2.7.5. Elektrotransformation elektrokompetenter *E. coli*

Die Transformation von DNA mit Hilfe der Elektroporation ist für die verwendeten Zellen eine sehr schädigende Methode. Hierbei wird die mit der DNA versetzte Zellsuspension zwischen die Platten eines Kondensators gegeben und kurzzeitig eine Spannung von mehreren tausend Volt pro Zentimeter angelegt. Dadurch wird die geladene Zellmembran kurzzeitig perforiert, was zur Aufnahme der DNA in die Zellen führt. Viele Zellen werden jedoch letal geschädigt, weshalb – im Vergleich zu der verwendeten Zellanzahl bei einer Hitzeschock-Transformation – sehr viel mehr Zellen in einem Ansatz vorhanden sein müssen. Um einen zu starken Stromfluß durch die Suspension zu verhindern, ist es notwendig, die Konzentration freier und mit der Zellhülle assoziierter Ionen zu verringern. Dies geschieht durch eine Dialyse der zu transformierenden DNA-Lösung vor dem Versuch und durch die Waschschritte während der Herstellung der Zellen. DNA aus Plasmidpräparationen, die mittels eines „Kits“ durchgeführt wurden, sind ohne zusätzliche Entsalzung verwendbar.

Für die Durchführung einer Elektroporation von *E. coli* wurden 50-µl-Aliquots der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Des weiteren wurden je 100 ng DNA aus einer Plasmidpräparation oder 3-5 µl eines Ligationsansatzes in gekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,2 cm, Biozym Scientific GmbH; Oldendorf) vorgelegt und die Zellen hinzupipettiert. Vor der Gabe des Spannungsimpulses von 2,5 kV (200 Ω Widerstand und 25 µF Kapazität) am „Gene Pulser® II“ mit „Pulse Controller Plus“ (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) erfolgte eine Inkubation des Ansatzes von fünf Minuten auf Eis. Die Zeitkonstante einer Transformation sollte ca. 5 ms betragen. Nach der Impulsgabe wurden sofort 800 µl SOC-Medium in die Küvetten gegeben, die Suspension gemischt und in ein steriles 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Regeneration erfolgte für eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler bei ca. 200 U/min. Sofern für *E. coli* schädliche DNA-Konstrukte übertragen wurden, wurde die Inkubation bei RT für 3 h durchgeführt. Nach dieser Zeitspanne wurden je 200 µl der Ansätze auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die Zellen der verbliebenen Suspension wurden durch eine schonende Zentrifugation (3000 g, 3 min, RT) geerntet und der Überstand

bis auf einen Rest von ca. 200 µl abgenommen. In diesem wurde das Sediment suspendiert und auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert.

2.7.6. X-Gal-Färbung zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

Um nach einer durchgeführten Ligation mit anschließender Transformation eine Vorauswahl unter den gewachsenen, potentiell positiven Klonen treffen zu können, kann bei einigen Vektor-*E. coli*-Stamm-Kombinationen der Blau-Weiß-Test (X-Gal-Färbung) verwendet werden. Ein Beispiel für solche Vektoren sind z.B. die pUC-Plasmide. Durch eine gezielte Deletion (lacIqZDM15, Vieira und Messing, 1982) ist es den *E. coli*-Stämmen XL1- und XL2-Blue nicht möglich, eine funktionsfähige β-Galactosidase zu bilden. Dieser Defekt kann durch einen auf den pUC-Vektoren liegenden Genort (*lacPOZ'*) komplementiert werden und somit die Bildung einer funktionellen β-Galactosidase ermöglichen. Dieser Genort ist durch die MKS (multiple Klonierungsstelle) des Vektors unterbrochen, welche etwa in der Mitte dieses Locus liegt. Die Bildung des für die X-Gal-Färbung notwendigen Proteins wird durch sie jedoch nicht behindert, da keine Verschiebung des Leserasters erfolgt und die zusätzlich in das Protein eingefügten Aminosäuren dessen Funktionalität nicht beeinträchtigen. Wird durch eine erfolgreiche Ligation ein DNA-Fragment in diese MKS eingefügt, so kann aufgrund dieser zusätzlichen Sequenzinformation keine funktionierende β-Galactosidase mehr gebildet werden. Dieses Enzym vermag – neben dem natürlichen Substrat Laktose - das synthetische Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galaktosid (X-Gal) zu spalten. Dies führt bei Anwesenheit von O_2 dazu, dass ein blauer Indigofarbstoff entsteht. Wurden die Transformanten auf Agarplatten ausplattiert, die X-Gal enthielten, so konnten die nach ein paar Tagen gewachsenen Kolonien anhand ihrer Färbung getrennt werden. Die weißen Kolonien stellten die Klone dar, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ein Fragment in der MKS ihres Plasmids trugen, während die Blauen die unerwünschten Religanten waren. Eine ständige Derepression des lacPOZ' wurde durch den Induktor IPTG gewährleistet.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden 1 h vor der Verwendung der selektiven Agarplatten 40 µl X-Gal-Lösung und 20 µl IPTG-Lösung (siehe 2.4.3.) ausplattiert und diese bei 37 °C getrocknet.

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

Für die Konjugationsexperimente wurde der *E. coli*-Donorstamm CA434 mit dem zu übertragenden konjugativen Plasmid in 5 ml LB-Medium aerob über Nacht angezogen. Am nächsten Morgen wurde ein 1-ml-Aliquot der stationären Kultur bei 3000 g für 3 min zentrifugiert und das Sediment zur weiteren Bearbeitung in die Anaerobenkammer eingeschleust. Durch eine zweimaliges Waschen der Zellen in je 1 ml sterilem, anaeroben PBS-Puffer wurden Medienrückstände und die darin enthaltenen Antibiotika entfernt. Die Suspendierung der Zellen erfolgte sehr vorsichtig und mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze, um ein Abscheren der konjugativen Pili zu verhindern. Nach der letzten Zentrifugation wurde das *E. coli*-Zellsediment vorsichtig in 200 µl einer stationären *C. sporogenes*-Kultur aufgenommen. Dieses Gemisch wurde unter anaeroben Bedingungen auf gut getrocknete und nicht selektive 2YT-Medium-Agarplatten in 10-µl-Aliquots verteilt und bei 37 °C für 7-8 h anaerob inkubiert, wobei die Platten nicht invertiert wurden. Nach dieser Zeitspanne wurden die Zellen 2 bis 3 Mal mit jeweils 0,5 ml sterilem anaeroben PBS-Puffer von der Agarplatte abgewaschen bzw. mit Einweg-Impfösen abgeschabt. Das Konjugationsgemisch wurde auf selektiven 2YT-Medium-Agarplatten ausplattiert, mit Parafilm versiegelt und anaerob bei 37 °C für 3-5 Tage inkubiert. Eine Selektion gegen den *E. coli*-Donorstamm erfolgte mit Colistin (10 mg/ml, H_2O), welches unwirksam gegen Gram-positive, aber letal für Gram-negative Bakterien ist (Böhringer, 2002; Bertram et al., 1991).

2.7.8. Elektrotransformation von *C. sporogenes* (Oultram et al. 1988, mod.)

C. sporogenes wurde in einer mit 100 ml anaerobem 2YTG-Medium befüllten 500-ml-Müller-Krempel-Flasche bei 37 °C kultiviert, bis die Zelldichte eine $OD_{600\ nm}$ von 0,6 erreichte. Das Inokulum für einen solchen Ansatz bestand aus 5 ml einer ebenfalls in 2YTG-Medium angezogenen Vorkultur. Nach dem Animpfen wurde diese $OD_{600\ nm}$ nach ca. 2-3 Stunden Wachstum bei 37 °C erreicht. Anschließend wurde die Kultur in die Anaerobenkammer eingeschleust und mehreren Waschschritten unterzogen um die Zellen auf die Aufnahme von DNA vorzubereiten. Dazu erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension für 10 min bei 2200 g und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und die Zellen in 10 ml kaltem (4 °C) Elektroporationspuffer (siehe 2.2.5.) gelöst. Nach erneuter Sedimentation (2200 g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 5 ml frischem Elektroporationspuffer aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Parallel wurden 1-2 µg Plasmid-DNA in gekühlte Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrodenabstand) vorgelegt. In diese wurden

anschließend 800-µl-Aliquots der Zellen pipettiert. Nach einer erneuten Inkubation für 8 min auf Eis wurde die Elektroporation durch einen einzigen Spannungsimpuls durchgeführt. Die Einstellungen des „Gene Pulser® II“ mit „Pulse Controller Plus“ waren 25 µF, 100 Ω und eine Feldstärke von 6,25 kV/cm. Die Zeitkonstanten lagen zwischen 8-12 ms. Nach dem Impuls wurden die Ansätze für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann in 800 µl kaltes (4 °C) 2YTG-Medium überführt. Für die Regeneration der Zellen erfolgte eine Inkubation für 4 h bei 37 °C. Anschließend wurde von jedem Ansatz ein 200-µl-Aliquot entnommen, das als Inokulum für ein Hungate-Röhrchen (jedes befüllt mit 5 ml selektiven 2YTG-Medium) diente. Der Rest wurde in 200-µl-Aliquots auf selektiven 2YTG-Agarplatten ausplattiert und mit Parafilm vor dem Austrocknen geschützt. Nach einer Inkubation von 3-5 Tagen bei 37 °C konnten die gewachsenen Kolonien in Flüssigmedien überimpft werden. Aufgrund von Exonukleasen, die von *C. sporogenes* aktiv ausgeschleust werden, wurde den verwendeten Lösungen Aurintricarbonsäure zugesetzt, welche die Plasmid-DNA vor einer enzymatischen Degradation schützen sollte.

2.7.9. Elektrotransformation von *C. sporogenes* (Liu et al., 2002)

Die Anzucht von *C. sporogenes* erfolgte in mit 100 ml anaerobem 2YTG-Medium befüllten 500-ml-Müller-Krempel-Flaschen bei 37 °C. Nach dem Erreichen einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6 wurde die Bakterienkultur in die Anaerobenkammer eingeschleust. Um die Zellen elektrokompetent zu machen, wurden die Kultur zunächst bei 2200 g für 10 min bei 4 °C sedimentiert und der Überstand abgeschüttet. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem (4 °C) Waschpuffer (siehe 2.2.5.) resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (2200 g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 3 ml frischem kalten Elektroporationspuffer aufgenommen und für 10 min auf Eis gelagert. Dann wurden 800-µl-Aliquots in gekühlte Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrodenabstand) überführt, die bereits 1-5 µg der DNA enthielten. Diese Ansätze wurden 8 min auf Eis gehalten, woran sich die Elektroporation anschloss. Die Einstellungen des „Gene Pulser® II“ mit „Pulse Controller Plus“ waren 25 µF, 100 Ω und eine Feldstärke von 6,25 kV/cm. Nach dem Impuls wurden die Küvetten für 10 min auf Eis inkubiert, in jede 800 µl kaltes (4 °C) 2YTG-Medium pipettiert und in ein steriles Hungate-Röhrchen überführt. Zur Regeneration der Zellen schloss sich eine 4stündige Inkubation bei 37 °C an. Von jedem Ansatz wurde ein Aliquot entnommen, welches als Inokulum für ein Hungate-Röhrchen (befüllt mit 5 ml 2YTG-Medium) diente. Der Rest wurde in 200-µl-Portionen auf selektiven 2YTG-Agarplatten ausplattiert und diese mit Parafilm versiegelt. Nach einer Inkubation von 3-5 Tagen bei 37 °C konnten die gewachsenen Kolonien in Flüssigmedien überimpft werden.

Allen Lösungen wurden kurz vor deren Gebrauch Aurintricarbonsäure zugesetzt, um die eingesetzte Plasmid-DNA vor der enzymatischen Degradation durch clostridielle Exonukleasen zu schützen.

2.8. Arbeiten mit Proteinen

2.8.1. Herstellung von Zelllysaten

Um Zellen aufzuschließen, wurden 2 Methoden verwendet, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

2.8.1.1. French® Pressure Cell-Press

Bei dieser Methode werden Bakterien mit einem Druck von 12,5 MPa durch eine Düse aus einer gekühlten Druckzelle gepresst. Durch den darauf folgenden Druckabfall platzen die Zellen auf und geben ihren Zellinhalt frei. Da dieser Vorgang sehr schonend für Proteine ist (keine Wärmefreisetzung), ist das Verfahren immer dann vorzuziehen, wenn funktionelle und/oder empfindliche Proteine isoliert werden sollen. *E. coli*-Zellen benötigen zur vollständigen Lyse 2-3 Durchgänge durch die Presse. Zur Kontrolle wurde das Zelllysat stets unter einem Mikroskop betrachtet. In dieser Arbeit wurde diese Aufschlussmethode angewandt, wenn Proteine mit einem „His-Tag“ mittels einer Ni-NTA-Säule gereinigt werden sollten.

Die Ernte einer 500-ml-*E. coli*-Kultur ($OD_{600\ nm}$ ~ 2-3) erfolgte durch eine Zentrifugation für 10 min bei 5000 g und 4 °C. Das Zellsediment wurde in 30 ml 10 mM Imidazolpuffer suspendiert und in ein steriles 50-ml-Falconröhrchen überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5000 g, 4 °C und 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment über Nacht bei -85 °C eingefroren. Danach wurden pro Gramm Sediment-Gewicht 3 ml 10 mM Imidazolpuffer zugegeben und die Zellen darin suspendiert. Für den „French Press“-Aufschluss wurden große Kammern verwendet. Nach 2-3 Durchläufen wurden die Zelltrümmer durch einen Zentrifugationsschritt für 30 min bei 15000 g und 4 °C sedimentiert und der Protein-Rohextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.8.1.2. Ribolyser™ Cell Disruptor

Ein anderes Verfahren, um Zellen quantitativ aufzuschließen, bedient sich des „RibolyserTM Cell Disruptors“ und wurde angewendet, wenn eine Immunfärbung durchgeführt werden sollte. Dabei werden Zellen mit Hilfe von über alle Achsen rotierenden Glaskugeln mechanisch aufgerieben. Der Vorteil dieser Methode ist ihr geringer Zeit- und Materialaufwand, jedoch können die Proteine durch die freigesetzte Wärme in Mitleidenschaft gezogen werden. Für die Zellernte wurden 15 ml einer Kultur zentrifugiert (1 min, 10000 g, 4 °C) und das Zellsediment in 1 ml Aufschlusspuffer (20 mM KP-Puffer, pH 7,0) gelöst. Die Suspension wurde in ein Schraubdeckelgefäß mit 250 µl Glaskugeln (Ø 0,1 mm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen) überführt und 5 Mal bei 6,5 m/s für 45 s im Gerät aufgeschlossen. Um ein Denaturieren der Proteine durch die Reibungsenergie zu verhindern wurden die Gefäße zwischen den Aufschlussschritten für 3 min auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 15000 g und 4 °C konnte der Überstand (Protein-Rohextrakt) abgenommen werden.

2.8.2. BCA-Proteinbestimmung

Bei dieser Methode werden dem Testansatz das Natriumsalz der „Bicinchoninic acid“ (BCA) und Kupfer-II-Ionen (Smith et al., 1985) zugesetzt. In der folgenden Biuret-Reaktion (Levin und Brauer, 1951) reduzieren Proteine im alkalischen Milieu die Kupfer-II-Ionen zu Kupfer-I-Ionen. Diese bilden zusammen mit BCA im Verhältnis 1:2 einen purpurnen Farbkomplex.

Beide vom Hersteller gelieferte Lösungen „Reagenz A“ und „Reagenz B“ wurden im Verhältnis 50:1 zum BCA-Arbeitsreagenz vermischt. Zu 100 µl Probe wurden 2 ml des BCA-Arbeitsreagenz gegeben und dieser Ansatz für 30 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der Testansätze auf Raumtemperatur wurde die Extinktion jeder Probe bei einer Wellenlänge λ von 562 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Die Zuordnung des gemessenen Wertes erfolgte mittels einer Kalibrierreihe, die durch eine Doppelbestimmung mit Verdünnungen einer Rinderserumalbumin-Stammlösung (2 mg/ml, Pierce, Weiskirchen) erstellt wurde. Der lineare Messbereich lag zwischen 20-200 µg Protein/ml, die Nachweisgrenze bei 20 µg Protein/ml.

2.8.3. Mikrokonzentratorsäulen

Für die Konzentration von Proteinen wurden je nach Volumen der Probe „Centricon®“- oder „Microcon®“-Säulen (Millipore GmbH; Schwalbach) verwendet. Die verschiedenen Porengrößen der Filter dieser Säulen erlaubten eine grobe Trennung von Proteinen mit einer Masse zwischen 10 und 100 kDa sowie deren Entsalzung und Konzentrierung. Die Durchführung erfolgte nach dem empfohlenen Protokoll des Herstellers. Diese Methode wurde verwendet, um Proteine im Kulturüberstand von rekombinanten *C. sporogenes*- Stämmen von Medienresten zu trennen und zu konzentrieren. Hierfür wurde der Überstand mehrmals bei 4 °C über eine Säule konzentriert und anschließend weiter verwendet (Immunfärbung, siehe 2.8.8.).

2.8.4. Überexpression plasmidkodierter Proteine in *E. coli*

Die heterologe Überexpression plasmidkodierter Proteine erfolgte unter der Verwendung des pET29a-Vektors (Novagen R & D Systems; Wiesbaden), welcher einen IPTG induzierbaren T7*lac*-Promoter trägt, der nur von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. In Abwesenheit des Induktors wird dieser Promoter durch die konstitutive Expression des ebenfalls auf dem Plasmid kodierten *lacI*-Repressorgens weitgehend reprimiert. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des ebenfalls mit IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promoters und ist auf dem Chromosom des verwendeten *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) lokalisiert. In Abwesenheit von IPTG wird der *lac*-Repressor (eine zweite Kopie des Gens liegt auf dem Chromosom des Stammes) konstitutiv exprimiert. Somit wird die Bildung der T7-RNA-Polymerase und zusätzlich die Expression des Gens in der MKS des Expressionsplasmids verhindert. Trotz dieser doppelten Sicherung kann eine schwache Hintergrundexpression nicht vermieden werden. Um störende Aktivität weiter zu minimieren, können die Plasmide pLysS oder pLysE verwendet werden. Diese tragen das Gen für einen spezifischen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase und können aufgrund ihres Replikationsursprungs (p15A) mit den pET-Vektoren in einer Zelle koexistieren. Ohne die *lacI*-reprimierten Promotoren des Expressionssystem mit IPTG zu induzieren, vermindert der konstitutiv gebildete Inhibitor die Hintergrundaktivität somit nochmals deutlich. Des Weiteren kann mit dem pET29a-Vektor bei Bedarf das in die MKS klonierte Gen am 3'-Ende mit einer Sequenz fusioniert werden, die 6 Histidine kodiert. Diese 6 am C-Terminus des Proteins eingefügten Aminosäuren können entweder als Epitop für einen spezifischen Antikörper (Immunfärbung, siehe 2.8.8.) oder als „His-Tag“ für eine Ni-NTA-Aufreinigung dienen.

Zur Überproduktion eines Proteins wurden 500 ml selektives LB- oder TB-Medium mit einer ÜN-Kultur des *E. coli*-Stamms mit dem gewünschten Plasmidkonstrukt auf eine $OD_{600\ nm}$ von 0,1 angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach dem Erreichen einer $OD_{600\ nm}$ von 0,6 bis 0,8 wurde die Kultur mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt, um die Expression zu starten. Zur Steigerung der Ausbeute kann der Kultur 30 min nach Induktion mit IPTG Rifampicin in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde bereits ausreichend T7-RNA-Polymerase gebildet, so dass durch die hemmende Wirkung des Antibiotikums auf die *E. coli*-RNA-Polymerase nur noch das unter dem T7*lac*-Promoter stehende Gen exprimiert wird. Zur Kontrolle der Versuche erfolgten Probennahmen direkt vor der Induktion und zum Zeitpunkt der Ernte (ca. 3 h nach der Induktion). Hierzu wurden 1 ml Zellsuspension entnommen, zentrifugiert (10000 g, 1 min, RT) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden bis zum Gebrauch auf Eis oder bei -20 °C aufbewahrt. Zur Ernte wurde die Kultur zunächst für 10 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit 100 ml eiskaltem TE-Puffer gewaschen, erneut sedimentiert und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.8.5. Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA

Die Aminosäure Histidin besitzt eine sehr hohe Affinität zu Nickel. Deshalb kann sie verwendet werden, um spezifisch rekombinante Proteine aufzureinigen, die einen sogenannten „His-Tag“ (6 Histidin-Reste) am N- oder C-Terminus tragen. Hierfür werden die Ni^{2+}-Ionen mit 4 ihrer 6 Koordinationsstellen an Agarose immobilisiert. Die frei zugänglichen Histidine der Fusionsproteine können an die verbleibenden freien Koordinationsstellen des Nickels binden. Diese Bindung ist reversibel und kann mit Imidazol, einem Strukturanalogon von Histidin, wieder gelöst werden (Schmitt et al., 1993).

Um einen Abbau des Proteins zu verhindern, werden alle Schritte der im Folgenden beschriebenen Methode bei 4 °C durchgeführt.

Für die Reinigung wurden die Säulen nach der Anleitung des Herstellers (MoBiTec GmbH; Göttingen) zusammengebaut und mit je 500 µl Ni-NTA-Agarose (Nickel-Nitrilotriessigsäure, Qiagen GmbH; Hilden) beladen, in eine Halterung gespannt und gewartet bis die Flüssigkeit herausgetropft war. Nun wurde die Säule bis zur Hälfte mit 10 mM Imidazolpuffer (siehe 2.2.6.) gefüllt, gut geschüttelt und wieder gewartet, bis die Flüssigkeit durchgetropft war (Äquilibrierung). Dann wurde der Rohextrakt

(siehe 2.8.1.1.) auf die Säule geladen, diese gut geschüttelt und für 5 min inkubiert. Die Bindung des Proteins an das Ni-NTA erfolgte während der Inkubation und des Durchtropfens der Flüssigkeit (der Durchfluss wurde gesondert aufgefangen). Dieser Schritt wurde wiederholt. Um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen, wurde die Säule mit 0,5 Säulenvolumen 30 mM Imidazolpuffer gewaschen. Das spezifisch gebundene Protein wurde mit Waschritten steigender Imidazol-Konzentration eluiert. Dabei wurde je 1 ml Puffer zugegeben, die Säule gut geschüttelt, 3 min inkubiert und dann die Flüssigkeit in je ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß durchtropfen gelassen. Folgende Konzentrationen und Volumina fanden Verwendung:

2 x 1 ml 75 mM Imidazolpuffer
2 x 1 ml 100 mM Imidazolpuffer
2 x 1 ml 200 mM Imidazolpuffer
2 x 1 ml 250 mM Imidazolpuffer
2 x 1 ml 1 M Imidazolpuffer

Die Fraktionen wurden getrennt aufgefangen und mittels einer SDS-PAGE bestimmt (siehe 2.8.7.), in welcher das gesuchte Protein eluiert wurde. So konnte für zukünftige Reinigungen dieses Proteins die optimale Imidazolkonzentration für die Eluierung ermittelt werden. Die Fraktionen mit dem gewünschten Protein wurde entweder sofort weiterverwendet oder mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -85 °C gelagert. Die Säulen können für weitere Reinigungen desselben Proteins wiederverwendet werden. Um restliches Protein zu entfernen, wurden diese deshalb mit einem Säulenvolumen 1 M Imidazolpuffer gewaschen, mit 30 %igem Ethanol gefüllt und verschlossen bei 4 °C gelagert.

2.8.6. Isolation bakterieller Cytosol- und Membranproteine (Penecky und Coon, 1996, mod.)

Zur Trennung membranassoziierter und cytosolischer Proteine wurde der Protein-Rohextrakt (siehe 2.8.1.2.) in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und auf 0,01 g austariert. Die Zentrifugation erfolgte für 1 h bei 4 °C und 45000 g in der Ultrazentrifuge. Der Überstand mit den darin enthaltenen Cytosolproteinen wurde vorsichtig abgenommen. Die Lagerung erfolgte entweder für kurze Zeit auf Eis oder die Probe wurde mit 0,2 Volumen Glycerin versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -85 °C eingefroren. Das Sediment wurde mittels eines Spatels in einen Handhomogenisator überführt und in 100 µl Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 1 mM Na-EDTA) aufgenommen. Diese Membran-

fraktion wurde kurzzeitig auf Eis gelagert oder mit 0,2 Volumen Glycerin versetzt und bei -85 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.8.7. Denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) ermöglicht die Auftrennung von Proteinlösungen entsprechend den molekularen Massen der darin enthaltenen Eiweiße. Sie diente zur Reinheitskontrolle von Proteinanreicherungen und zur Proteintrennung für Immunfärbungen.

Alle für diese Arbeit verwendeten Polyacrylamid-Gel bestanden aus einem Sammelgel und einem Trenngel, wobei sich diese Bereiche durch pH und Ionenstärke des verwendeten Puffers sowie durch die Acrylamid-Konzentration unterschieden. Die enthaltenen SDS-Moleküle lagern sich mit ihren hydrophoben Enden in die Proteine ein, wodurch diese denaturiert werden. Die negative Ladung der Dodecylsulfat-Moleküle überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass gewährleistet ist, dass alle Proteine gleichmäßig negative Ladungen tragen und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Auftrennung erfolgt daher im Idealfall nur über das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine aufgrund ihrer Massen. Kleinere Proteine können leichter durch die Polyacrylamid-Matrix wandern und gelangen somit schneller zur Anode als die größeren.

Die beiden für die Herstellung eines Gels verwendeten Glasplatten wurden mit 80 %igem Ethanol gereinigt. Beim Zusammenbau der Gelkammer wurde zwischen die beiden Platten ein Dichtungsgummi gelegt, um ein Auslaufen zu vermeiden. Anschließend wurde das 12 %ige Trenngel (siehe Tabelle 22) angesetzt und zügig zwischen die vorbereiteten Glasplatten bis ca. 2 cm unter die Oberkante der Ohrenplatte gegossen. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen im Gel entstanden. Um eine gleichmäßig ebene Oberfläche des Trenngels zu gewährleisten, wurde es mit H_2O überschichtet. Nach der Polymerisation des Gel wurde das Wasser wurde wieder abgegossen und das Sammelgel darüber geschichtet. In dieses wurde sofort ein Kamm zur Ausformung der Taschen gesteckt. Nach der Polymerisation wurde das Gel entweder sofort für die Elektrophorese verwendet oder in feuchte Tücher eingeschlagen und bei 4 °C für max. 3 Tage gelagert.

Tabelle 22: Gelzusammensetzungen für die SDS-PAGE

Bestandteile		Trenngel				Sammelgel
		8 %	10 %	12 %	15 %	4 %
H_2O	[ml]	4,58	4,17	3,75	3,13	3,25
Rotiphorese, 40 %	[ml]	1,67	2,08	2,50	3,12	0,50
APS, 10 %	[µl]	75,00	75,00	75,00	75,00	30,00
TEMED	[µl]	7,50	7,50	7,50	7,50	15,00
Trenngelpuffer	[ml]	2,08	2,08	2,08	2,08	-
Sammelgepuffer	[ml]	-	-	-	-	1,25

Die angegebenen Volumina sind für Gele der Größe 11 x 7 x 0,1 cm ausreichend. Der Start der Polymerisation wurde durch die Zugabe einer frisch angesetzten APS (Ammoniumpersulfat)-Lösung ausgelöst.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,25 Vol. des 4x Denaturierungspuffers (= Ladepuffer) bei 95 °C für 5 min gekocht und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden ca. 20 µl der Proben in die Taschen des mit 1x SDS-Elektrophorese-Puffers überschichteten Gels pipettiert. Der Gellauf wurde durch Anlegen einer Spannung von 50 V gestartet, und sobald die Bromphenolblaubande die Trenngelfront erreicht hatte, wurde auf 80 V erhöht.

2.8.7. „Semi-Dry-Western-Blot" (Towbin et al., 1979, mod.)

Um Proteine von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen zu übertragen, wurde zunächst das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Dann wurden 2 x 2 „Whatman" Papier-Stücke (Whatman International Ltd.; Maidstone, England) und eine Nitrocellulosemembran genau auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die beiden Filter und die Membran wurden in Transferpuffer (siehe 2.2.8.) getränkt und zusammen mit dem Gel auf der „Fastblot"-Apparatur Typ B33 (Biometra, Biometra GmbH; Göttingen) wie folgt angeordnet (Abbildung 1):

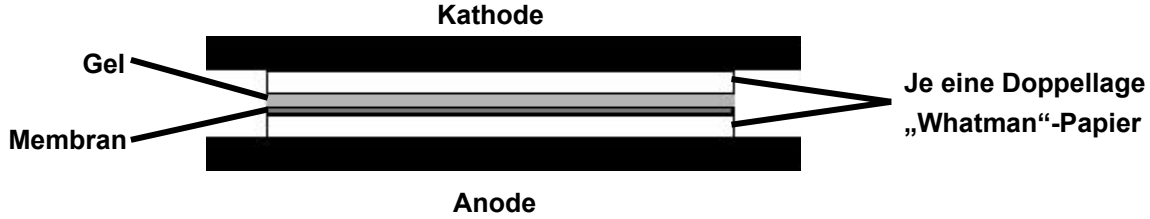


Abbildung 1: Schema eines "Western-Blot"-Aufbaus.

Die Kathode und Anode wurden zuvor mit dem Transferpuffer benetzt. Für die Übertragung der Proteine wurde eine konstante Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 Gelfläche für 1-2 h angelegt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Transfereffizienz ggf. durch eine Coomassie-Färbung (siehe 2.8.9.1.) des Polyacrylamidgels überprüft. Die Nitrocellulosemembran konnte sofort weiter verwendet werden.

2.8.8. Immunfärbung von Proteinen

Nach der Übertragung der in der SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Immunfärbung. Die Nitrocellulosemembran wurde über Nacht unter kontinuierlichem Schütteln in dem „Blocking“-Reagenz (siehe 2.2.8.) inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Es wurden jeweils 15 ml Wasch- und Reaktionslösungen für Nitrocellulosemembranen von 8,6 x 5,5 cm verwendet. Die Membran wurde 3x für jeweils 5 min bei RT mit frischem PBS-Puffer gewaschen, um überschüssiges „Blocking“-Reagenz zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem Erst-Antikörper gegen das auf der Membran immobilisierte und nachzuweisende Protein überschichtet. Die Stammlösung des Immunglobulins wurde 1:1000 in 15 ml PBS-Puffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation (1 h, RT unter sanftem Schütteln) wurde erneut 3x mit je 15 ml PBS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Erst-Antikörper zu entfernen. Der zweite, mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelte und gegen Epitope des Erst-Antikörpers gerichtete Zweit-Antikörper wurde ebenfalls 1:1000 in PBS-Puffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Eine weitere Inkubation für 1 h bei RT und unter schwachem Schütteln schloss sich an. Drei weitere Waschschritte der Nitrocellulosemembran mit je 15 ml PBS-Puffer (jeweils 10 Minuten auf dem Schüttler) dienten zur Entfernung von nichtgebundenen Antikörpern. Zur Detektion des Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers diente das Substrat 4-Chlor-1-Naphthol. 60 mg dieser Verbindung wurden vor der Färbung frisch in 10 ml Methanol gelöst und mit 30 ml Tris -Puffer mit 150 mM NaCl gemischt. 20 ml dieser Lösung wurden zur Membran gegeben und die Reaktion durch die Zugabe von 20 µl 30 %igem H_2O_2 gestartet. Die Meerrettich-Peroxidase verwendet das H_2O_2 als Substrat, und oxidiert das 4-Chlor-1-Naphthol zu einem blauen Farbstoff unter Bildung von H_2O. Dies hat zur Folge, dass Bereiche der Membran, an den die Antikörper gebunden haben, sich blau färben.

2.8.9. Anfärbung von Proteinen

Im Folgenden werden Methoden zur Färbung von Gelen einer SDS-PAGE beschrieben.

2.8.9.1. Coomassie-Färbung ohne Methanol und Eisessig

Diese Methode diente zur schnellen und effizienten Kontrolle von SDS-PAGE-Gelen, die im Rahmen eines Überexpressionsversuches gemacht wurden. Das Verfahren ist bei etwa gleicher Sensitivität schneller als die Standardmethode nach Weber und Osborn von 1969 und verzichtet auf das gesundheitsschädliche Methanol in der Färbe- und Entfärbelösung.

Das Gel wurde 3 x 3-5 min in sterilem H_2O gewaschen, wobei es vor jedem dieser Schritte für 30-40 s in einer Mikrowelle erwärmt wurde. Es war darauf zu achten, dass das Gel dabei nicht schmolz. Anschließend erfolgte die Zugabe der CBB-Lösung, bis das Gel vollständig bedeckt war. Nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität (15-20 min) wurde das Gel in steriles H_2O überführt und in diesem ggf. zu Entfärbung des Hintergrundes inkubiert.

Die Proteine eines so gefärbten Gels sind nicht für eine folgende MADI-TOF-Analyse verwendbar. Wenn die Erwärmung in der Mikrowelle durch eine verlängerte Waschung bei RT ersetzt wurde, so konnte das Protein anschließend auch für die Massenspektrometrie verwendet werden.

2.8.9.2. Silberfärbung (Blum et al., 1987)

Die Silberfärbemethode ist aufgrund einer Nachweisgrenze von 2-5 ng pro Bande sehr sensitiv. Das Prinzip beruht auf der Anlagerung von Silberionen an die Proteine. Das Formaldehyd der Entwicklerlösung reduziert anschließend diese Ionen zu elementaren Silber, welches als schwarzer Niederschlag sichtbar wird.

Die Gele wurden im Anschluss an die SDS-PAGE bei Raumtemperatur über Nacht in der Fixierlösung inkubiert. Danach wurde diese Lösung durch zweimaliges Waschen für 10 min mit Ethanol (50 %, (v/v)) entfernt und das Gel für 1 min in einer Thiosulfatlösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem H_2O für

jeweils 1 min erfolgte eine Inkubation für 15 min in der frisch angesetzten Silbernitratlösung. Die zwei folgenden Waschschritte für je 1 min in sterilem H_2O dienten zur Entfernung von Lösungs-Rückständen. Durch die Zugabe der Entwicklerlösung wurden die Proteine in den Banden angefärbt. Sobald die gewünschte Bandenintensität erreicht war, wurde die Entwicklerlösung entfernt, das Gel mit H_2O gespült und in der Stopplösung inkubiert. Die Gele konnten ausgewertet und ggf. in einer Videodokumentationsanlage fotografiert werden

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Stand des Projektes zu Beginn dieser Arbeit

Im Jahre 2001 konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Gress nachweisen, dass das Enterotoxin von *Clostridium perfringens* (CPE) an Claudin-3 und -4 - Rezeptoren von Pankreaskarzinom-Zelllinien binden und diese massiv schädigen kann (Michl et al., 2001). Aufgrund dessen wurde CPE als ein potentiell sehr wirksames Therapeutikum für die Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs in fortgeschrittenen Stadien klassifiziert. Da eine systemische Gabe des Toxins auch gesunde Gewebe schädigt, die entsprechende Rezeptoren besitzen (z.B. die Blut-Hirn-Schranke und Epithelien einiger Organe), wurde diese Applikationsmethode jedoch weitgehend wieder fallen gelassen. Für intraperitoneale Injektionen desToxins konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass sie prinzipiell möglich und nützlich sind, aber starke Nebenwirkungen aufweisen. Deshalb wurden bisher noch keine Versuche an Menschen durchgeführt (Santin, 2005). Eine Penetration des Bauchraums ist zudem mit dem Risiko von Infektionen verbunden, die für einen immundefizienten Patienten ein hohes Risiko darstellen.

Diese Problematik könnte mit einer modifizierten CDEPT umgangen werden. Die dafür verwendeten, rekombinanten Clostridiensporen können nur in hypoxischen Bereichen eines Tumors auskeimen. Da diese Zonen ab einem Tumordurchmesser von 2-3 mm und einem damit einhergehenden O_2-Partialdruck von weniger als 10 mm Hg auftreten, könnten diese Bakterien bei Krebserkrankungen mit massiven Tumoren schon in frühen Stadien Verwendung finden. Die fortschreitende Volumenzunahme der wachsenden Geschwulst vergrößert die hypoxischen Bereiche im Krankheitsverlauf drastisch, so dass dieser Ansatz insbesondere bei großen und inoperablen Tumoren eine Therapieoption darstellen könnte.

Die vegetativen Zellen sollen sich dabei innerhalb des Tumors vermehren und während ihres gesamten Wachstums eine rekombinantes CPE-Fusionsprotein produzieren und aktiv ausschleusen. Im Falle der Etablierung eines solchen Systems würde eine lokale und damit nahezu nebenwirkungsfreie indirekte Applikationsmethode für CPE zur therapeutischen Behandlung von massiven Tumoren zur Verfügung stehen.

G, Box beschäftigte sich während seiner Doktorarbeit mit dieser Thematik und versuchte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gress, dieses Ziel zu erreichen. Da der proteolytische Organismus *C. sporogenes* noch nicht ausreichend genetisch zugänglich und erforscht war, verwendete er das saccharolytische Bakterium *C. acetobutylicum*. Es gelang ihm, das promoterlose *cpe*-Gen aus *C. perfringens* zu amplifizieren, und mit dem schwachen Promoter des *bdhA*-Gens zu fusionieren. Dieser bewirkt eine schwache konstitutive Expression des stromabwärts liegenden Gens. Da das Toxin nativ jedoch nicht ausgeschleust wird, war es notwendig, die genetische Information für das Toxin am 5′-Ende (stromaufwärts, „upstream“) um die Nukleotidsequenz eines geeigneten Signalpeptids (von AmyP, einer Amylase aus *C. acetobutylicum*) zu erweitern. Das Resultat ist der *E. coli-C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor p7BIG2TOX, der in der folgenden Abbildung 2 dargestellt ist.

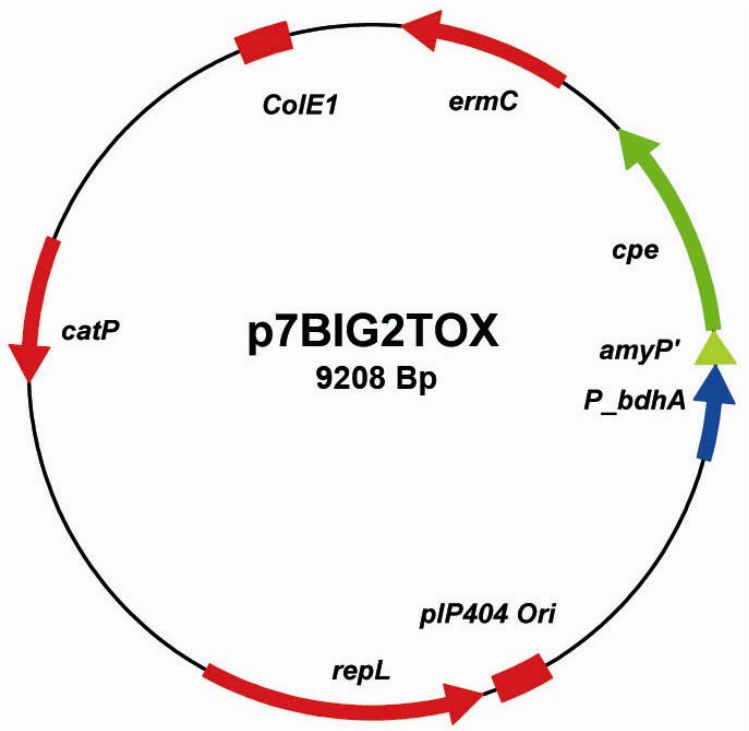


Abbildung 2: Das p7BIG2TOX-Plasmid.

Die Transformation dieses Konstruktes in *C. acetobutylicum* und erste Expressionsstudien waren erfolgreich. Im Überstand einer solchen Kultur konnten ca. 500 ng/ml CPE nachgewiesen werden (Box, 2006). Jedoch ist dieser Organismus aufgrund seiner saccharolytischen Lebensweise nicht in der Lage, Tumore im Mausmodell in ausreichender Dichte zu besiedeln. Eine Verwendung von *C. acetobutylicum* für diesen Einsatzzweck ist somit nicht möglich.

Während der Klonierungsarbeiten mit *E. coli* wurde deutlich, dass bereits eine schwache konstitutive Expression dieses modifizierten Gens für *E. coli* einen extremen Wachstumsnachteil darstellt. So konnte trotz vieler Experimente letztlich nur unter Zuhilfenahme eines zusätzlichen Resistenzgens (*ermC*) ein einziger positiver Klon identifiziert werden.

3.2. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Ansätze verfolgt. Deren Ziel war die Adaptation und Verbesserung des bereits für *C. acetobutylicum* existierenden Systems an *C. sporogenes* und die Transformation in diesen Organismus. Hierfür musste zunächst ein geeignetes Verfahren identifiziert und etabliert werden. Des Weiteren sollten alternative und stärkere Promotoren für die Expression des Fusionsproteins identifiziert werden, um die CPE-Konzentration im Tumor und damit die Wirksamkeit dieses Therapieansatzes zu erhöhen. Dazu mussten die negativen Auswirkungen der Produktion des modifizierten Toxins auf das Wachstum des benötigten Zwischenwirtes *E. coli* minimiert werden, um eine erfolgreiche Klonierung der entsprechenden Gene zu ermöglichen. Dieser Aspekt gliederte sich in folgende Projekte:

- Abschwächung der Expression durch spezifische asRNA
- Austausch von *E. coli* als Zwischenwirt durch Gram-positive Organismen
- Identifizierung potentieller CPE-Rezeptoren in *E. coli* bzw. anderer Ursachen für die Unverträglichkeit des Fusionsproteins
- Entwicklung oder Identifizierung eines geeigneter Promoters

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Projekte aufgeführt.

3.3. Versuche zur Etablierung eines asRNA-Systems zur Dämpfung der schädlichen CPE-Produktion in *E. coli*

3.3.1. Konstruktion eines T7-asRNA-Systems

Da durch die vorangegangenen Klonierungsversuche deutlich wurde, dass die Produktion von CPE aufgrund des benötigten konstitutiven Promoters *E. coli* massiv schädigt, sollte eine Dämpfung der Aktivität durch die Produktion von asRNA gegen das *cpe*-Transkript erfolgen. Zu diesem Zweck wurde der Vektor p7BIG2 um die Sequenzen des T7-Expressionssystems aus pET29a (T7-Promoter mit *lac*-Operator, MKS und T7-Terminator) erweitert. In die multiple Klonierungsstelle des T7-Systems wurde anschließend ein 200-Bp-Fragment kloniert, das die Information für die spezifische asRNA gegen das *amyP'*-Transkript enthält. Nach Abschluss dieser Arbeiten wurde das *oriT-traJ*-Fragment aus pIMPoriTori2 amplifiziert und ebenfalls in dieses Plasmid kloniert. Dieser Schritt war notwendig, um eine spätere Konjugation dieses Vektors in *C. sporogenes* zu ermöglichen. Das fertige Konstrukt wurde als pDM1 bezeichnet und ist in der folgenden Abbildung 3 dargestellt:

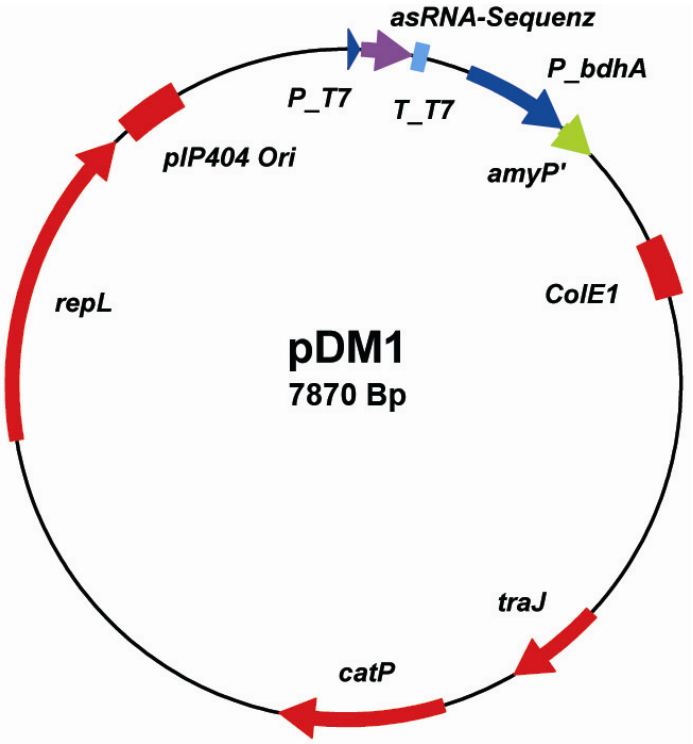


Abbildung 3: Der pDM1-Vektor.

In diesen Vektor sollte hinter die *amyP'*-Signalpeptidsequenz das *cpe*-Gen kloniert werden. Als Klonierungsstamm wurde *E. coli* BL21 (DE3) gewählt. Während der Transformation wurde dem Medium IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben, um die Produktion der T7-RNA-Polymerase zu induzieren, welche dann die asRNA transkribiert. Diese sollte mit der *amyP'-cpe*-RNA interagieren, was zum Abbau beider RNAs und damit zu einer stark vermindert CPE-Produktion führt. Im Falle der Funktionsfähigkeit dieses Systems sollte nun die Klonierung der Gene für CPE-Fusionproteine möglich sein. Es konnten jedoch keine positiven Klone identifiziert werden.

Um die Bildung der asRNA in einer induzierten Kultur zu überprüfen, wurde die Gesamt-RNA isoliert und anschließend ein RT-PCR-Experiment durchgeführt. Hierbei konnte keine Expression der asRNA nachgewiesen werden.

3.3.2. Konstruktion eines Zwei-Vektor-Systems zur asRNA-Produktion

Eine andere Möglichkeit zur Expression der spezifischen asRNA gegen das *amyP'*-Transkript war die Modifikation und Auslagerung des Systems auf einen zweiten Vektor mit einem geeigneten Replikationsursprung, so dass das Expressions- und das Repressor-Plasmid in einer Zelle koexistieren können. Der Vorteil eines solchen Vorgehens liegt in der Verwendbarkeit in mehreren *E. coli*-Stämmen. Der stark konstitutiv aktive Promoter des 16 S-rRNA-Gens sollte die permanente Transkription der asRNA gewährleisten. Durch die Einführung sogenannter „paired termini“ kann die RNA vor einem enzymatischen Abbau geschützt werden, so dass durch die entstehende Akkumulation dieser Moleküle die Effizienz des as-Systems gesteigert wird (Nakashima et al, 2006).

Das Klonierungsschema sah als ersten Schritt den Austausch des Φ3TI-Methyltransferase-Gens gegen den ca. 800 Bp langen Promotorbereich der 16 S-rRNA-Gens vor. Anschließend sollten nacheinander die restlichen Sequenzen eingefügt werden. Die nachfolgende Abbildung 4 verdeutlicht die geplante Strategie.

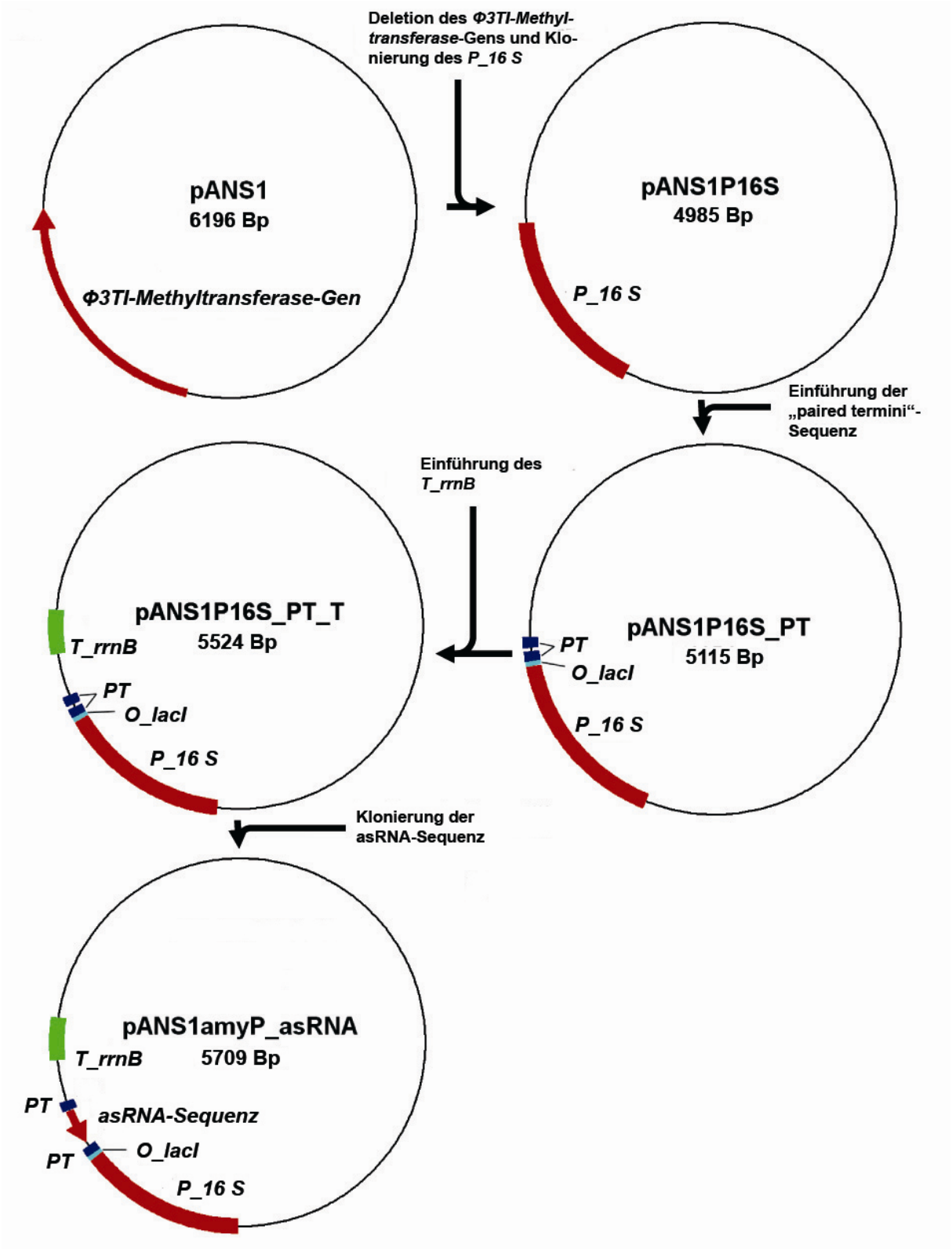


Abbildung 4: Klonierungsschema des PT-asRNA-Projekts.
***P_16 S*: Promoter des *16* S-rRNA-Gens.**
***O_lacI*: LacI-Operator.**
***T_rrnB*: Terminatorbereich des *rrnB*-Gens.**
***PT*: Homologe Bereiche zur Bildung einer Haarnadelschleife in der RNA-Struktur.**
***asRNA*: „anti sense"-Bereich gegen das *amyP'*-Transkript.**

Eine schematische Darstellung der von einem solchen System gebildeten asRNA ist in Abbildung 5 aufgeführt. Die blauen Bereiche sind für die Stabilisierung des Transkripts gegen den enzymatischen Abbau verantwortlich.

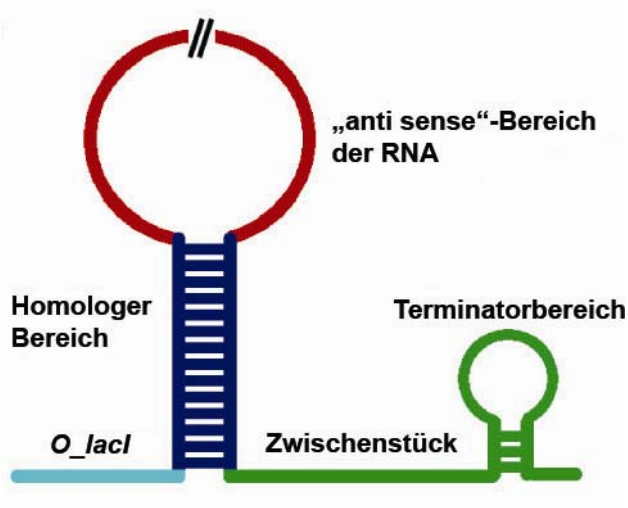


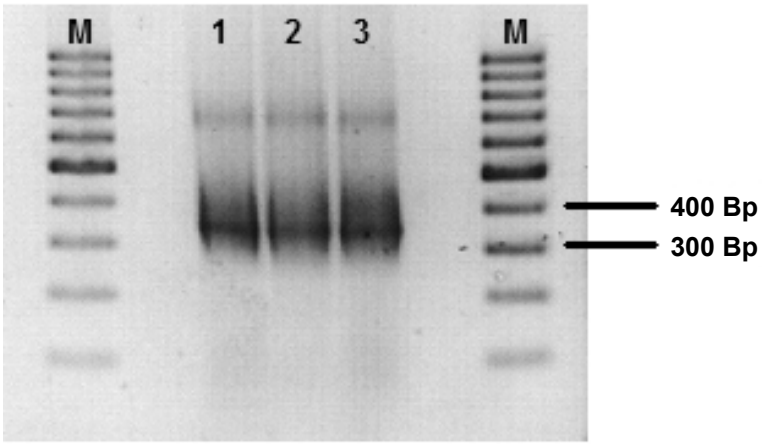
Abbildung 5: Schema der asRNA-Struktur.

Zunächst wurden der Promoter- und der Terminatorbereich amplifiziert und die Fragmente in pDrive kloniert. Das 122 Bp lange PT-Konstrukt (die hellblauen und dunkelblauen Bereiche in der Abbildung 5) wurde ohne den „anti sense“-Bereich bei als ssDNA kommerziell synthetisiert. Dies diente als Matrize für eine PCR, um dsDNA für die Klonierung in den pDrive-Sequenzierungsvektor zu erhalten. Mehrere Versuche mit verschiedenen PCR-Techniken und „Primern“, um dieses Fragment zu amplifizieren, führten nicht zum gewünschten Ergebnis, so dass die Strategie verändert wurde. Hierfür wurden lange „Primer“ für die „anti sense“-Region von *amyP'* entworfen, die jeweils an ihren 5′-Enden die Information für einen homologen Bereich des PT-Konstrukts trugen. Mit diesen sollte in einem Schritt die Amplifikation des PT-Konstruktes mit dem asRNA-Bereich erfolgen (320 Bp; die blauen und roten Bereiche in der Abbildung 5). Ein entsprechendes Fragment konnte amplifiziert werden, jedoch konnte dieses weder in pANS1 noch in pDrive erfolgreich kloniert werden. Um störende Einflüsse der homologen Bereiche auf die Versuche zu unterbinden, sollte in einem weiteren Ansatz diese Klonierung in 2 Schritten durchgeführt werden. Im Ersten sollte hierbei ein homologer Bereich und die 5′-Hälfte der asRNA-DNA-Sequenz vervielfältigt und in pDrive eingebracht werden (Abbildung 5: hellblauer, linker dunkelblauer und roter Bereich bis zu den Trennstrichen in der Schleife). Im zweiten Schritt sollten die fehlenden Bereiche amplifiziert und über eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme gerichtet kloniert werden. Die entsprechenden Bereiche konnten erfolgreich vervielfältigt, jedoch anschließend nicht in pDrive kloniert werden.

3.3.3. Modifikation des pDM1-Vektors zur Bildung stabilisierter asRNA

Da ein Zwei-Vektor-System zur Produktion der spezifischen asRNA gegen das Transkript des *amyP'*-Signalpeptids nicht etabliert werden konnte, sollten Versuche zur Modifikation des pDM1-Vektors unternommen werden. Der pDM1.1 genannte Vektor sollte nach dessen Konstruktion die genetische Information für ein durch gepaarte Enden stabilisiertes asRNA-Transkript tragen.

Hierfür wurde zunächst aus dem bestehenden Plasmid die asRNA-Kassette durch einen enzymatischen Verdau entfernt. In dieses sollte anschließend das gleichartig geschnittene und gereinigte PT-asRNA-PCR-Fragment kloniert werden. Die



zeigt ein Gel-bild der PCR. Dieses Fragment konnte jedoch nicht erfolgreich in den linearisierten pDM1-Vektor kloniert werden.

Abbildung 6: Amplifikation des PT-asRNA-Fragments (320 Bp).

3.4. Identifizierung der schädlichen Wirkung der CPE-Bildung

Im Rahmen dieses Projektes sollte die anhand der Klonierungsversuchen gemachte Erfahrung, dass die Bildung von CPE einen letalen Einfluss auf den Zwischenwirt *E. coli* hat, genauer untersucht werden. Der Grund hierfür war, dass bisher lediglich ein Klon identifiziert werden konnte, der in der Lage ist, die Produktion von CPE zu tolerieren. Eine Ursache könnte möglicherweise die mutationsbedingte Abwesenheit einer Zielstruktur für CPE in diesen Klon sein.

3.4.1. Potentielle membranassoziierte Zielproteine für CPE

Aus der Literatur ist bisher bekannt, dass CPE spezifisch an Proteine der Claudin-Familie bindet, insbesondere an Claudin-3 und -4. Diese Proteine kommen ausschließlich in der Membran eukaryotischer Zellen höherer Organismen vor und sollten kein Analogon in Gram-negativen Organismen besitzen. Um die Möglichkeit

einer direkten Interaktion von CPE mit einem bakteriellen (Membran-) Protein zu untersuchen, wurde in silico zunächst mit der Aminosäuresequenz von Claudin-4 nach evtl. vorhandenen ähnlichen Proteinen von *E. coli* gesucht. In der Abbildung 7 ist ein Ergebnis der Suche für das Protein mit dem höchsten Homologiegrad dargestellt:

```
> gi|34979332|gb|AAQ83785.1|  putative permease [Escherichia coli]
Length=438

 Score = 28.1 bits (61),  Expect = 4.2, Method: Composition-based stats.
 Identities = 35/159 (22%), Positives = 66/159 (41%), Gaps = 19/159 (11%)

Query  21   VMLCCALPMWRVTAFIGSNIVTS-QTIWE-GLWMNCVVQSTGQMQCKVYDS--LLALPQD  76
            ++L C  P+W   A +   ++T  ++++    + + +VQS        Y    L+A+P
Sbjct  23   ILLSCLFPLWGCAAALNDILITQFKSVFSLSNFASALVQSA------FYGGYFLIAIPAS  76

Query  77   LQAARALVIISIIVAALGVLLSVVGGKCTNCLEDESAKAKTMIVAGVVFLLAGLMVIVPV  136
            L   +    ++I++      L++  G CT           TM +A +  +  GL  +
Sbjct  77   LVIKKTSYKVAILIG-----LTLYIGGCTLFFPASHMATYTMFLAAIFAIAIGLSFLE--  129

Query  137  SWTAHNIIQDFYNPLVASGQKREMGASLYVGWAASGLLL  175
               TA N       P   +  +  + Y   AASG+LL
Sbjct  130  --TAANTYSSMIGPKAYATLRLNISQTFYPIGAASGILL  166
```

Abbildung 7: Beispiel eines Vergleichs auf Proteinebene.
Query: Eingegebenes Protein (Cldn-4).
Sbjct: Protein mit homologen Sequenzbereichen.

Der so gefundene potentielle Interaktionspartner von CPE ist eine membranständige putative Fucose-Permease.

3.4.2. „Plasmid clearing" des Klones *E- coli* XL1-Blue (p7BIG2TOX) und Transformationsexperimente mit p7BIG2TOX

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass eine Mutation in einer potentiellen Zielstruktur in diesem *E. coli*-Klon für dessen CPE-Toleranz verantwortlich ist, wurde dieser von seinem Plasmid befreit („Plasmid clearing"). Mit diesem *E. coli* XL1-Blue-Klon wurden, zusammen mit einem *E. coli* XL1-Klon aus der Stammsammlung Transformations-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde je Ansatz 1 µg Plasmid-DNA von p7BIG2TOX verwendet. Die Experimente ergaben, dass bei beiden Ansätzen etwa gleich viele Retransformanten (~ 20) auf einer selektiven Platte wuchsen, wobei die Anzahl der Transformanten bezüglich der eingesetzten DNA-Menge extrem gering war.

Zusätzlich zu den Klonen aus diesem Stamm wurden ebenfalls andere verfügbare Stämme auf deren Transformationseffizienz mit p7BIG2TOX untersucht. Für jeden

Ansatz wurden elektrokompetente *E. coli*-Zellen der zu testenden Stämme sowie je 1 µg Plasmid-DNA verwendet. Die Ergebnisse eines solchen Versuchs sind exemplarisch in der folgenden Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Ergebnisse der Transformationsexperimente mit p7BIG2TOX

E. coli-Stamm	Plasmid (1 µg/Ansatz)	Kolonien/Platte
XL1-Blue MRF′ (Plasmid bereinigt)	p7BIG2TOX	21
XL1-Blue MRF′	p7BIG2TOX	19
XL2-Blue	p7BIG2TOX	24
CA434	p7BIG2TOX	5
BL21 (DE3)	p7BIG2TOX	4
DH5α	p7BIG2TOX	16
SURE	p7BIG2TOX	10
HB101	p7BIG2TOX	14

Anhand der Tabelle wird ersichtlich, dass sich dieses Plasmid nur sehr schlecht in diese Bakterien-Stämme transformieren lässt, wobei die Stämme XL1- und XL2-Blue eine geringfügig höhere Effizienz aufweisen.

3.4.3. Wachstumsversuche mit CPE- und Sp-CPE-Überexpressionsvektoren

Zur abschließenden Klärung, ob CPE oder evtl. das Fusionsprotein (Sp-CPE) den schädlichen Einfluss auf *E. coli* ausübt, wurden beide Gene in pET28a stromabwärts von dessen induzierbarem T7-Promoter kloniert und die Konstrukte in *E. coli* BL21 (DE3) eingebracht. Anschließend wurden mit diesen Klonen Wachstumsexperimente durchgeführt, in deren Verlauf die Induktion mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) erfolgte. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 8 grafisch dargestellt.

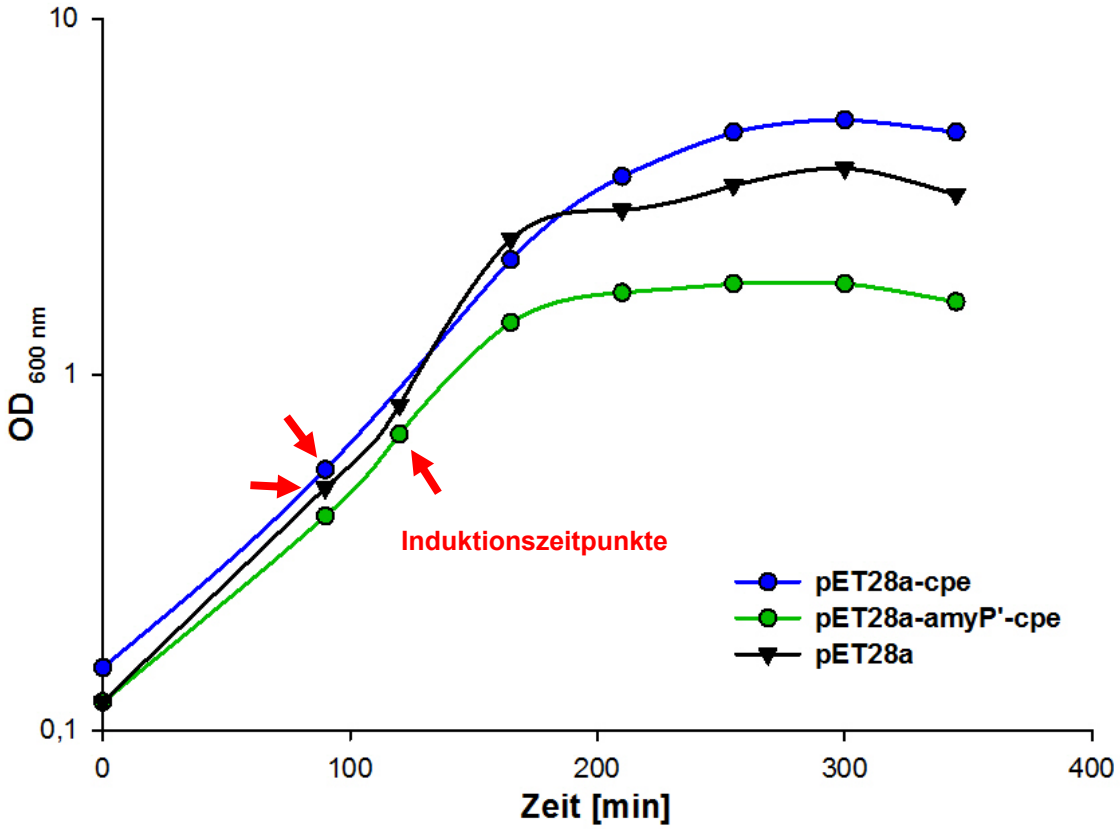


Abbildung 8: Wachstumsversuch mit *E. coli* BL21 (DE3) (pET28a-cpe- und pET28a-amyP′-cpe). Die Induktion (rote Pfeile) erfolgte nach 90 uns 120 min mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG im Medium.

Sowohl der Klon mit pET28a (Kontrolle) als auch jener mit pET28a-cpe zeigten keinen deutlichen Unterschied im Wachstumsverlauf nach der Induktion. Einzig die *E. coli*-Kultur mit pET28a-amyP′-cpe wies ein erheblich schlechteres Wachstum nach der Zugabe von IPTG auf.

3.5. Alternative Zwischenwirte für kritische Klonierungsschritte

Die verwendeten konstitutiven Promotoren aus Gram-positiven Organismen weisen auch in Gram-negativen Bakterien Aktivität auf. Somit ergeben sich für die für Klonierungen verwendeten *E. coli*-Stämme durch die Produktion des Fusionsproteins letale Wachstumsnachteile. Bisher ist kein clostridieller Promoter bekannt, der in *E. coli* nicht aktiv wäre. Da für die Klonierungen jedoch ein genetisch gut zugänglicher Organismus unumgänglich ist, sollten im Rahmen dieser Versuche geeignete Organismen untersucht werden. Der Schwerpunkt wurde auf *Lactococcus lactis* gelegt, da dieser eine hohe Transformationseffizienz aufweist und nicht pathogen ist. Das ebenfalls in Frage kommende Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* wurde

von Mandy Wensche während ihrer Diplomarbeit untersucht. Nach der erfolgreichen Etablierung einer Elektroporations-Methode wurden zunächst folgende *E. coli-Clostridium*-Schaukel-Vektoren auf ihre Replikationsfähigkeit in *L. lactis* untersucht. Für die Transformationsexperimente wurde je 1 µg Plasmid-DNA verwendet. Das Ergebnis eines solchen Versuchs ist exemplarisch in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Verwendete Plasmide für die Transformationsexperimente mit *L. lactis*

Bezeichnung	Replikationsursprung Gram$^+$	Antibiotikum-Resistenz	Kolonien/Agarplatte
pJIR750	pIP404	Cm^R	3
p7BIG2TOX	pIP404	Cm^R	n.g.
pMTL007	pCB102	Cm^R	n.g.
pIMP1	pIM13	Er^R	10
pOri23	p23	Er^R	Rasen

n.g.: Nicht gewachsen

Der Vektor pOri23 wurde als Positiv-Kontrolle verwendet, da dieser in der Lage ist, in *L. lactis* zu replizieren und in diesem Organismus in hoher Kopienzahl vorliegt. Anhand der Tabelle ist ersichtlich, dass die Transformationseffizienz bei der Verwendung clostridieller Plasmide extrem niedrig bzw. nicht vorhanden ist.

Da nicht nur Plasmid-DNA, sondern auch Ligationsansätze in diesen Organismus übertragen werden sollten, wurden parallel zu obigen Versuchen auch Ligationsansätze transformiert. Hierfür wurde ein *amyP'-cpe*-Fragment aus p7BIG2TOX amplifiziert und in die MKS von pOri23 ligiert. Dieser Vektor trägt stromaufwärts seiner MKS bereits den konstitutiven Promoter *P23* aus *Lactococcus*. Des Weiteren wurde der in *C. sporogenes* konjugierbare Vektor pMTL007 verwendet. Dieser wurde verdaut (Entfernung der *ClosTron*-Kassette und *ltrA*) und mit einem gleichartig geschnittenen P_{bdhA}-*amyP'-cpe*-Fragment ligiert.

Es wurden je 100 ng verdaute und gereinigte Plasmid-DNA pro Ansatz verwendet. Das Verhältnis Vektor- zu Insert-DNA betrug 1:3 bzw. 1:5. Die Ergebnisse der Versuche sind in der folgenden Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Ergebnisse der Transformationsexperimente mit Ligationsansätzen in *L. lactis*

Plasmid	Kloniertes DNA-Fragment	Verwendete Schnittstellen	Kolonien/Agarplatte
pOri23	*amyP'-cpe*	*Bam*HI/*Sal*I	n.g.
pMTL007	P_{bdhA}-*amyP'-cpe-ermC*	*Aat*II	n.g.
pMTL007	-	*Aat*II	n.g.
pOri23	-	*Bam*HI/*Sal*I	n.g.
pOri23	-	-	Rasen

n.g.: Nicht gewachsen

Wie der Tabelle 25 zu entnehmen ist, war die Transformation nur mit der ungeschnittenen Positiv-Kontrolle pOri23 erfolgreich. Bei allen anderen Ansätzen konnten nach der Inkubation keine Kolonien auf den Agarplatten identifiziert werden.

3.6. Etablierung des DNA-Transfers in *C. sporogenes* und Sequenzierung von pMTL007

Zu Beginn dieser Arbeiten war die DNA-Übertragung in *C. sporogenes* in diesem Labor noch nicht etabliert. Deshalb wurden zunächst die in der Literatur verfügbaren Methoden und Variationen getestet (siehe 2.7.7. bis 2.7.9.). Für die Elektroporations-Methoden wurden die Plasmide pIMP1 und pJIR750 und für die Konjugationsexperimente die Vektoren pIMPoriTori2 und pMTL007 verwendet, die zuvor in *E. coli* CA434 (Donorstamm) transformiert wurden.

Trotz mehrmaliger Versuche konnten mit den verschiedenen Elektroporations-Methoden keine Transformanten erzeugt werden. Auch für die Konjugationsversuche mit pIMPoriTori2 war dies der Fall. Nach einigen Modifikationen der Methode führte die Konjugation mit pMTL007 jedoch reproduzierbar zu guten Ergebnissen. Somit konnte dieser Vektor und diese Methode für die weitere Arbeit verwendet werden.

Da zu diesem Zeitpunkt die Sequenz von pMTL007 noch nicht publiziert war, wurde der Vektor mittels „Primerwalking“ in mehreren Schritten sequenziert. Die so erhaltenen Sequenzdaten bzw. die Plasmid-Karte ist in der Abildung 9 dargestellt.

Die verwendeten „Primer“ können der entsprechenden Tabelle im Material und Methoden-Teil entnommen werden. Sie tragen die Bezeichnung: 73/2 und sind fortlaufend nummeriert (z.B. 73/2-1).

Dieser Vektor war die Grundlage für die Konstruktion weiterer anderer Plasmide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

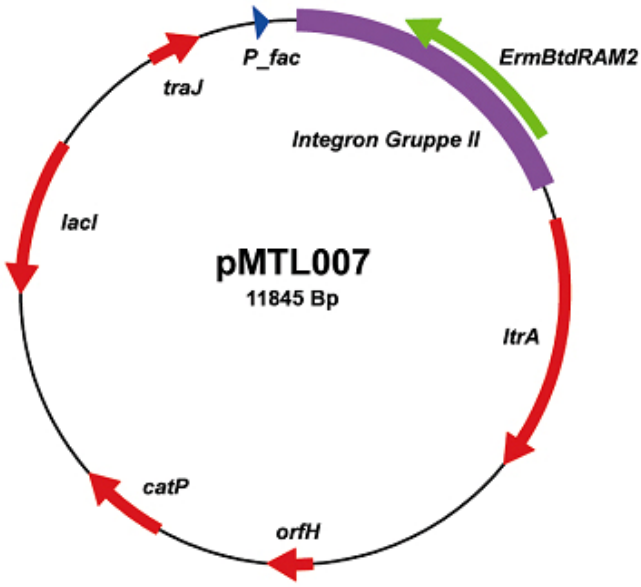


Abbildung 9: Der pMTL007-Vektor.

A

3.7. Alternative Signalpeptide für die aktive Sekretion von CPE und CPE-T durch *C. sporogenes*

Wie anhand der Wachstumskurven unter Punkt 3.4.3. erkennbar, ist nicht die CPE-Bildung, sondern vielmehr die Produktion des Fusionsproteins AmyP′-CPE für die schädliche Wirkung auf *E. coli* verantwortlich. Eine Möglichkeit, dies zu vermeiden, könnte die Verwendung alternativer clostridieller Signalpeptid-Sequenzen sein. S. König hat während ihrer Diplomarbeit (König, 2008) mehrere mögliche Sequenzen identifiziert, mit dem *crt*-Gen fusioniert und anschließend charakterisiert. Die DNA-Sequenzen dieser Signalpeptide wurden im Rahmen dieses Projektes stromaufwärts von *cpe* und/oder *cpeT* und unter Einhaltung des Leserasters in entsprechende pET29a-sp-Vektoren (sp = Signalpeptid-Sequenz) kloniert. Auflistungen der so erhaltenen Konstrukte können den Tabellen 26 und 27 entnommen werden. Es konnten jedoch trotz wiederholter Bemühungen nicht alle mögliche Kombinationen konstruiert werden. Die erfolgreichen Klonierungen wurden durch Sequenzierungen bestätigt.

Tabelle 26: Erhaltene pET29a-sp′-cpe-Konstrukte

Plasmid	Länge der Signalpeptid-Sequenz Bp / AS	Ursprungsprodukte und Organismus
pET29a-plc′-cpe	117 / 39	Phospholipase C */ C. perfringens*
pET29a-chiti′-cpe	141 / 47	Chitinase family protein */ C. acetobutylicum*
pET29a-colA′-cpe	120 / 40	Collagenase A */ C. sporogenes*
pET29a-orf5′-cpe	141 / 47	Orf5 */ C. acetobutylicum*
pET29a-3D′-cpe	141 / 47	3D Domain Protein */ C. perfringens*
pET29a-amyP′-cpe	147 / 49	Amylase P */ C. acetobutylicum*

Tabelle 27: Erhaltene pET29a-sp-cpeT-Konstrukte

Plasmid	Länge der Signalpeptid-Sequenz Bp / AS	Ursprungsprodukte und Organismus
pET29a-plc′-cpeT	117 / 39	Phospholipase C */ C. perfringens*
pET29a-chiti′-cpeT	141 / 47	*Chitinase family protein / C. acetobutylicum*
pET29a-colA′-cpeT	120 / 40	Collagenase A */ C. sporogenes*
pET29a-orf5′-cpeT	141 / 47	Orf5 */ C. acetobutylicum*
pET29a-3D′-cpeT	141 / 47	3D Domain Protein */ C. perfringens*
pET29a-pec′-cpeT	126 / 42	PectateLyase */ C. acetobutylicum*

Die Gene aller neuen Fusionsproteine wurden in silico in Proteine translatiert und mit diesen Daten und dem Internet-gestützten Programm „SignalP 3.0 Server“ auf ihre vorhergesagte Funktion als Signalpeptide in Gram-positiven und Gram-negativen Organismen untersucht. Die Abbildungen 10 und 11 enthalten beispielhaft die graphischen SignalP-Auswertungen für das Signalpeptid einer clostridiellen Chitinase in Kombination mit CPE. Um eine gute Verträglichkeit des Fusionsproteins sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien zu gewährleisten, wurden die Sequenzen für beide Gruppen in silico untersucht.

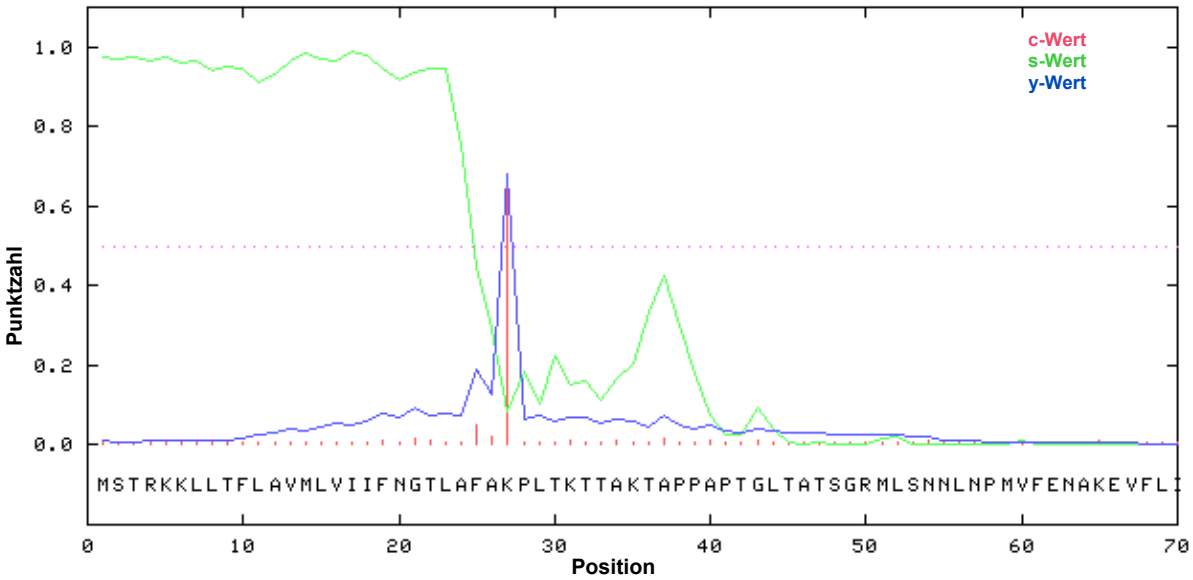


Abbildung 10: Vorhersage eines Signalpeptids am N-Terminus des Chiti'-CPE-Fusionsproteins für Gram-negative Organismen.
c-Wert: Vorhersage, ob eine AS nach Art und Position Bestandteil eines Signalpeptids ist.
s-Wert: Vorhersage über die Schnittwahrscheinlichkeit für jede Position des Signalpeptids.
y-Wert: Kombination aus den c- und s-Werten zur verbesserten Vorhersage der Schnitt-position.

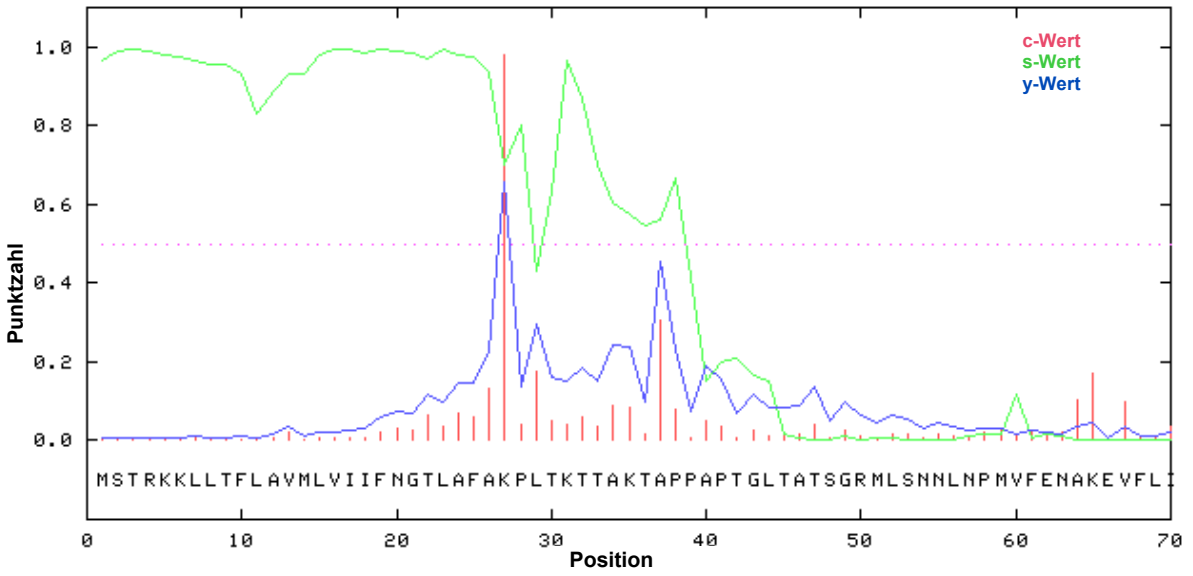


Abbildung 11: Vorhersage eines Signalpeptids am N-Terminus des Chiti'-CPE-Fusionsproteins für Gram-positive Organismen.
c-Wert: Vorhersage, ob eine AS nach Art und Position Bestandteil eines Signalpeptids ist.
s-Wert: Vorhersage über die Schnittwahrscheinlichkeit für jede Position des Signalpeptids.
y-Wert: Kombination aus den C- und S-Werten zur verbesserten Vorhersage der Schnitt-position.

Aus den beiden Abbildungen wird ersichtlich, dass die Vorhersagen der Signalpeptide für Gram-negative und Gram-positive Bakterien zwar etwas voneinander abweichen, trotzdem sollten sie von beiden Gruppen erkannt und prozessiert werden können. Die prognostizierte Schnittwahrscheinlichkeit ist jedoch für Gram-negative (Abbildung 10) deutlich geringer als für Gram-positive Bakterien (Abbildung 11).

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die grafischen SignalP-Auswertungen für das Signalpeptid der verwendeten clostridiellen Chitinase in Kombination mit CPE-T. Um eine gute Verträglichkeit des Fusionproteins sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien zu gewährleisten, wurde die Sequenz wieder für beide Gruppen in silico untersucht.

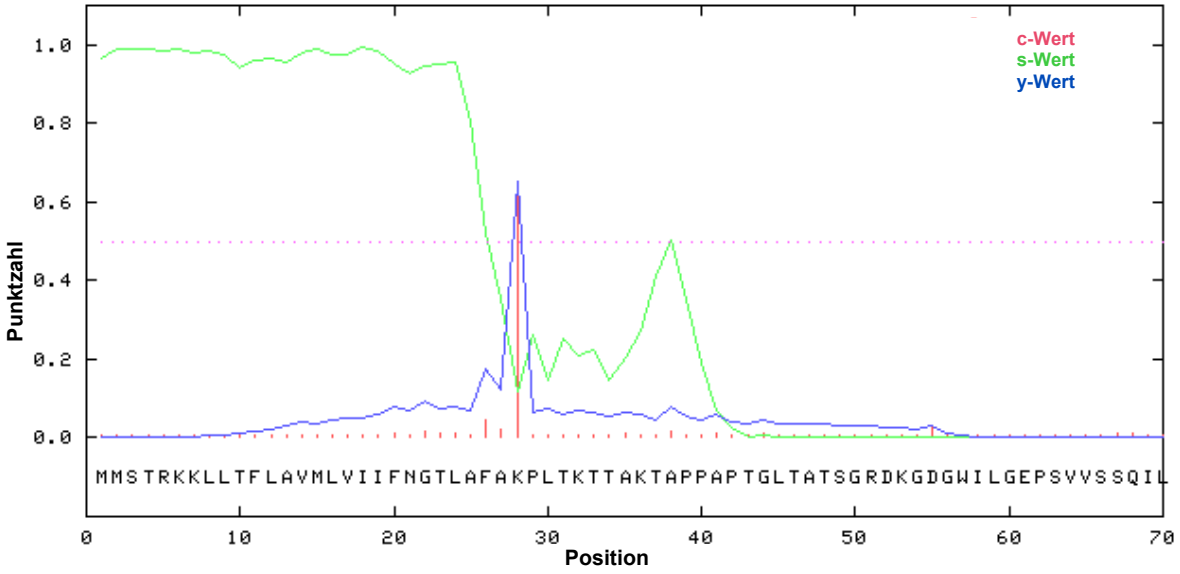


Abbildung 12: Vorhersage eines Signalpeptids am N-Terminus des Chiti'-CPE-T-Fusionsproteins für Gram-negative Organismen.
c-Wert: Vorhersage, ob eine AS nach Art und Position Bestandteil eines Signalpeptids ist.
s-Wert: Vorhersage über die Schnittwahrscheinlichkeit für jede Position des Signalpeptids.
y-Wert: Kombination aus den C- und S-Werten zur verbesserten Vorhersage der Schnittposition.

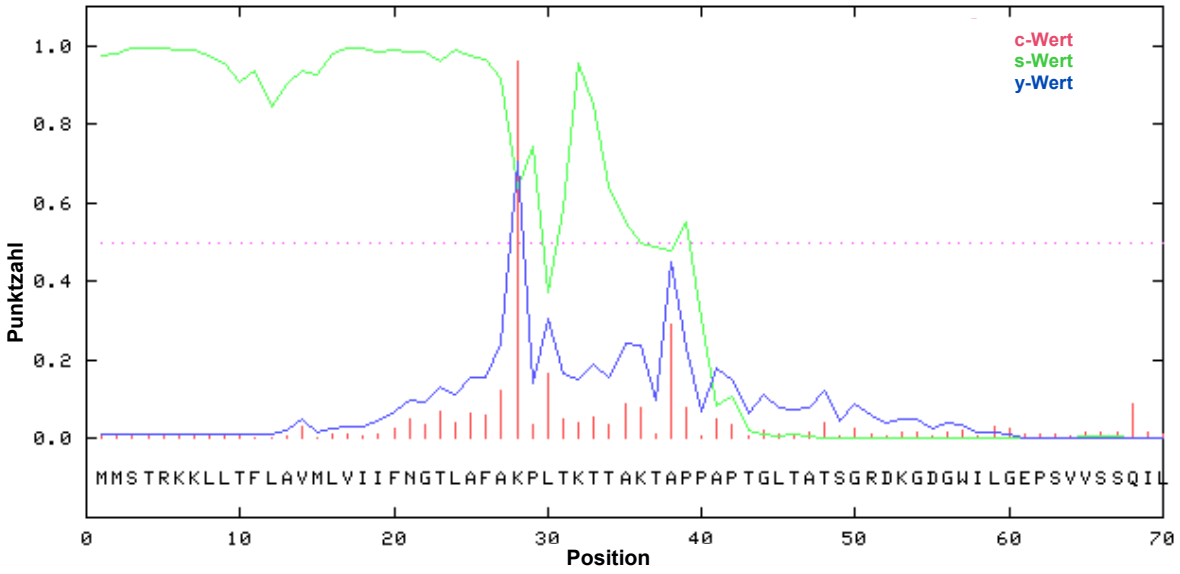


Abbildung 13: Vorhersage eines Signalpeptids am N-Terminus des Chiti′-CPE-T-Fusionsproteins für Gram-positive Organismen.
c-Wert: Vorhersage, ob eine AS nach Art und Position Bestandteil eines Signalpeptids ist.
s-Wert: Vorhersage über die Schnittwahrscheinlichkeit für jede Position des Signalpeptids.
y-Wert: Kombination aus den C- und S-Werten zur verbesserten Vorhersage der Schnitt-position.

Aus den obigen beiden Bespielen (Abbildung 12 und 13) geht hervor, dass kein signifikanter Unterschied in den Vorhersagen zwischen den Chiti′-CPE- und dem Chiti′-CPE-T-Fusionsproteinen zu erkennen ist.

Dieser Sachverhalt war auch für alle anderen in silico untersuchten AS-Sequenzen gegeben.

Um die neuen Konstrukte auf ihre Verträglichkeit in *E. coli* zu testen, wurden diese in *E. coli* BL21 (DE 3) transformiert und Wachstumsexperimente in TB-Medium durchgeführt. Die Induktion des T7-Promotrrs erfolgte bei einer $OD_{600\ nm}$ von ca. 1 mit IPTG (Endkonzentration 1 mM). In den Abbildungen 14 und 15 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihen aufgeführt.

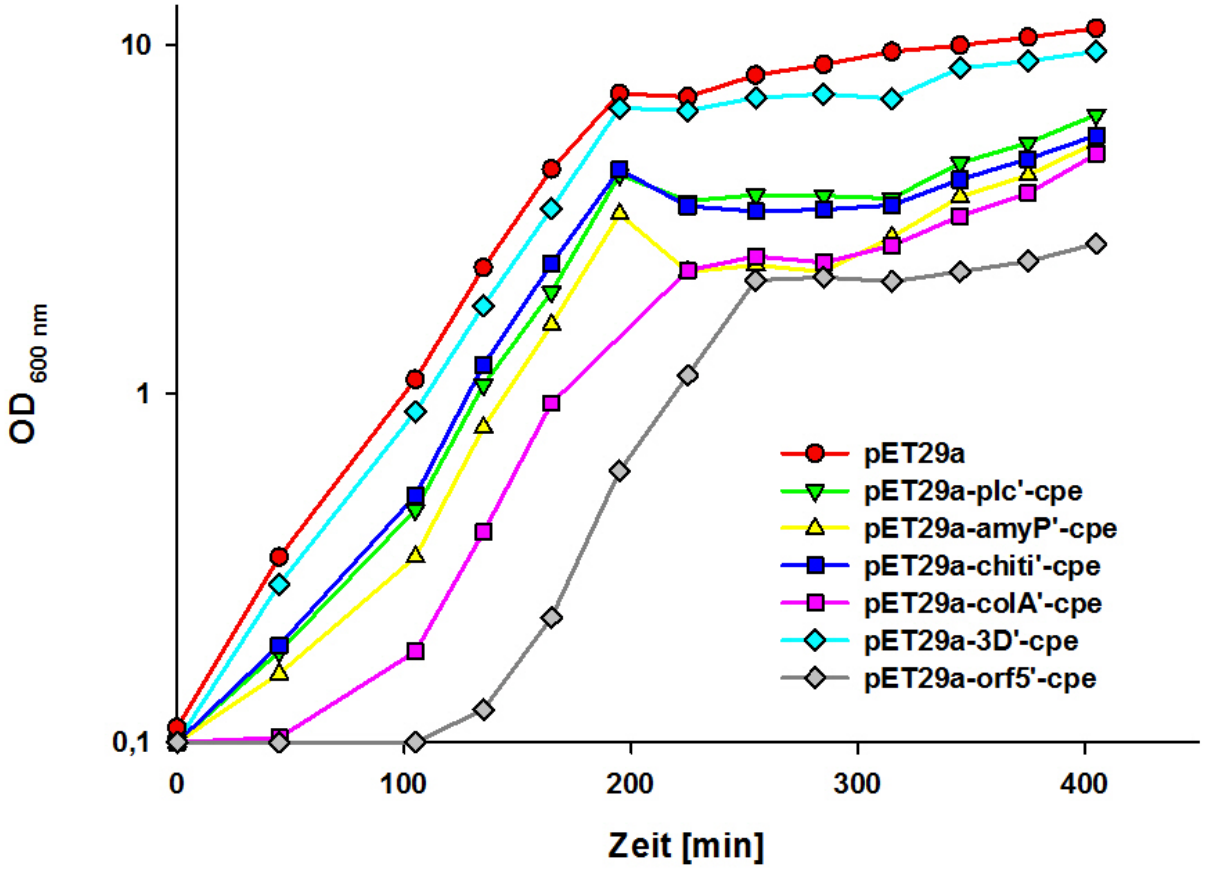


Abbildung 14: Wachstumsversuch mit *E. coli* BL21 (DE3) und pET29a-sp′-cpe-Konstrukten. Die Induktion erfolgte mit IPTG (Endkonzentration im Medium 1 mM) bei einer OD $_{600\ nm}$ von 1.

Es ist ersichtlich, dass die unterschiedlichen Konstrukte deutlich voneinander abweichende Verträglichkeiten aufwiesen. Hierbei ist das Orf5′-CPE-Fusionsprotein das schädlichste und das 3D′-CPE-Fusionsprotein das verträglichste. Auffällig ist zudem, dass die Kulturen mit den schlecht verträglichen Konstrukten mit einer deutlichen Verzögerung anwuchsen (verlängerte Lag-Phase).

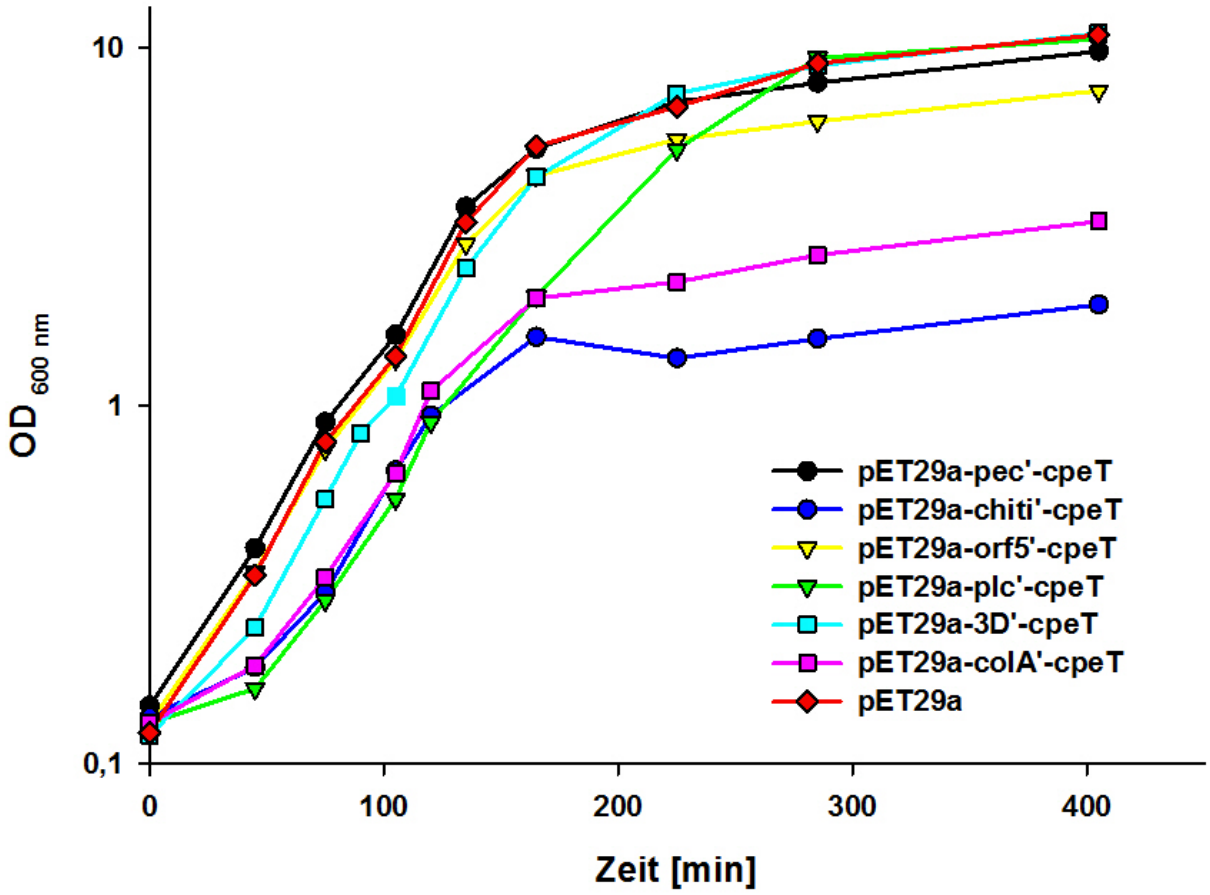


Abbildung 15: Wachstumsversuch mit *E. coli* BL21 (DE3) und pET29a-sp′-cpeT-Konstrukten. Die Induktion erfolgte mit IPTG (Endkonzentration im Medium 1 mM) bei einer OD $_{600\ nm}$ von 1.

Auch hier wurde ersichtlich, dass die unterschiedlichen *sp-cpeT*-Konstrukte deutlich voneinander abweichende Verträglichkeiten aufwiesen. Diese waren z.T. auch im direkten Vergleich der Konstrukte auffällig. So war eine Fusion des Orf5′-Signalpeptids mit CPE-T besser verträglich als dasselbe Peptid in Kombination mit CPE, obwohl die prognostizierte Prozessierungswahrscheinlichkeit identisch war. Bei den beiden *chiti'*-Konstrukten war es dagegen umgekehrt. Dieser Sachverhalt wird auch durch die Ergebnisse entsprechender Wachstumsversuche mit pET29a-sp-crt-Konstrukten gestützt (König, 2008).

Die 3D′-Konstrukte wiesen die beste Verträglichkeit in *E. coli* auf und sollten deshalb weiter verwendet werden. Weitergehende Versuche zeigten jedoch, dass die vorhandenen Konstrukte stark mutiert waren, weshalb sie nicht weiter verwendet werden konnten.

Um für *E. coli* besser verträgliche Kombinationen zu konstruieren, wurden die Sequenzen der Signalpeptide auf 180 Bp bzw. 60 AS verlängert. Zur Kennzeichnung wurden diese neuen Konstrukte mit zwei Strichen nach dem Kürzel der Signalpeptide

(z.B. *plc″*) versehen. Die beiden nachfolgenden Tabellen 28 und 29 listen die so erzeugten Konstrukte auf.

Tabelle 28: Erhaltene pET29a-sp-cpe-Konstrukte mit langen Signalpeptiden

Plasmid	Länge der Signalpeptid-Sequenz Bp / AS	Ursprungsprodukt und Organismus
pET29a-plc″-cpe	180 / 60	Phospholipase C */ C. perfringens*
pET29a-chiti″-cpe	180 / 60	Chitinase family protein */ C. acetobutylicum*
pET29a-colA″-cpe	180 / 60	Collagenase A */ C. sporogenes*
pET29a-orf5″-cpe	180 / 60	Orf5 */ C. acetobutylicum*
pET29a-pec″-cpe	180 / 60	3D Domain Protein */ C. perfringens*
pET29a-amyP″-cpe	180 / 60	Amylase P */ C. acetobutylicum*

Tabelle 29: Erhaltene pET29a-sp-cpeT-Konstrukte mit langen Signalpeptiden

Plasmid	Länge der Signalpeptid-Sequenz Bp / AS	Ursprungsprodukt und Organismus
pET29a-plc″-cpeT	180 / 60	Phospholipase C */ C. perfringens*
pET29a-chiti″-cpeT	180 / 60	Chitinase family protein */ C. acetobutylicum*
pET29a-colA″-cpeT	180 / 60	Collagenase A */ C. sporogenes*
pET29a-orf5″-cpeT	180 / 60	Orf5 */ C. acetobutylicum*
pET29a-pec″-cpeT	180 / 60	Pectate Lyase */ C. acetobutylicum*
pET29a-amyP″-cpeT	180 / 60	Amylase P */ C. acetobutylicum*

Bemerkenswert ist, dass alle angedachten Klonierungs-Varianten erfolgreich waren, was bei den Konstrukten mir den kurzen Signalpeptiden nicht der Fall war. In den folgenden Abbildungen 16, 17, 18 und 19 sind die graphischen Ergebnisse der SignalP-Analysen für die neuen, verlängerten *chiti″-cpe*- und -*cpeT*-Konstrukte aufgeführt.

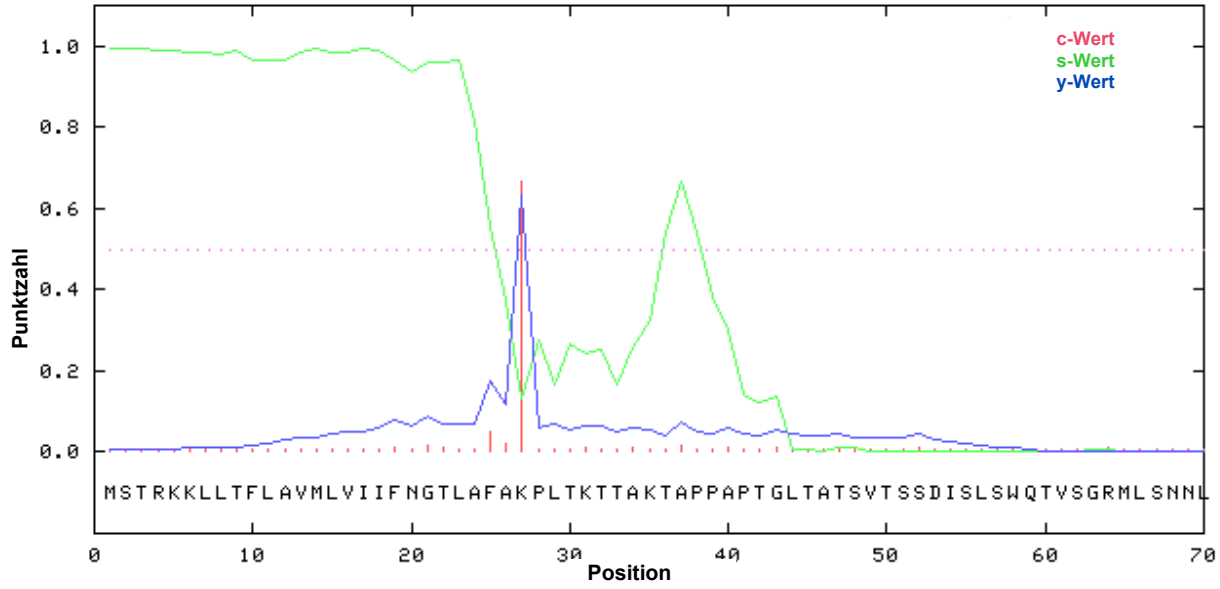


Abbildung 16: Vorhersage eines Signalpeptids am N-Terminus des Chiti″-CPE-Fusionsproteins für Gram-negative Organismen.
c-Wert: Vorhersage, ob eine AS nach Art und Position Bestandteil eines Signalpeptids ist.
s-Wert: Vorhersage über die Schnittwahrscheinlichkeit für jede Position des Signalpeptids.
y-Wert: Kombination aus den C- und S-Werten zur verbesserten Vorhersage der Schnittposition.

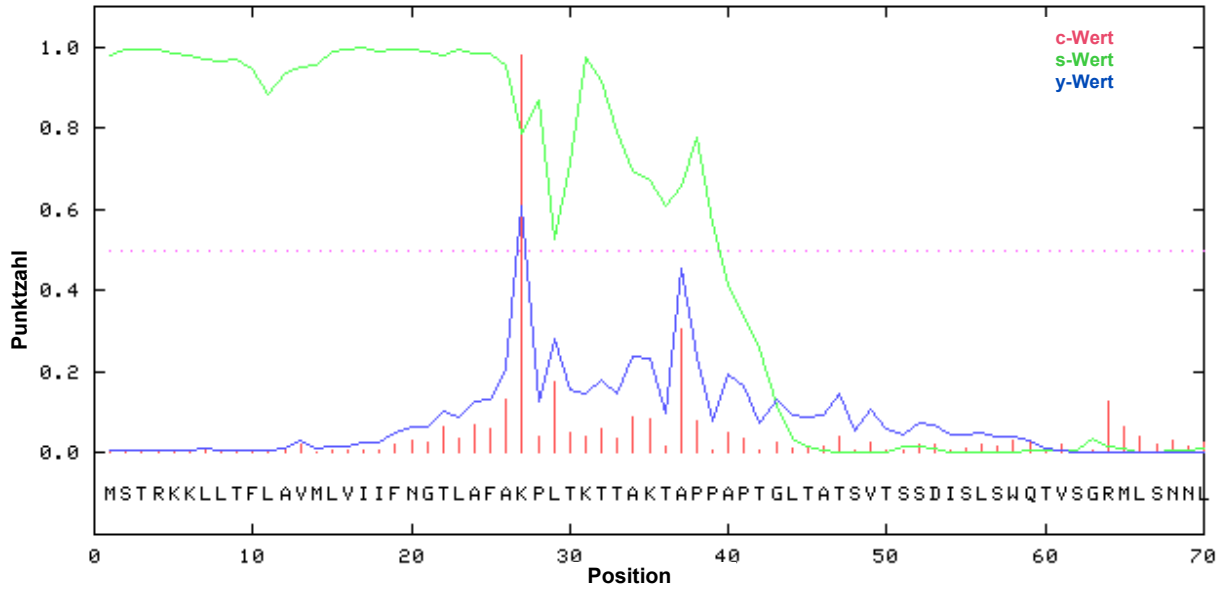


Abbildung 17: Vorhersage eines Signalpeptids am N-Terminus des Chiti″-CPE-Fusionsproteins für Gram-positive Organismen.
c-Wert: Vorhersage, ob eine AS nach Art und Position Bestandteil eines Signalpeptids ist.
s-Wert: Vorhersage über die Schnittwahrscheinlichkeit für jede Position des Signalpeptids.
y-Wert: Kombination aus den C- und S-Werten zur verbesserten Vorhersage der Schnittposition.

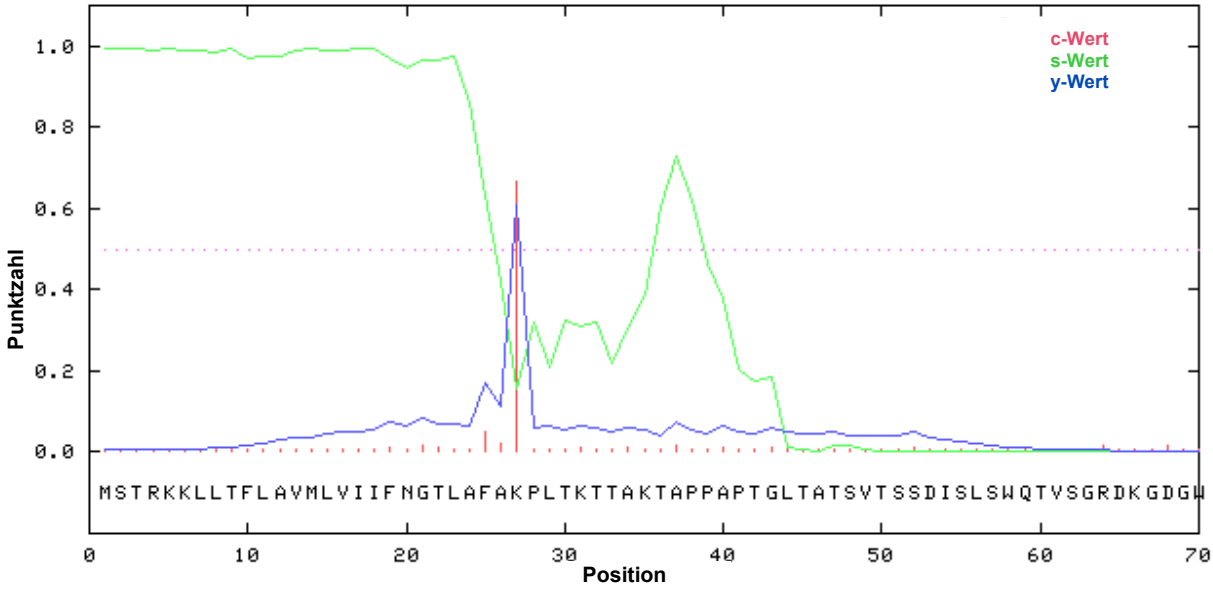


Abbildung 18: Vorhersage eines Signalpeptids am N-Terminus des Chiti″-CPE-T-Fusionsproteins für Gram-negative Organismen.
c-Wert: Vorhersage, ob eine AS nach Art und Position Bestandteil eines Signalpeptids ist.
s-Wert: Vorhersage über die Schnittwahrscheinlichkeit für jede Position des Signalpeptids.
y-Wert: Kombination aus den C- und S-Werten zur verbesserten Vorhersage der Schnittposition.

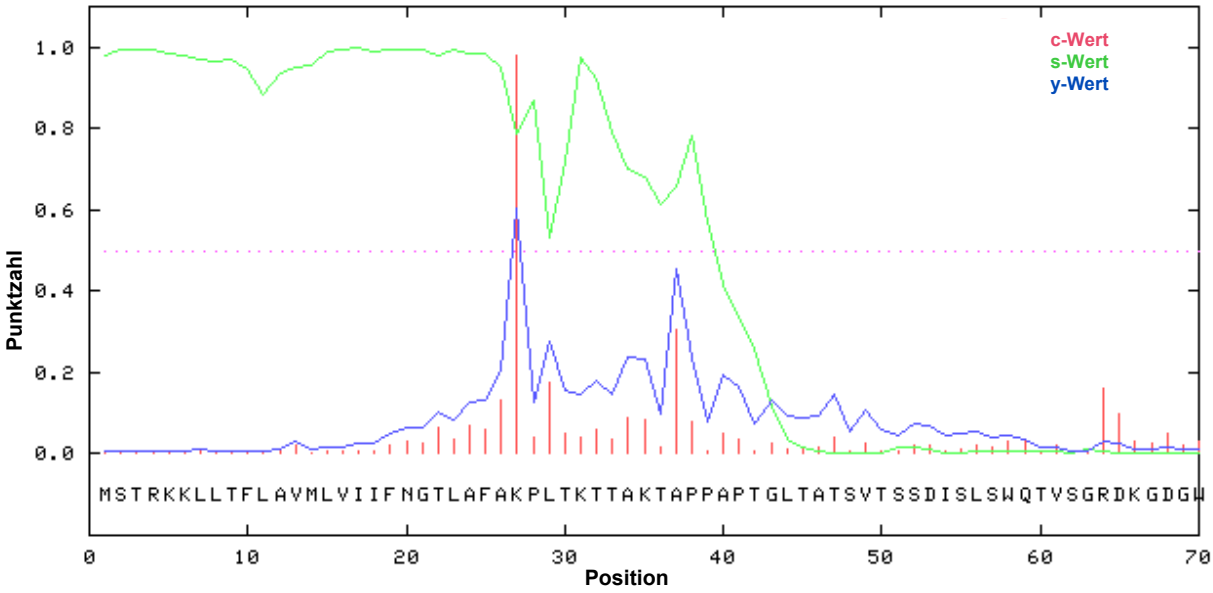


Abbildung 19: Vorhersage eines Signalpeptids am N-Terminus des Chiti″-CPE-T-Fusionsproteins für Gram-positive Organismen.
c-Wert: Vorhersage, ob eine AS nach Art und Position Bestandteil eines Signalpeptids ist.
s-Wert: Vorhersage über die Schnittwahrscheinlichkeit für jede Position im Signalpeptids.
y-Wert: Kombination aus den C- und S-Werten zur verbesserten Vorhersage der Schnittposition.

Im Vergleich zu den Vorhersagen für die CPE-Konstrukte (Abbildungen 16 und 17) ist keine Änderung in der Schnittwahrscheinlichkeit und/oder der -position zu erkennen. Dies gilt ebenso für den Vergleich aller bisherigen graphischen SignalP-Auswertungen untereinander.

Um die Verträglichkeit der neuen Konstrukte für *E. coli* zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Dabei wurden alle erzeugten Klone in einem Experiment miteinander verglichen. Einige zusammengehörende Beispiele sind als Wachstumskurven in den folgenden Abbildungen 20, 21 und 22 dargestellt.

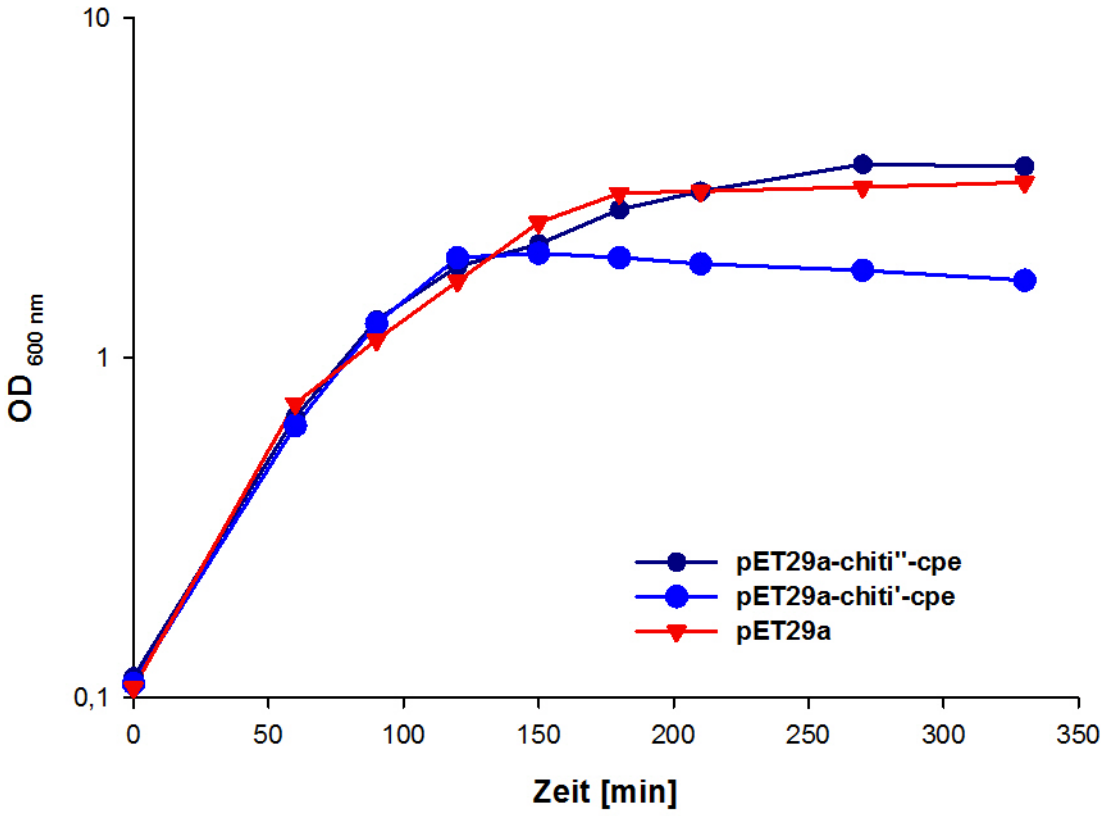


Abbildung 20: Wachstumsversuch mit *E. coli* BL21 (DE3) pET29a-chiti′-cpe und pET29a-chiti″-cpe im Vergleich. Die Induktion erfolgte mit IPTG (Endkonzentration im Medium 1 mM) bei einer OD $_{600\ nm}$ von 1.

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass einige Konstrukte mit den verlängerten Signalpeptid-Sequenzen im Vergleich zu den bisherigen nach der Induktion ein besseres Wachstumsverhalten der *E. coli*-Kulturen ermöglichten.

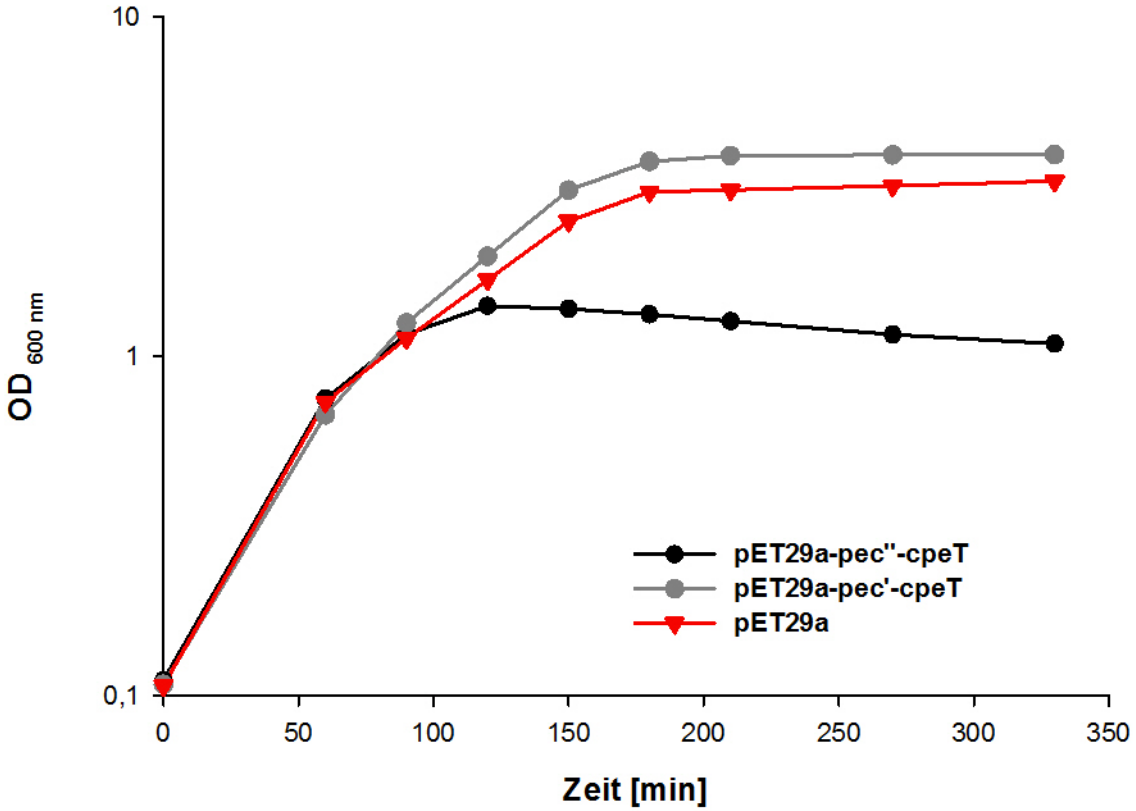


Abbildung 21: Wachstumsversuch mit *E. coli* BL21 (DE3) pET29a-pec′-cpeT und pET29a-pec″-cpeT im Vergleich. Die Induktion erfolgte mit IPTG (Endkonzentration im Medium 1 mM) bei einer OD $_{600\ nm}$ von 1.

Im Gegensatz zu den beiden Konstrukten mit dem kurzen oder verlängerten Signalpeptid einer Chitinase aus *C. acetobutylicum* (Abbildung 20) weisen hier die gezeigten Beispiele ein anderes Wachstumsverhalten auf. Das Konstrukt mit dem kurzen Signalpeptid ist besser verträglich als das neue.

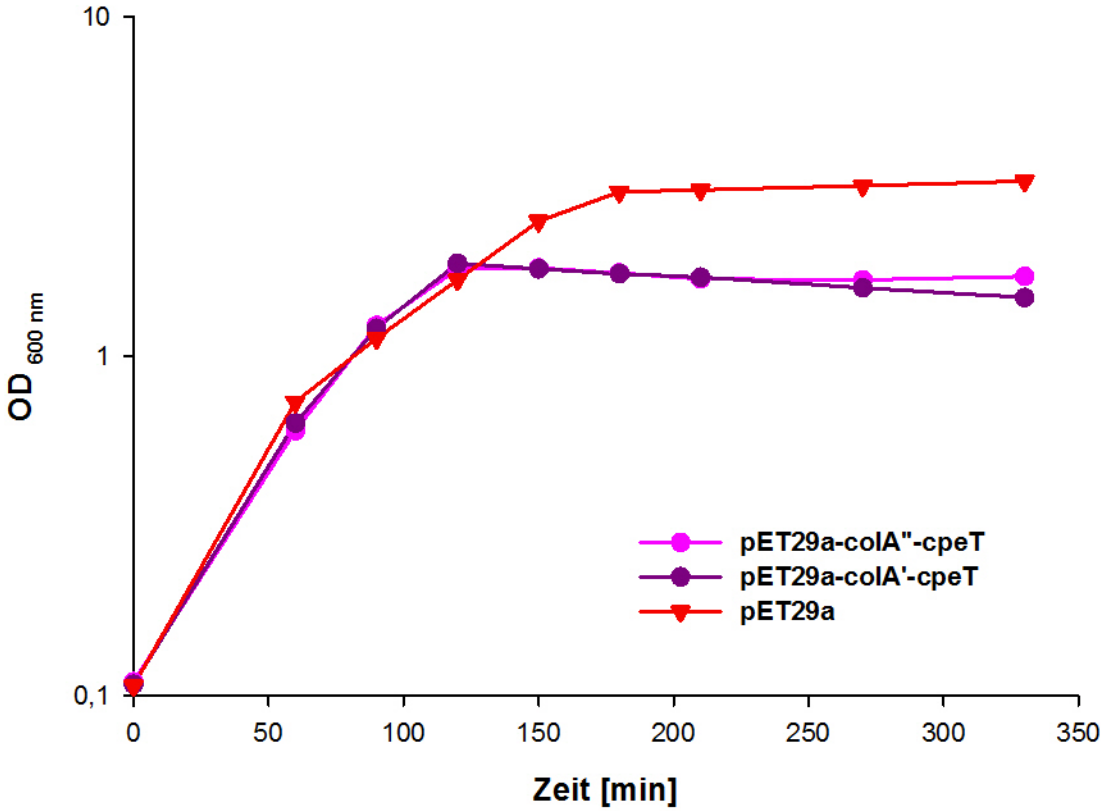


Abbildung 22: Wachstumsversuch mit *E. coli* BL21 (DE3) pET29a-colA′-cpeT und pET29a-colA″-cpeT im Vergleich. Die Induktion erfolgte mit IPTG (Endkonzentration im Medium 1 mM) bei einer OD $_{600\ nm}$ von 1.

Die Abbildung 22 zeigt die 3. Möglichkeit auf. Hier gibt es keinen merklichen Unterschied in der Verträglichkeit der Signalpeptide, unabhängig von deren Länge.

Diese Erkenntnisse flossen in die Erstellung neuer Sp-CPE/T-Expressionssysteme ein, so dass sowohl kurze als auch lange Signalpeptidsequenzen Verwendung fanden.

3.8. Konstruktion induzierbarer Promotoren

Da für die erwünschte permanente Produktion der Fusionsproteine in *C. sporogenes* nur konstitutiv aktive Promotoren verwendet werden können, verursacht deren Aktivität auch die Bildung des Toxins im Zwischenwirt *E. coli*, was für diesen letal ist. Um letzteres zu verhindern, wurden induzierbare Promotoren gesucht bzw. konstruiert, deren Repressor nur in *E. coli* vorkommt, nicht jedoch in *C. sporogenes*. Somit wäre die Expression der Genkonstrukte in *E. coli* reprimiert, in *Clostridium* jedoch aufgrund des fehlenden Repressors permanent aktiviert.

3.8.1. Das TetR-Projekt

Das TetR-System ist in *E. coli* strikt reguliert. Ein Promoter, der eine oder mehrere Bindestellen (*tetO*) für den Repressor TetR aufweist, ist in Anwesenheit dieses Proteins so stark reprimiert, dass z.T. keine Hintergrundaktivität mehr nachgewiesen werden kann. In der Literatur (Kamionka et al, 2004) ist u.a. ein Promoter mit einer Konsensus-Sequenz und 2 *tetO*-Bereichen beschrieben, der in *E. coli* 300fach reprimiert und in *Bacillus subtilis* nach Induktion stark aktiv ist. Das *tetR*-Gen war hierbei plasmidkodiert.

Dieser Promoter wurde kommerziell als ssDNA synthetisiert und mit entsprechenden „Primern“ in einer PCR amplifiziert. In der Abbildung 23 ist ein Schema des Promoter-Konstruktes dargestellt:

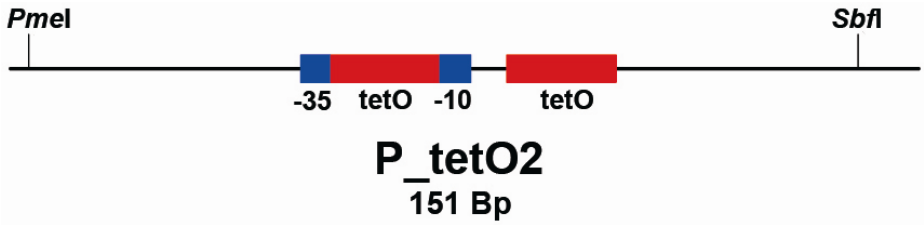


Abbildung 23: Der tetO2-Promoter.

Als Vektor für diesen Promoter wurde das Plasmid pMTL verwendet, welches auf dem konjugativen *E. coli-Clostridium*-Schaukelvektor pMTL007 basiert. Aus dem letztgenannten wurde zunächst das *lacI*-Gen deletiert und anschließend das Rückgrad dieses neuen pMTL007Δ*lacI*-Vektors unter Aus-lassung der ClosTron-Kassette (*Integron Gruppe II* und *ltrA*) inklusive des zugehörigen Promoters P_{fac} amplifiziert und religiert. Der so erzeugte pMTL-Vektor ist in der Abbildung 24 dargestellt.

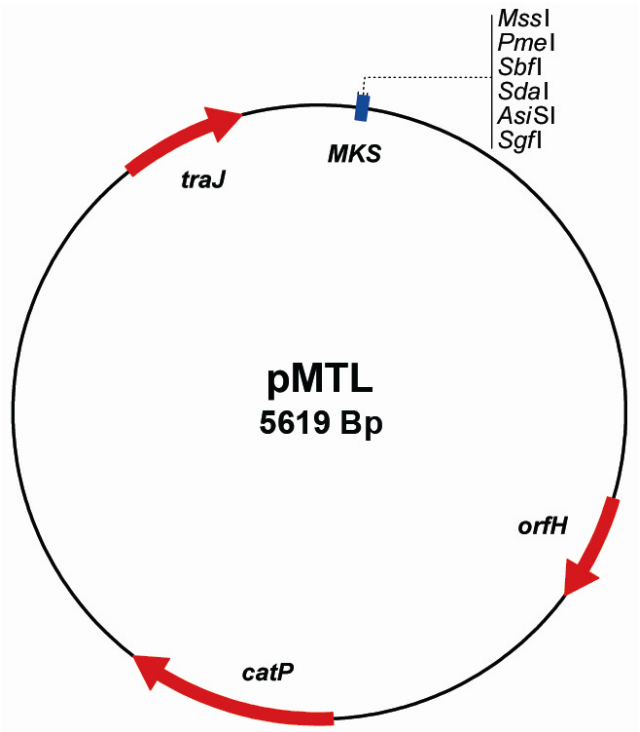


Abbildung 24: Der konjugative *E.coli-Clostridium*-Schaukel-Vektor pMTL.

In dieses Plasmid wurde der tetO2-Promoter kloniert. Der entstandene Vektor wurde als pMTL-P_tetO2 bezeichnet und diente als Expressionsystem für verschiedene *sp-cpe* und *sp-cpeT*-Kombinationen.

Die ersten Klonierungsversuche mit *sp-cpe/T*-Fragmenten ergaben jedoch keine positiven Klone, obgleich als Klonierungs-Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF′ verwendet wurde und dieser das Repressor-Gen *tetR* besitzt.

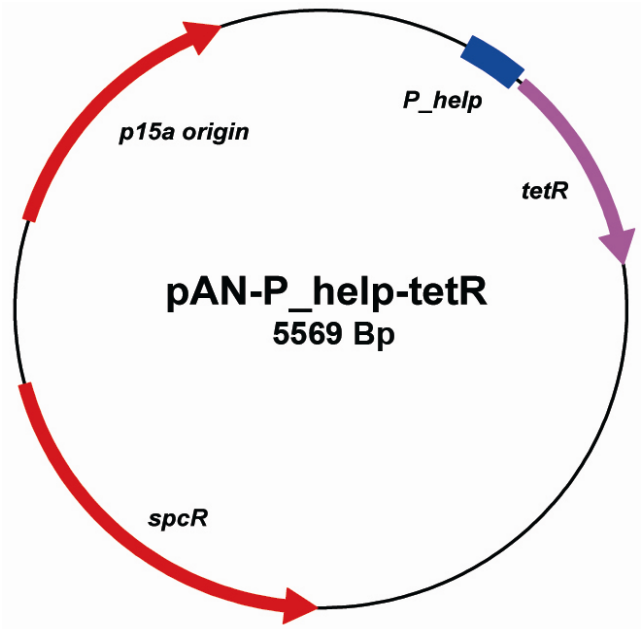


Abbildung 25: Das Repressor-Plasmid pAN-P_help-tetR.

Um die Effizienz der Reprimierung zu erhöhen, wurde deshalb ein Plasmid auf Basis des pANS1-Vektors konstruiert, welches das *tetR*-Gen mit einer optimierten RBS unter der Kontrolle des starken konstitutiven Promoters P_{help} trägt. In der Abbildung 25 ist dieses Repressor-Plasmid pAN-P_help-tetR aufgeführt. Dieses wurde nach Fertigstellung in alle *E. coli*-Stämme transformiert, die für die Klonierung oder Beherbergung

der Expressions-Vektoren verwendet wurden.
Durch die Einführung des Repressor-Plasmids in die Klonierungsstrategie konnte die Effizienz der Klonierung von *sp-cpe/T*-Fragmenten in pMTL-P_tetO2 drastisch erhöht werden. Dadurch war es möglich, die in der Tabelle 30 aufgeführten Konstrukte zu erzeugen.

Tabelle 30: Konstruierte pMTL-P_tetO2-sp-cpe/T-Vektoren

Bezeichnung	Klonierungs-Stamm
pMTL-P_tetO2-amyP′-cpeT	*E. coli* XL1 Blue MRF′ (pAN-P_help-tetR)
pMTL-P_tetO2-colA′-cpe	*E. coli* XL1 Blue MRF′ (pAN-P_help-tetR)
pMTL-P_tetO2-colA′-cpeT	*E. coli* XL1 Blue MRF′ (pAN-P_help-tetR)
pMTL-P_tetO2-orf5′-cpeT	*E. coli* XL1 Blue MRF′ (pAN-P_help-tetR)
pMTL-P_tetO2-pec′-cpeT	*E. coli* XL1 Blue MRF′ (pAN-P_help-tetR)
pMTL-P_tetO2-plc′-cpe	*E. coli* XL1 Blue MRF′ (pAN-P_help-tetR)
pMTL-P_tetO2-plc′-cpeT	*E. coli* XL1 Blue MRF′ (pAN-P_help-tetR)

In der Abbildung 26 ist ein solches Expressions-Plasmid exemplarisch dargestellt:

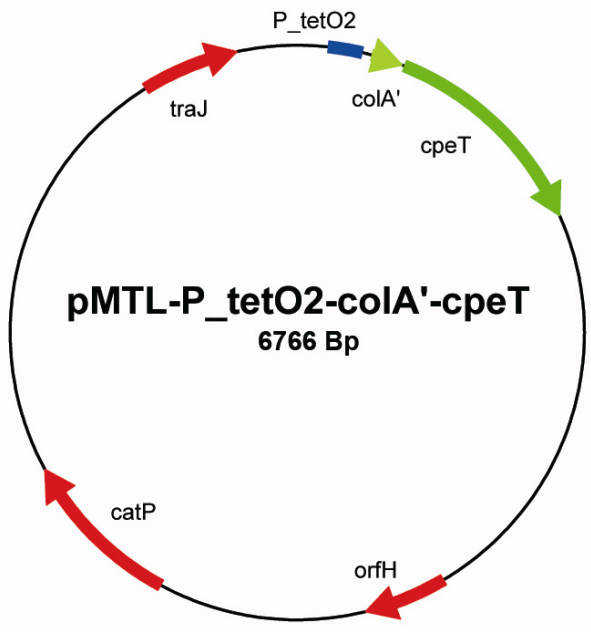


Abbildung 26: pMTL-P_tetO2-colA′-cpeT.

Um die in der Literatur beschriebene Funktionalität des P_{tetO2} in *E. coli* zu belegen, wurden Wachstumsversuche mit diesen Klonen in LB-Medium durchgeführt, wobei bei einer $OD_{600\ nm}$ von 1 die Induktion mit Tetracyclin (Endkonzentration 20 µg/ml) erfolgte. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in der Abbildung 27 aufgeführt.

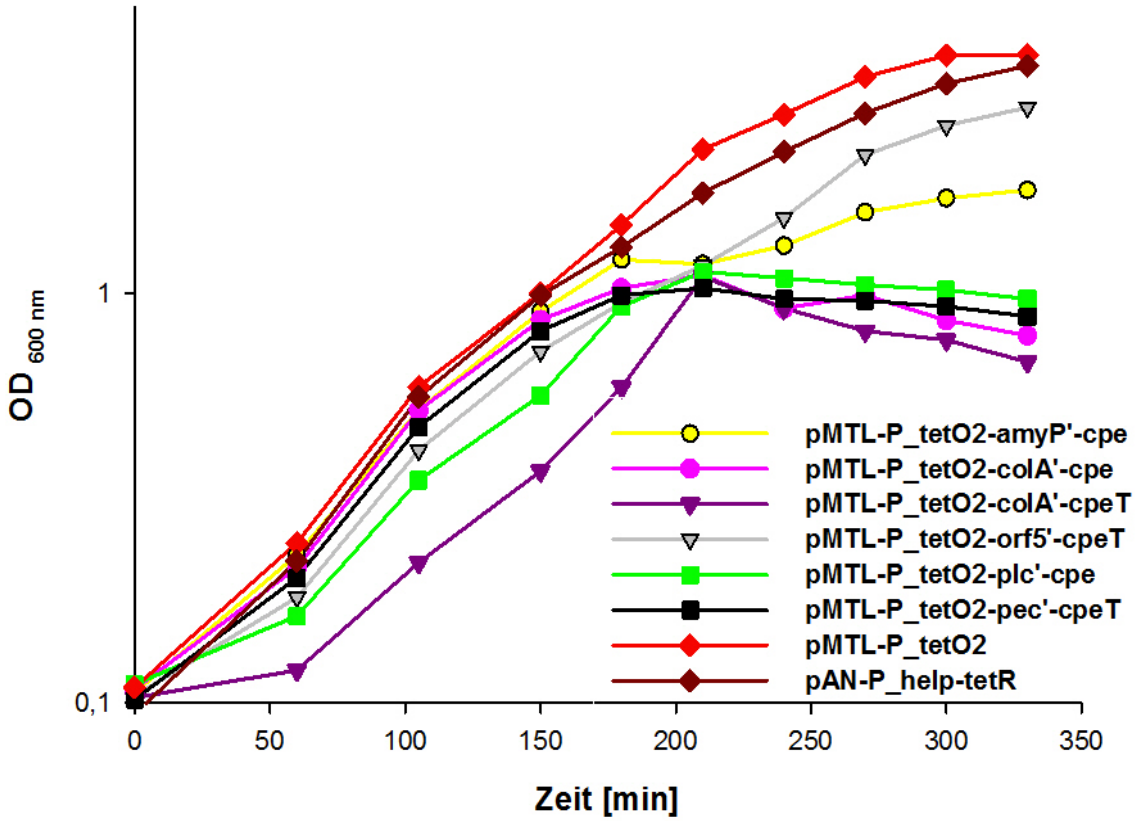


Abbildung 27: Wachstumsversuch mit *E. coli* XL1-Blue MRF′ pMTL-P_tetO2-sp′-cpe/T-Klonen. Die Induktion erfolgte mit Tetracyclin (Endkonzentration im Medium 20 µg/ml) bei einer OD $_{600\ nm}$ von 1.

Nach der Induktion wuchsen nur noch die Kontrollen (Kulturen mit pAN-P_help-tetR oder pMTL-P_tetO2) normal weiter. Alle andern Kulturen zeigten deutliche Wachstumsnachteile, wobei ebenfalls der Effekt der unterschiedlichen Verträglichkeit der Fusionsproteine zu beobachten war (vergleiche Abbildung 15).

Neben diesen Experimenten wurden auch Transformations-Versuche durchgeführt. Dabei sollten Plasmidpräparationen, die die sp-cpe/T-Konstrukte und das Repressor-Plasmid enthielten, in *E. coli* CA434 übertragen werden. Dieser Stamm ist bereits gegen Spectinomycin (die Resistenz des Repressor-Plasmids) resistent. Als Kontrollen dienten dieselben Präparationen, in denen aber das Repressor-Plasmid durch ein Restriktionsenzym zerschnitten wurde (Negativ-Kontrolle), sowie pMTL-P_{tetO2} (Positiv-Kontrolle). In der Abbildung 28 ist das Ergebnis eines Test-Verdaus von potentiellen *E. coli* CA434-Klonen mit pMTL-P_{tetO2}-colA′-cpe aufgeführt:

Alle isolierten Klone trugen neben dem Expressions-Plasmid (obere Bande) auch den Repressor-Vektor (untere Bande), obwohl kein Selektionsdruck mittels Spectinomycin aufgebaut werden konnte. Aus der Transformation der Negativ-Kontrolle gingen keine Klone hervor, wogegen der Leer-Vektor mit hoher Effizienz eingebracht werden konnte.

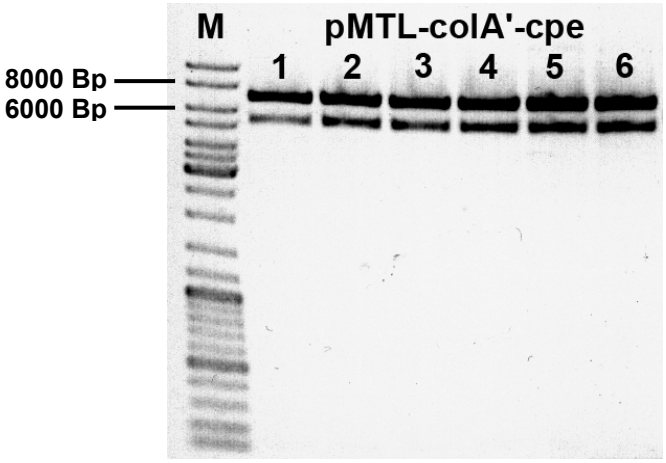


Abbildung 28: Potentielle mit *Sgf*I verdaute pMTL-P_tetO2-colA′-cpe-Plasmidpräparationen aus *E. coli* CA434

Insgesamt konnten folgende Expressions-Plasmide in *E. coli* CA434 transformiert werden, ohne den Repressor-Vektor zuvor an diesen Stamm zu adaptieren:

- pMTL-P_tetO2-plc′-cpe
- pMTL-P_tetO2-colA′-cpe
- pMTL-P_tetO2-colA′-cpeT
- pMTL-P_tetO2-pec′-cpeT

Um die verbliebenen Expressions-Plasmide in *E. coli* CA434 transformieren zu können, wurde das Repressor-Plasmid um eine Ampicillin-Resistenz-Kassette (*bla*-Gen) erweitert. Das pAN-P_help-tetR-bla-Plasmid wurde in den Konjugations-Stamm transformiert.

Parallel zu diesen Arbeiten wurden die bereits in *E. coli* CA434 vorliegenden Expressions-Plasmide in *C. sporogenes* übertragen. Zur Bestätigung der Konjugation wurden „Plasmid-Recoveries“ mit anschließenden Sequenzierungen und PCRs auf die P_tetO2-*sp'-cpe/T*-Fragmente durchgeführt. Von allen vier Konstrukten konnten positive Klone identifiziert werden.

Um die Funktionalität des Expressions-Systems in *C. sporogenes* zu überprüfen und CPE bzw. das Fusionsprotein nachzuweisen, wurden „Western-Blots“ und Immunfärbungen durchgeführt. Dafür wurden die Kulturen bis zu einer $OD_{600\ nm}$ von 1,5 inkubiert, geerntet und aufgeschlossen. Die Cytosol- und Membranfraktionen wurden zusammen mit einer Probe des Überstandes in einer SDS-PAGE getrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und das Fusionsprotein mit Anti-CPE-Antikörpern detektiert. Als Kontrolle dienten 25 ng natives CPE, das neben der 35-

kDa-Bande des Markers (Masse von nativem CPE) auf die Membran getropft wurde. Die vollständige Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch eine Coomassie-Färbung überprüft. Die „Immunblots“ sind in der folgenden Abbildung 29 zusammengefasst:

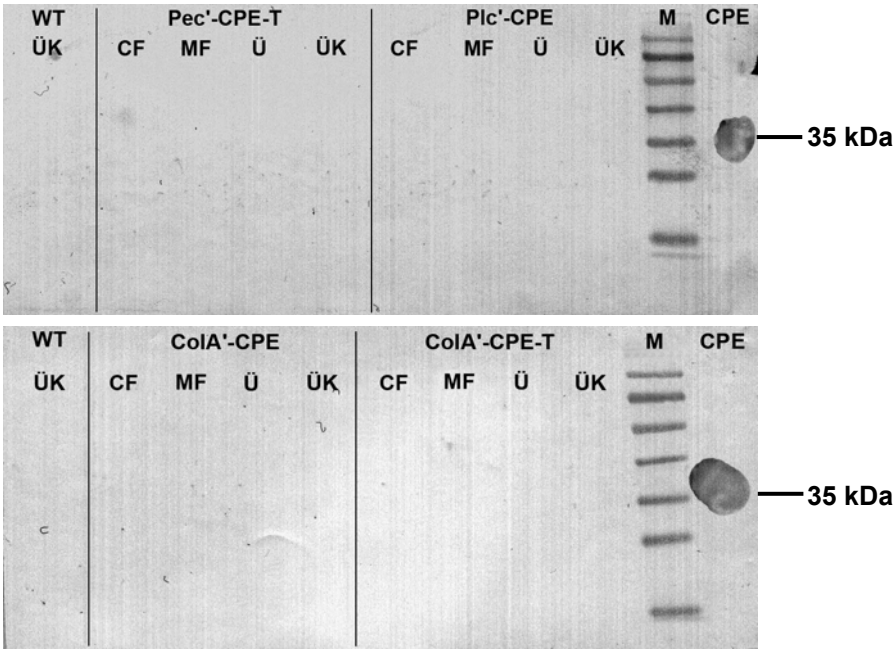


Abbildung 29: Immunblots zur Detektion verschiedener Sp′-CPE/T-Fusionsproteine aus *C. sporogenes.*
WT: Wildtyp, CF: Cytoplasmafraktion, MF: Membranfraktion, Ü: Überstand, ÜK: Überstand konzentriert, M: Marker „Prestained Protein Ladder“ (Fermentas GmbH; St. Leon-Roth), CPE: Positiv-Kontrolle (25 ng natives CPE).

Es ist ersichtlich, dass in keinem Zellkompartiment oder im Medium der überprüften *C. sporogenes*-Kulturen CPE bzw. ein Fusionsprotein nachweisbar war. Eine erneute „Plasmid-Recovery“ mit anschließender Sequenzierung der Expressions-Vektoren ergab, dass keine Mutationen vorlagen. Um die Funktionalität des Promoters in diesem Organismus zu bestätigen, wurde von allen Klonen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase die Gesamt-RNA isoliert und in RT-PCRs eingesetzt. Ergebnisse dieser Experimente können der Abbildung 30 entnommen werden.

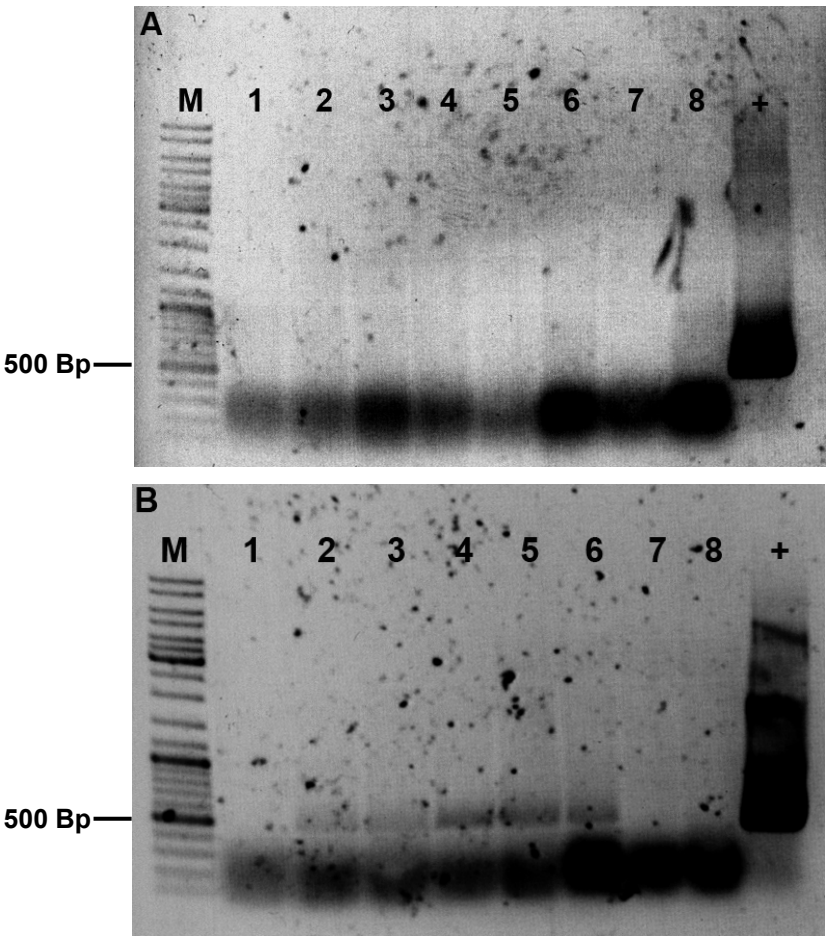


Abbildung 30: Gelbild zu RT-PCR-Versuchen zur Detektion von 500-Bp-Fragmenten von Fusionsprotein- und *catP*-Transkripten.
(A) RT-PCR auf ein 500-Bp-Fragment des *cpe*-Transkripts
M: Marker, Ziffern 1-4: Klone mit pMTL-P_{tetO2}-colA′-cpe-Plasmiden, Ziffern 5-8: Klone mit pMTL-P_{tetO2}-colA′-cpeT-Plasmiden, +: Positiv-Kontrolle (PCR mit dem entsprechenden Vektor als „Template“)
(B) RT-PCR auf ein 500-Bp-Fragment des *catP*-Transkripts
M: Marker, Ziffern 1-4: Klone mit pMTL-$_{PtetO2}$-colA′-cpe-Plasmiden, Ziffern 5-8: Klone mit pMTL-P_{tetO2}-colA′-cpeT-Plasmiden, +: Positiv-Kontrolle (PCR mit dem entsprechenden Vektor als „Template“)

Der obigen Abbildung kann entnommen werden, dass kein Transkript der verschiedenen Fusionsproteine nachgewiesen werden konnte. Das Transkript des Resistenz-Gens *catP*, welches ebenfalls vektorkodiert ist und als Kontrolle für die RT-PCR diente, konnte dagegen detektiert werden. Mit der Positiv-Kontrolle (+) wurde die Funktionalität der verwendeten „Primer“-Paare überprüft.

Da der verwendete Promoter in *E. coli* mit Tetracyclin induzierbar ist und nicht ausgeschlossen werden konnte, dass *C. sporogenes* einen analogen Repressor besitzt, wurden Induktions-Versuche mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums vorgenommen. Dabei war die hemmende Wirkung dieser Substanz

erst bei 0,1 µg/ml gering genug, um ein Wachstum der *C. sporogenes*-Kulturen zu ermöglichen. Bei einer $OD_{600\ nm}$ von 1,5 wurden die Kulturen geerntet, deren Gesamt-RNA präpariert und RT-PCR-Experimente mit entsprechenden Kontrollen durchgeführt. Auch hierbei konnten keine Transkripte von Fusionsproteinen nachgewiesen werden.

3.8.2. Das T7-Projekt

Das T7-Expressions-System ist für *E. coli* umfassend beschrieben worden und wird seit langem für verschiedene induzierbare Expressions-Systeme verwendet. Es hat jedoch den Nachteil einer deutlich messbaren Hintergrundaktivität.

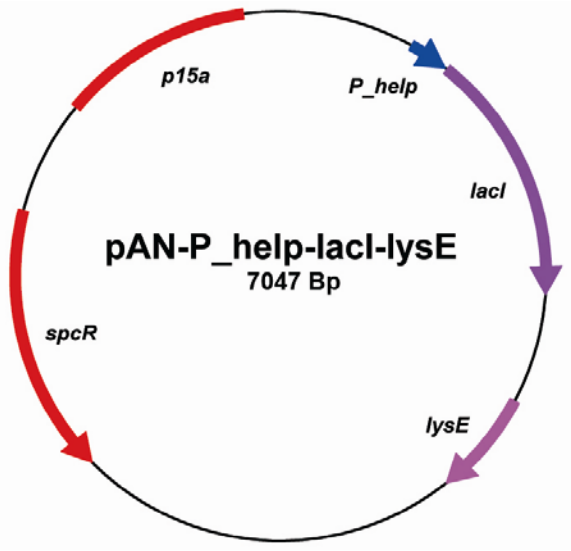


Abbildung 31: Repressor-Vektor für das induzierbare T7-System.

In Rahmen dieses Projektes sollte versucht werden, eine konstititiv aktive Variante des T7-Expressions-Systems in *C. sporogenes* zu etablieren und gleichzeitig den Hintergrund im Zwischenwirt *E. coli* zu minimieren. Hierfür wurde ein Zwei-Vektor-System geschaffen. In der Abbildung 31 ist der Repressor-Vektor für *E. coli* dargestellt. Dieser beruht auf dem pANS1Δmethylase-Vektor, wobei dieser um den starken konstitutiven Promoter P_{help}, ein *lacI*-Gen und ein *lysE*-Gen mit dem *tet*-Promoter erweitert wurde. Das Lys-Genprodukt ist ein spezifischer Inhibitor der T7-RNA-Polymerase und als solcher geeignet, die Hintergrundaktivität von T7-Expressions-Systemen zu minimieren. Dieses Plasmid wurde in alle *E. coli*-Stämme eingebracht, die für die Klonierung oder Beherbergung entsprechender Konstrukte vorgesehen waren. Für *E. coli* CA434 wurde dieser Vektor noch um das *bla*-Gen zur Vermittlung einer Ampicillin-Resistenz erweitert.

Der Expressions-Vektor beruht auf dem *E. coli-Clostridium*-Schaukel-Vektor pMTL. Dieser wurde um einen synthetischen und LacI-reprimierbaren *bdhA*-Promoter mit einem stromabwärts liegenden T7-RNA-Polymerase-Gen ergänzt. Des Weiteren wurde eine aus pET29a stammende T7-Promoter- und Terminator-Sequenz mit dazwischen liegender MKS kloniert. In diese wurden dann mehrere verfügbare sp-

cpe/T-Varianten eingefügt. Dieser letzte Schritt ist in der Abbildung 32 anhand des *colla''-cpe*-Fragments aufgeführt.

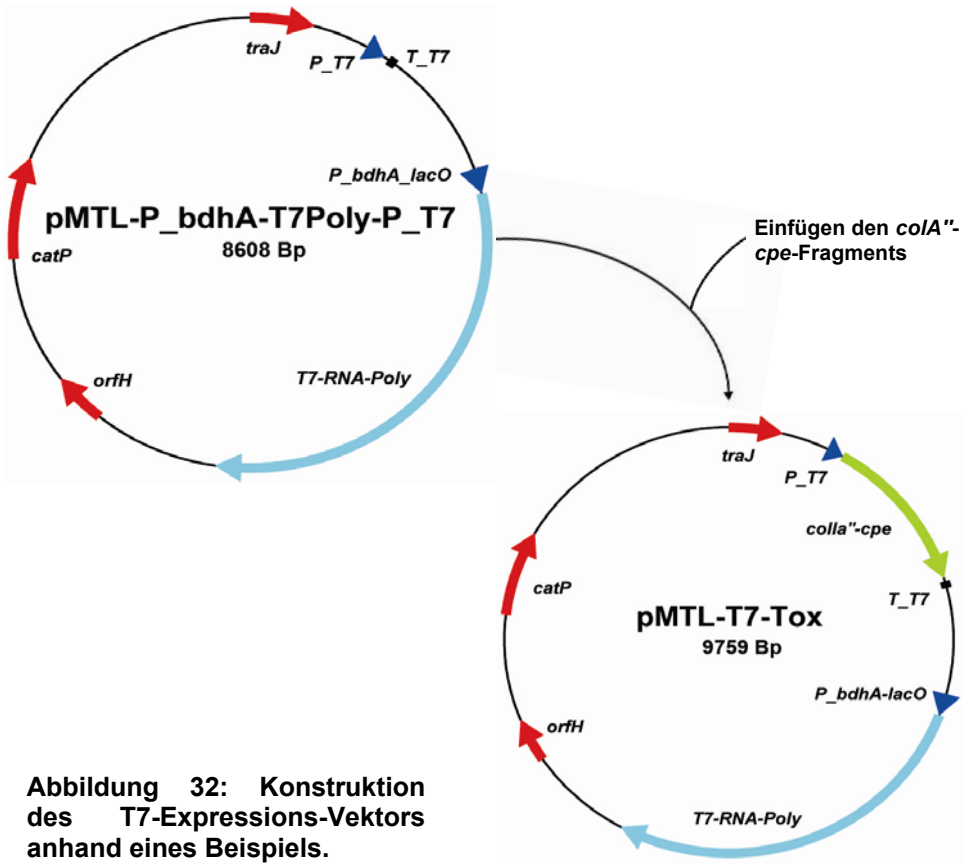


Abbildung 32: Konstruktion des T7-Expressions-Vektors anhand eines Beispiels.

Die Regeneration und anschließende Inkubation der für die Transformation der Ligationen verwendeten *E. coli*-Bakterien erfolgte bei RT für 3-4 Tage. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C sank die Effizienz der Transformation deutlich. In der Tabelle 31 sind die so erzeugten Klone aufgelistet.

Tabelle 31: Erzeugte pMTL-P_bdhA-lacO-T7Poly-P_{T7}-sp-cpe/T-Konstrukte mit kurzen und langen Signalpeptiden.

pMTL-P_bdhA_lacO-T7Poly-P_{T7}-	Klonierungsstamm
amyP′-cpe	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
plc′-cpe	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
colA′-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
orf5′-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
pec′-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
amyP″-cpe	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
plc″-cpe	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
colA″-cpe	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)

chiti″-cpe	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
orf5″-cpe	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
pec″-cpe	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
amyP″-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
plc″-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
colA″-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
chiti″-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
orf5″-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)
pec″-cpeT	*E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-lacI-lysE)

Um die Funktionsfähigkeit dieser Konstrukte in *E. coli* zu belegen, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Bei einer $OD_{600\ nm}$ von 0,7 – 0,8 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. In der Abbildung 33 sind Wachstumskurven für die Konstrukte mit kurzen Signalpeptiden dargestellt.

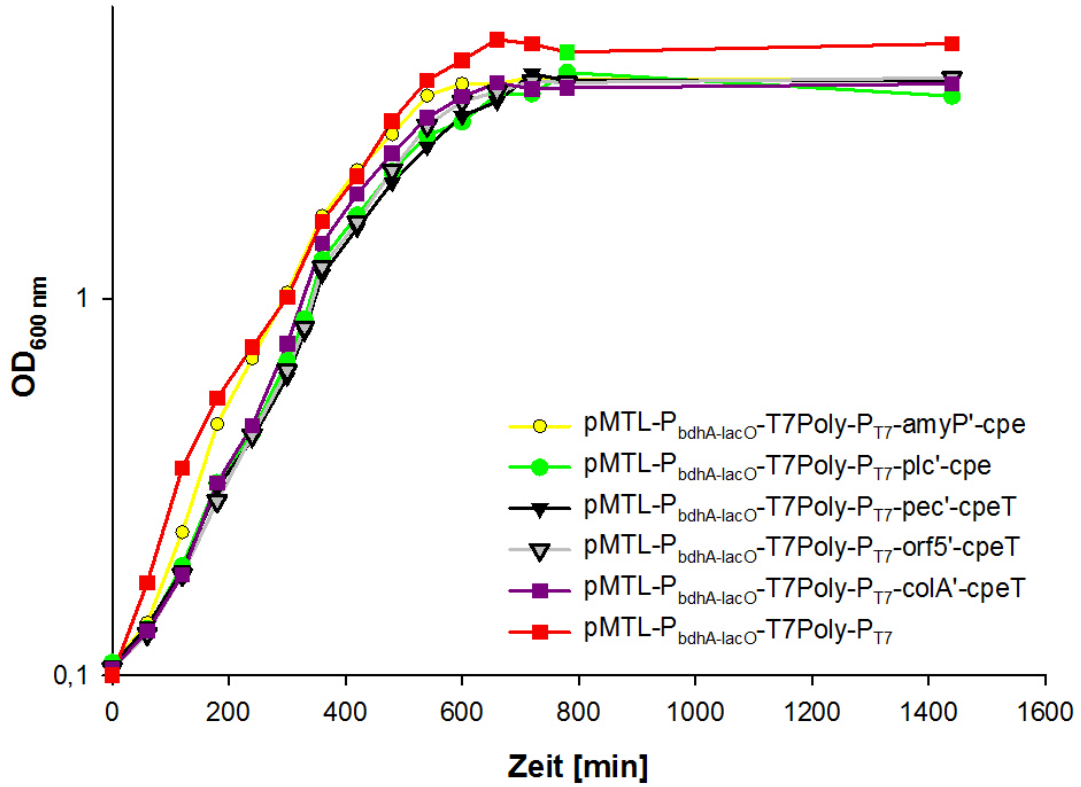


Abbildung 33: Wachstumsversuche mit verschiedenen pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}-sp′-cpe/T-Konstrukten Die Induktion erfolgte mit IPTG (Endkonzentration im Medium 1 mM) bei einer $OD_{600\ nm}$ von 1.

Anhand der obigen Abbildung ist ersichtlich, dass die Klone im direkten Vergleich zu den entsprechenden pET29a-Konstrukten (vgl. Abbildungen 14 und 15) deutlich besser wuchsen. Wachstumsverlauf und End-OD differierten bezogen auf die Kontrolle nur wenig. Während des Wachstums wurden vor und nach der Induktion Proben für „Immunblots“ aller Zellkompartimente und des Kulturüberstandes entnommen. In der folgenden Abbildung 34 sind die Ergebnisse für einige Klone aufgeführt.

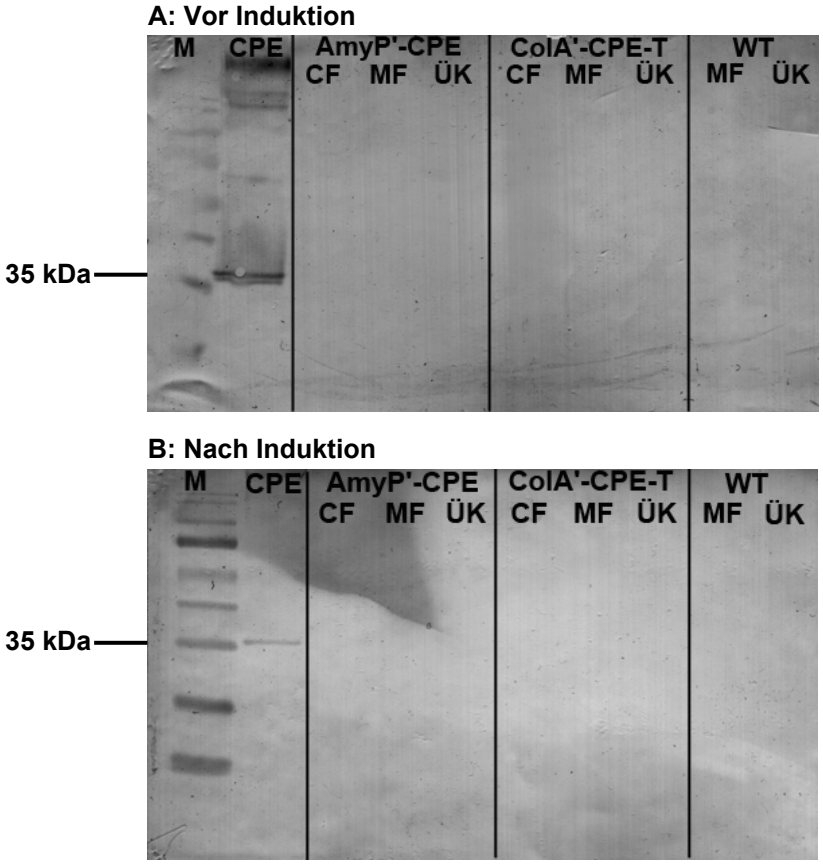


Abbildung 34: „Immunblots“ zur Detektion von Sp′-CPE/T-Varianten aus *E. coli* XL1-Blue MRF′ (pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-T7Poly-P_{T7}-sp′-cpe/T).

WT: Wildtyp, CF: Cytoplasmafraktion, MF: Membranfraktion, Ü: Überstand, ÜK: Überstand konzentriert, M: Marker „Prestained Protein Ladder“ (Fermentas GmbH; St. Leon-Roth), CPE: Positiv-Kontrolle (25 ng natives CPE).

Es konnten weder vor noch nach der Induktion Fusionsproteine nachgewiesen werden. Dies galt für alle erzeugten Konstrukte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Rahmen des parallel durchgeführten Projektes P_{bdhA} die Funktionalität der einzelnen Komponenten dieses Systems überprüft.

3.8.3. Das P_{bdhA}-Projekt

G. Box konnte während seiner Doktorarbeit erfolgreich ein auf der Basis des schwach konstitutiv aktiven Promoters des *bdhA*-Gens basierendes AmyP′-CPE-Expressions-System für *C. acetobutylicum* konstruieren. Allerdings konnte er trotz wiederholter intensiver Bemühungen nur einen positiven Klon identifizieren.

Als erster Schritt des T7-Projekts wurde ein synthetischer *bdhA-lacO*-Promoter erzeugt, der durch LacI reprimiert werden kann. Dieser sollte in diesem Projekt verwendet werden, um verschiedene Sp-CPE/T-Varianten zu exprimieren. Durch die zusätzliche Inhibierung des schwachen Promoters sollte die Effizienz der Klonierungen erhöht werden. Der Nachweis der Bildung des Fusions-proteins diente gleichzeitig zur Bestätigung der Funktionalität des Promoters. In der Abbildung 35 ist exemplarisch ein konstruiertes Plasmid dargestellt. Alle Varianten dieses Vektors wurden in *E. coli* CA434 transformiert und anschließ-end in *C. sporogenes* konjugiert. Die in *E. coli* CA434 vorliegenden und anschließend in *C. sporogenes* eingebrachten Konstrukte können der folgenden Auflistung (Tabelle 32) entnommen werden.

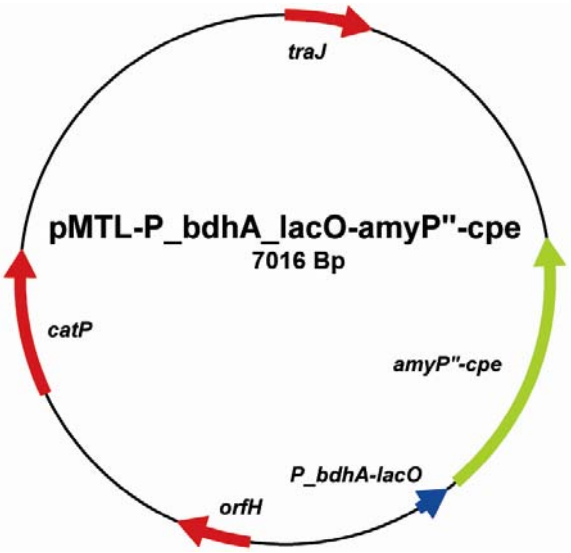


Abbildung 35: Beispiel eines erfolgreich klonierten pMTL-P_bdhA-lacO-sp″-cpe-Vektors.

Tabelle 32: pMTL-P_bdhA_lacO-sp″-cpe-Konstrukte

Bezeichnung	*E. coli*	*C. sporogenes*
pMTL-P_bdhA_lacO-amyP′-cpeT	x	x
pMTL-P_ bdhA_lacO -colA′-cpeT	x	x
pMTL-P_ bdhA_lacO -chiti′-cpeT	x	n.g.
pMTL-P_ bdhA_lacO -orf5′-cpeT	x	x
pMTL-P_ bdhA_lacO -pec′-cpeT	x	x
pMTL-P_ bdhA_lacO -chiti′-cpe	x	x
pMTL-P_ bdhA_lacO -plc′-cpeT	x	x

n.g.: nicht gewachsen

Die erfolgreiche Konjugation wurde mittels einer PCR auf das *sp″-cpe/T*-Fragment überprüft. Anschließend wurden die Klone anaerob angezogen und in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase Proben des Überstandes genommen, konzentriert und für „Immunblots“ verwendet. In der Abbildung 36 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt.

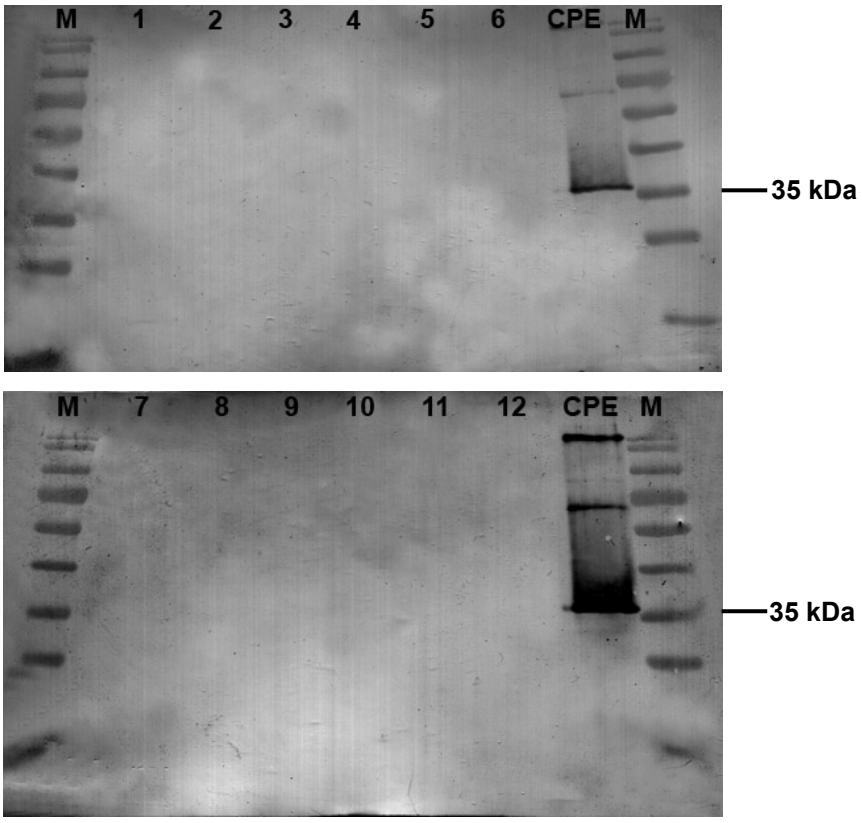


Abbildung 36: Immunblots zur Detektion von Sp′-CPE/T-Varianten aus *C. sporogenes* (pMTL-$P_{bdhA\text{-}lacO}$-sp′-cpe/T).
1: AmyP″-CPE-T, 2: AmyP″-CPE-T konz., 3: Pec″-CPE-T, 4: Pec″-CPE-T konz., 5: Plc″-CPE-T, 6: Plc″-CPE-T konz., 7: Chiti″-CPE, 8: Chiti″-CPE konz., 9: ColA″-CPE-T, 10: ColA″-CPE-T konz., 11: Orf5″-CPE-T, 12: Orf5″-CPE-T konz., M: Marker „Prestained Protein Ladder“ (Fermentas GmbH; St. Leon-Roth), CPE: Positiv-Kontrolle (25 ng natives CPE).

Es ist ersichtlich, dass kein CPE mit den spezifischen Antikörpern im Überstand der *C. sporogenes*-Kulturen detektiert werden konnte. Um die Funktionalität des Promoters in *E. coli* zu überprüfen, wurde stromabwärts ein promoterloses Gen für eine Kanamycinresistenz eingefügt und das Konstrukt in dieses Bakterium transformiert. Nach einer Inkubation dieser Klone auf Agarplatten mit 5, 10, 15 und 30 µg/ml Kanamycin (Endkonzentration) konnte im Vergleich zu den Kontrollplatten kein erhöhtes Wachstum nachgewiesen werden.

Da für *C. acetobutylicum* und *E. coli* die Funktionstüchtigkeit des nativen *bdhA*-Promoters nachgewiesen wurde, sollte dieser als Ersatz für den kürzeren synthetischen $P_{bdhA\text{-}lacO}$ dienen. Der Promoter wurde aus p7BIG2TOX amplifiziert, stromabwärts um eine *lacO*-Sequenz erweitert und in pMTL kloniert. Die Bestätigung erfolgte mittels analytischer Restriktionsverdaue und Sequenzierungen. Im nächsten Schritt erfolgte die gerichtete Klonierung von *amyP''-cpeT*- und *colA''-cpeT*-Fragmenten in diesen Vektor. Da der Replikationsursprung des pMTL-Vektors für Gram-positive Organismen instabil ist, wurde dieser abschließend durch den entsprechenden Ursprung aus pJIR750 ersetzt. Es konnte erfolgreich ein Konstrukt hergestellt werden. Dieses wurde als pD2-colA″-cpeT bezeichnet und in *E. coli* CA434 transformiert. Es ist in der Abbildung 37 dargestellt.

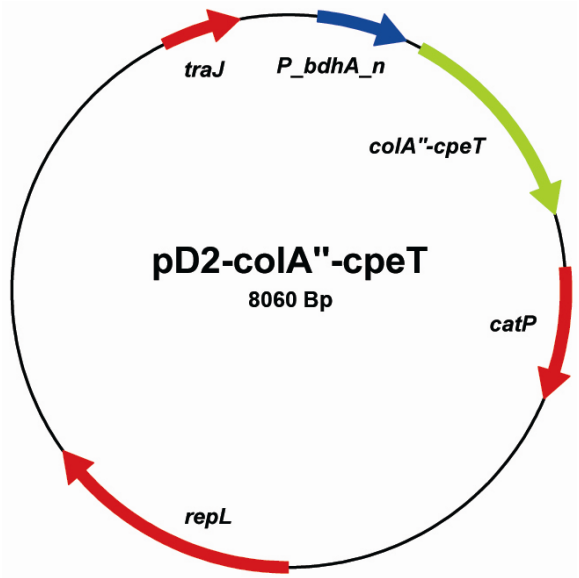


Abbildung 37: Der neue *E. coli-Clostridium*-Schaukelvektor pD2-colA″-cpeT.

Dieser Vektor konnte erfolgreich in *E. coli* CA434 transfomiert werden. Alle Konjugationsversuche mit *C. sporogenes* ergaben jedoch keinen positiven Klon.

Gleichzeitig wurde auch der entsprechende Vektor mit dem ursprünglichen Replikationsursprung in *C. sporogenes* übertragen. Diese Experimente ergaben positive Klone, für die jedoch keine CPE-Prodiktion nachgewiesen werden konnte.

3.8.4. Das *abrB310*-Projekt

In diesem Projekt sollte der modifizierte Promoter des clostridiellen *abrB310*-Gens zur Expression der verschiedenen Fusionsprotein-Gene in *C. sporogenes* verwendet werden. Dieser Promoter besitzt nativ 2 Transkriptions-Startpunkte (A1 und A2), die jeweils getrennte -35- und -10-Regionen besitzen (Abbildung 38).

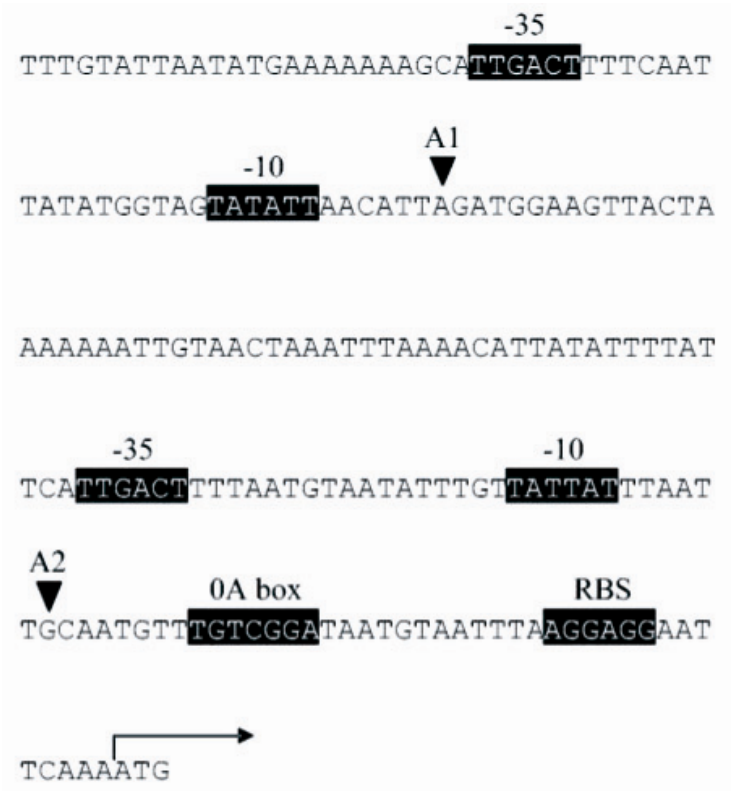


Abbildung 38: Promoterbereich des *abrB310*-Gens (Scotcher et al., 2004).

Es sollte zunächst der gesamte Promoter (A1A2), als auch nur der A2-Bereich amplifiziert werden. Durch die Verwendung entsprechender „Primer“ wurde die „0A box“ im Bereich des Transkriptions-Startpunktes A2 durch eine *tetO*-Sequenz ersetzt. In der folgenden Abbildung 39 ist ein Kontroll-Gelbild der PCR zu sehen.

Trotz wiederholter Versuche konnte der $P_{abrB310\text{-}A2}$ nicht in größerer Menge amplifizert werden (siehe Abb. 39, Spur 2). Beide Fragmente wurden gereinigt und in pMTL kloniert. Es konnte ein positiver Klon mit pMTL-$P_{abrB310\text{-}A1A2}$ erzeugt werden, wogegen kein positiver Klon mit dem verkürzten Promoter identifiziert werden konnte.

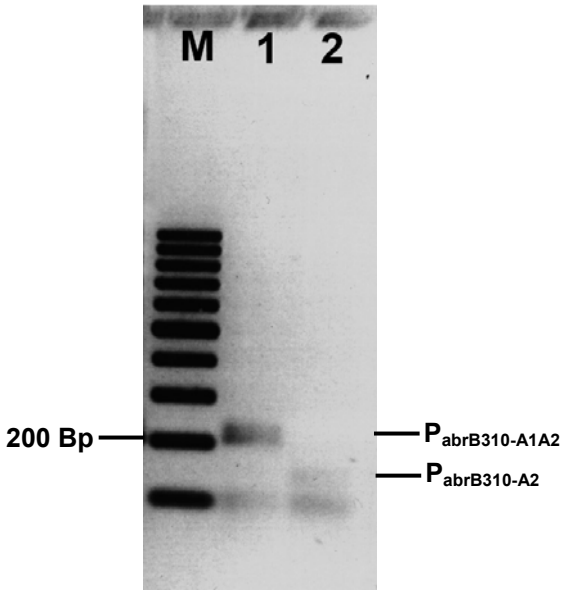


Abbildung 39: PCR zu Amplifikation von $P_{abrB310-A1A2}$ und $P_{abrB310-A2}$.
M: Marker „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ (Fermentas GmbH; St. Leon-Roth);
1: $P_{abrB310-A1A2}$-Fragment,
2: $P_{abrB310-A2}$-Fragment.

Die in der Tabelle 33 aufgelisteten Fragmente wurden in pMTL-$P_{abrB310-A1A2}$ kloniert und in *E. coli* XL1-Blue MRF′ (pAN-P_{help}-tetR) transformiert.

Tabelle 33: Durchgeführte Klonierungsversuche mit pMTL-$P_{abrB310-A1A2}$ und verschiedenen Sequenzen für Fusionsprotein-Konstrukte

Fragment	pMTL-$P_{abrB310-A1A2}$ mit	potentiell positive Klone	Fragmenteigen-schaften
amyP'-cpe	x	n.g.	kurzes SP
plc'-cpe	x	n.g.	kurzes SP
colA'-cpe	x	n.g.	kurzes SP
chiti'-cpe	x	n.g.	kurzes SP
pec'-cpe	x	n.g.	kurzes SP
colA'-cpeT	x.	n.g.	kurzes SP
orf5'-cpeT	x	n.g.	kurzes SP
pec'-cpeT	x	n.g.	kurzes SP
amyP''-cpe	x	ja	langes SP
plc''-cpe	x	ja	langes SP
colA''-cpe	x	ja	langes SP
chiti''-cpe	x	ja	langes SP

orf5″-cpe	x	ja	langes SP
pec″-cpe	x	ja	langes SP
amyP″-cpeT	x	ja	langes SP
plc″-cpeT	x	ja	langes SP
colA″-cpeT	x	ja	langes SP
chiti″-cpeT	x	ja	langes SP
orf5″-cpeT	x	ja	langes SP
pec″-cpeT	x	ja	langes SP

x: Klonierung durchgeführt
n.g.: nicht gewachsen

Die auf den entsprechenden Agar-Platten gewachsenen Kolonien wurden kultiviert, deren Plasmide isoliert und charakterisiert. Es konnte ein positiver Klon identifiziert werden. Dieser trug das Plasmid pMTL-$P_{abrB310-A1A2}$-orf5″-cpeT, wies jedoch in der dem A2-Promoter zugerechneten -35-Region eine Punktmutation (TT**G**ACT → TT**C**ACT) auf. Trotzdem wurde dieses Plasmid in *E. coli* CA434 (pAN-P_help-tetR) transformiert und dann in *C. sporogenes* konjugiert.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Übertragung wurden die Plasmide von potentiell positiven Klonen isoliert und mittels einer PCR auf das *orf5″-cpeT*-Fragment überprüft. Das entsprechende Gelbild ist in der Abbildung 40A zu sehen.

Das erhaltene Fragment war mit 2,5 kBp deutlich größer als

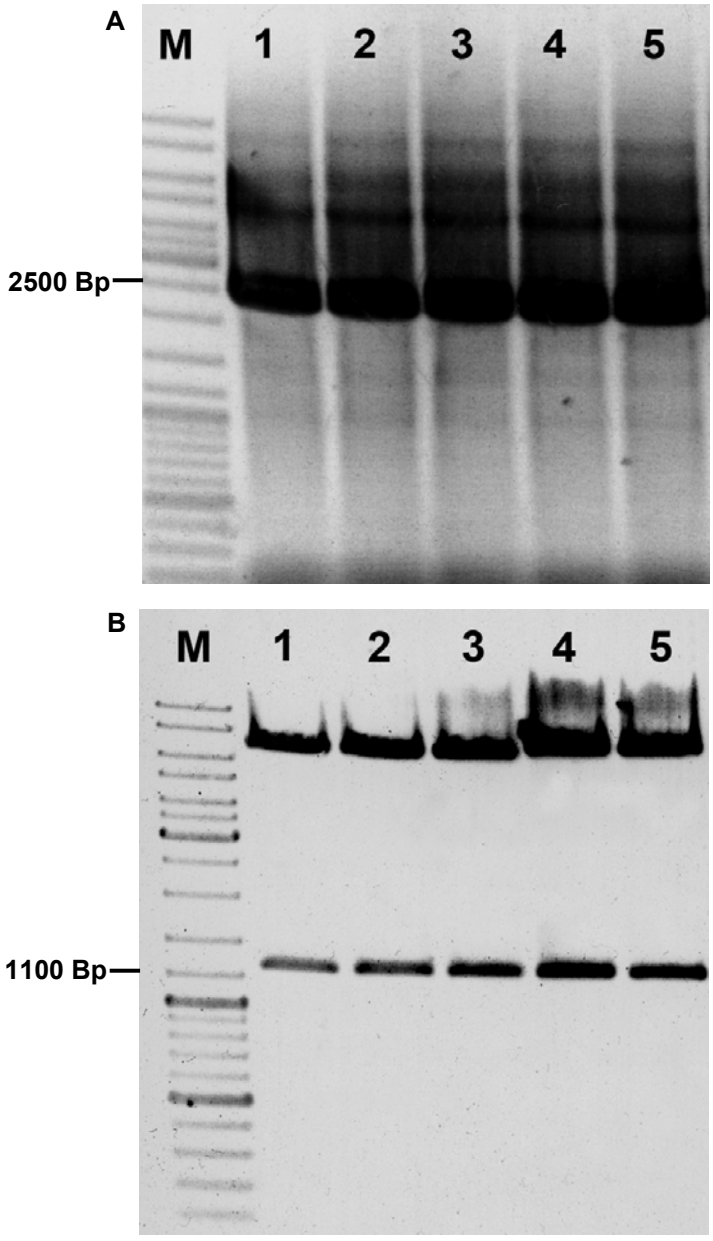


Abbildung 40: A: Test-PCR auf das orf5″-cpeT-Fragment potentieller *C. sporogenes*-Klone mit pMTL-$P_{abrB310-A1A2}$-orf5″-cpeT; B: Probeverdau potentieller pMTL-$P_{abrB310-A1A2}$-orf5″-cpeT-Klone.
1-5: Klone 1-5; M: Marker („GeneRuler DNA Ladder Mix“, Fermentas GmbH, St. Leon-Roth).

erwartet (1,2 kBp). Deshalb wurden die Plasmidpräpara-tionen in *E. coli* XL1-Blue retransformiert, erneut isoliert und einem Probeverdau unterzogen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der nebenstehenden Abbildung 40B aufgeführt. Die Fragmentlänge ist ebenfalls zu lang, jedoch nur ca. 100 Bp, weshalb diese Klone sequenziert wurden.

Alle Plasmide wiesen unter-schiedliche Mutationen (Stopp-Codons, „frame shifts“) auf, die eine korrekte Bildung des Fusionsproteins nicht zuließen.

3.9. Das P23-Projekt

Der Promoter P23 aus *Lactococcus lactis* ist aufgrund eines nicht näher geklärten Regulationsmechanismus in *E. coli* weitgehend inaktiv, wogegen er in vielen Gram-positiven Organismen als starker, konstitutiv aktiver Promoter fungiert. Im Rahmen dieses Projektes soll er für die Expression von Fusionsprotein-Genen in *C. sporogenes* verwendet werden. Zu diesem Zweck wurde das Gen des Fusionsproteins AmyP′-CPE stromabwärts des P23-Promoters in den Vektor pOri23 kloniert. Dann wurde die so erzeugte vollständige Expressions-Kassette amplifiziert und in den *E. coli-Clostridium*-Schaukelvektor pMTL eingebracht. Dieses Plasmid ist in der folgenden Abbildung 41 dargestellt:

Dieser Vektor konnte erfolgreich konstruiert und in den Konju-gationsstamm *E. coli* CA434 ein-gebracht werden.

Die Konjugation in *C. sporogenes* konnte erfolgreich durchgeführt werden. Jedoch konnte anschließend kein Fusionsprotein detektiert werden werden. Somit ist nachgewiesen, dass dieser Promoter in *C. sporogenes* nicht aktiv ist.

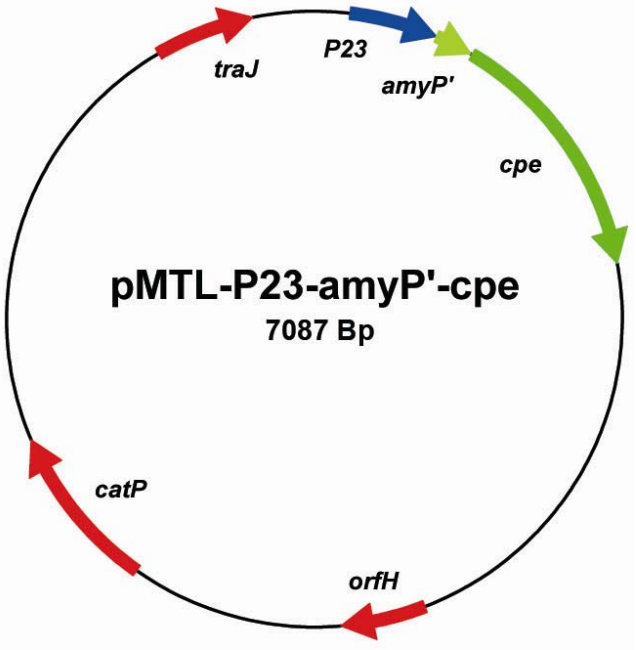


Abbildung 41: Der pMTL-P23-amyP'-cpe-Vektor.

4. Diskussion

Das Wissen um den dringenden Bedarf an alternativen Ansätzen zur Krebsbekämpfung führte in den letzten Jahren zu verstärkten Forschungsbemühungen und zur Entwicklung neuer Therapieansätze. Besonderes Augenmerk wurde auf die Verwendung von Viren und Bakterien gelegt, die in der Lage sind, spezifisch das Wachstum massiver Tumore zu verlangsamen bzw. die Geschwulst zu zerstören.

Im Folgenden werden zunächst die Vor- und Nachteile der verschiedenen alternativen Ansätze zur Tumortherapie erörtert. Hierbei wird insbesondere auf die Verwendung des *Clostridium perfringens*-Enterotoxins als potentielles therapeutisches Protein in Kombination mit *Clostridium sporogenes*-Sporen eingegangen. Der zweite Teil umfasst die Bewertung und Einordnung der Ergebnisse und deren Bedeutung für das Gesamtprojekt.

4.1. Tumortherapien mit viralen Vektoren

Ein Großteil der aktuellen Gentherapie-Ansätze zur Bekämpfung von Tumoren basiert auf Viren. Mit Hilfe dieser Vektoren sollen Krebszellen mit Anti-Tumor-Genen transfiziert werden. Die so eingebrachten Gene bzw. die gebildeten Genprodukte schädigen anschließend die Tumorzelle, was im Idealfall zu deren Absterben führt.

Als Vektoren werden sowohl replikationsdefiziente als auch zur Replikation befähigte Viren verwendet (Lentiviren, Adenoviren, u.a.), die direkt in den Tumor injiziert werden. Diese Applikationsmethode beschränkt zum einen die Wirkung weitgehend auf den Injektionsort und zum anderen sind so nicht alle Tumore erreichbar. Eine systemische Applikation ist aufgrund der Barriere, die das vaskuläre Endothel für das Eindringen der Viren in den Tumor darstellt, sehr ineffizient. Einige Ansätze, diesen Mangel zu beheben, führten bisher zu keinen wesentlichen Verbesserungen (Zue et al., 2004; McIntosh et al., 2002). Zudem werden Viren effizient durch das Komplementsystem der humanen Immunabwehr elimiert, was ihre Effektivität weiter herabsetzt.

Ab einem Tumordurchmesser von ca. 2 mm setzt aufgrund der mangelhaften Sauerstoff- und Nährstoffversorgung eine Adaption und Differenzierung des Tumorgewebes ein (Vaupel et al., 1994 und 2004). So kommt es u.a. zu einer

fehlgeleiteten Angioneogenese und einer metabolischen und genetischen Anpassung der Krebszellen. Es entstehen aggressive Krebszell-Klone, die sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und eine hohe Neigung zur Metastasenbildung auszeichnen (Vaupel, 2008).

Durch die eingeschränkte und deregulierte Durchblutung verbreiten sich die Viren schlecht im gesamten Tumor und können zudem aufgrund ihrer hohen Spezifität nicht alle verschiedenen Zellpopulationen der Geschwulst infizieren (Ram et al., 1997). Ein weiteres Hindernis ist der metabolische Status der Zellen. Viele befinden sich aufgrund des Sauerstoff- und Nährstoffmangels in einem Zustand stark reduzierter Stoffwechsel- und Zellteilungsaktivität, was sie für die Infektion mit Viren unzugänglich macht. Selbst nach einer weitgehend erfolgreichen Therapie mit spezifischen Viren kann so aus den nicht infizierten Zellen der Tumor neu auskeimen (Clark, 1991).

Die Verwendung von Retroviren wie z.B. des „Murine Moloney Leukaemia Virus“ (MoMLV) birgt die Gefahr genetischer Mutationen der Krebszelle in sich, die durch die Integration der umgeschriebenen viralen DNA in das Genom der infizierten Zelle verursacht werden. Dadurch können Onko-Gene aktivert bzw. Tumorsupressor-Gene inaktiviert werden (Buchholz et al., 2006). Der Aufwand, virale Vektoren in der benötigten Anzahl und Reinheit zu produzieren, ist immer noch hoch, wobei neue Kultivierungsmethoden dieses Problem zumindest für einige Virus-Typen teilweise beheben konnten (Urabe et al., 2006).

Im Gegensatz zu einer bakteriellen Tumortherapie handelt es sich bei der Verwendung von viralen Vektoren immer um eine klassische Gentherapie. Bei der dabei eingebrachten DNA handelt es sich entweder um Tumorsupressor-Gene wie z.B. *p53* (Roth et al., 1996) oder um heterologe Suizid-Gene, deren Produkte systemisch applizierte inaktive Wirkstoffvorstufen von Chemotherapeutika in ihre aktive und toxische Form umwandeln (Sterman et al., 1998). Andere Ansätze bedienen sich der Gene von Immunmodulatoren wie z.B. Interleukin-2 und -7. Diese werden jedoch meist nicht in die Tumorzellen, sondern in zuvor isolierte spezifische Immunzellen des Patienten eingebracht. Anschließend werden die modifizierten Zellen wieder dem Erkrankten appliziert, was zu einer verstärkten Immunantwort gegen den Tumor und zu der Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses führen kann (Metharom et al., 2001). Neben diesen Ansätzen soll ebenfalls die Neoangiogenese in Tumoren durch die Einführung mutierter regulatorischer Gene (z.B. des *raf*-Gens) unterdrückt werden, um die Wucherung von der Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr abzuschneiden. Mit der Möglichkeit zur Einbringung von DNA in Tumorzellen könnten Gene, die in die Zellteilung und in das Zellwachstum involviert

sind, durch das als „gene silencing“ bezeichnete Verfahren ausgeschaltet werden. Ein Ziel ist hierbei ein Gen, welches für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR kodiert. Allerdings konnte die Wirksamkeit einer solchen Therapie bisher nur in vitro untersucht und bestätigt werden (Zhang et al., 2004).

4.2. Tumortherapie mit bakteriellen Vektoren

4.2.1. Clostridien in der Tumortherapie

4.2.1.1. Geschichtliches

Schon Mitte des 19. Jahrhunderts wurde beobachtet, dass es bei Patienten mit Enddarm-Krebs vermehrt zu Infektionen der Geschwülste mit anaeroben Mikroorganismen kam. Dies war in einigen Fällen mit einer Regression oder gar einem vollständigen Rückgang des Tumors verbunden (Barbé et al., 2006). Einhundert Jahre später wurden Sporen von *Clostridium histolyticum* direkt in Maus-Tumore injiziert, was zur Zerstörungen des Tumorgewebes und zu einem Rückgang der Tumorgröße führte (Parker et al., 1947). Spätere Versuche, bei denen *C. tetani*-Sporen direkt in die Blutbahn von Mäusen mit und ohne massive Geschwülste injizierten wurden, ergaben, dass diese nur in den hypoxischen Tumorregionen keimen und sich vermehren können. Die Besiedelung der Tiere mit diesem sehr pathogenen Organismus führte aufgrund der Produktion des Tetanus-Toxins innerhalb kurzer Zeit zum Tod der Tumor-tragenden Tiere, wogegen die Mäuse ohne Geschwulst die Injektion unbeeinflusst überlebten (Malmgren et al., 1955). Viele Clostridien-Arten und -Stämme mit sehr guten Besiedelungsvermögen von Tumoren und hohem Onkolysepotential schieden jedoch aufgrund ihrer erwiesenen Pathogenität für medizinische Anwendungen aus. Wenige Jahre später wurde ein unter dem heutigen Namen *Clostridium sporogenes* bekanntes proteolytisches Bakterium (ehemals *Clostridium butyricum* M55 bzw. *Clostridium oncolyticum*) isoliert und dessen gutes Besiedelungs- und Onkolysevermögen nachgewiesen (Möse et al., 1959). Im Rahmen weiterer Forschungen wurden *C. sporogenes* und weitere apathogene Clostridien auf ihr Onkolysepotential hin untersucht (Möse et al., 1964; Engelbart et al., 1964), auch in Kombination mit Chemotherapeutika (Thiele et al., 1964). Während der 70er und 80er Jahre des letzten Jahrhunderts erfolgten diesbezüglich weitere Untersuchungen von Clostridien in mehreren Tumormodellen (Dietzel et al., 1976; Gericke et al., 1979; Schlechte et al., 1982). Ein Jahrzehnt später wurde für einige saccharolytische Clostridien (*C. acetobutylicum,*

C. beijerinckii, C. saccharoperbutylacetonicum) eine Tumorbesiedelung nachgewiesen, die allerdings zu keiner vollständigen Onkolyse führte (Lemmon et al., 1997; Lambin et al., 1998).

Aufgrund der sehr guten Besiedelungs- und Onkolyseeigenschaft von *C. sporogenes* wurde dieser Organismus als erstes *Clostridium* genetisch modifiziert, um dessen therapeutisches Potential zu erhöhen (Schlechte et al., 1988). Dabei wurde in dieses Bakterium das Gen für das kanzerostatische Protein Colicin E1 eingebracht, jedoch ohne großen Erfolg. Aufgrund besserer genetischer Modifikationsmöglichkeiten wurden ab dem Ende der 90er Jahre verschiedene Gene für die Produktion von Wirkstoffvorstufen-umsetzenden Enzymen (Cytosindeaminase und Nitroreduktase; Theys et al., 2001; van Mellaert et al., 2006) oder für Immunmodulatoren (Zytokine wie z.B. TNF-α; Theys et al., 1999) in saccharolytische Clostridien eingebracht. Letztlich erbrachten diese und andere Versuche aufgrund der geringen in vivo-Besiedelung der Tumore durch diese Organismen keine nachhaltigen Erfolge (Wie et al., 2008).

4.2.1.2. Die „Clostridial Directed Enzyme Prodrug/Drug Therapy“ (CDEPT)

Obligat anaerobe Clostridien besitzen den großen Vorteil, dass sie Endosporen bilden. Diese sind immunologisch weitgehend innert, leicht zu produzieren und sehr lange haltbar. Sporen, die in Blutbahn eines Patienten injiziert werden, keimen, wie in Studien gezeigt wurde, nur innerhalb hypoxischer Gewebe aus (Moese et al., 1959). Somit kommen nur die hypoxischen Bereiche nekrotisierender Tumore als deren Habitat innerhalb des menschlichen Körpers in Frage. In diesen Regionen ist der Sauerstoffpartialdruck im Vergleich zu gesunden Geweben drastisch reduziert (2,5-30 mmHg gegenüber 24-66 mmHg; Vaupel et al., 1993) Diese Spezifität macht sie zum idealen Träger von Antitumormitteln (Minton, 2003). Die verschiedenen Ansätze umfassen hierbei insbesondere die so genannte „Clostridial-Directed-Enzyme-Prodrug/Drug-Therapy“ (CDEPT, Minton et al., 1995) sowie die Verwendung bakterieller Toxine. Des Weiteren gibt es Bestrebungen, Clostridien genetisch so zu modifizieren, dass diese funktionelle Antikörper gegen potentielle Zielstrukturen von Tumoren (Groot et al., 2007) oder verschiedene Zytokine zur Krebsbekämpfung produzieren (Theys etal., 1999; Barbé et al., 2005).

Bei der CDEPT werden Versuchstieren Sporen rekombinanter Clostridien injiziert. Diese gelangen mit dem Blutstrom in den Tumor und können dort vermutlich aufgrund der deregulierten Angioneogenese in das Gewebe penetrieren und

auskeimen. Im optimalen Fall können die Bakterien den gesamten hypoxischen Bereich besiedeln. Ein Schema dieses Therapieansatzes ist in der Abbildung 42 dargestellt.

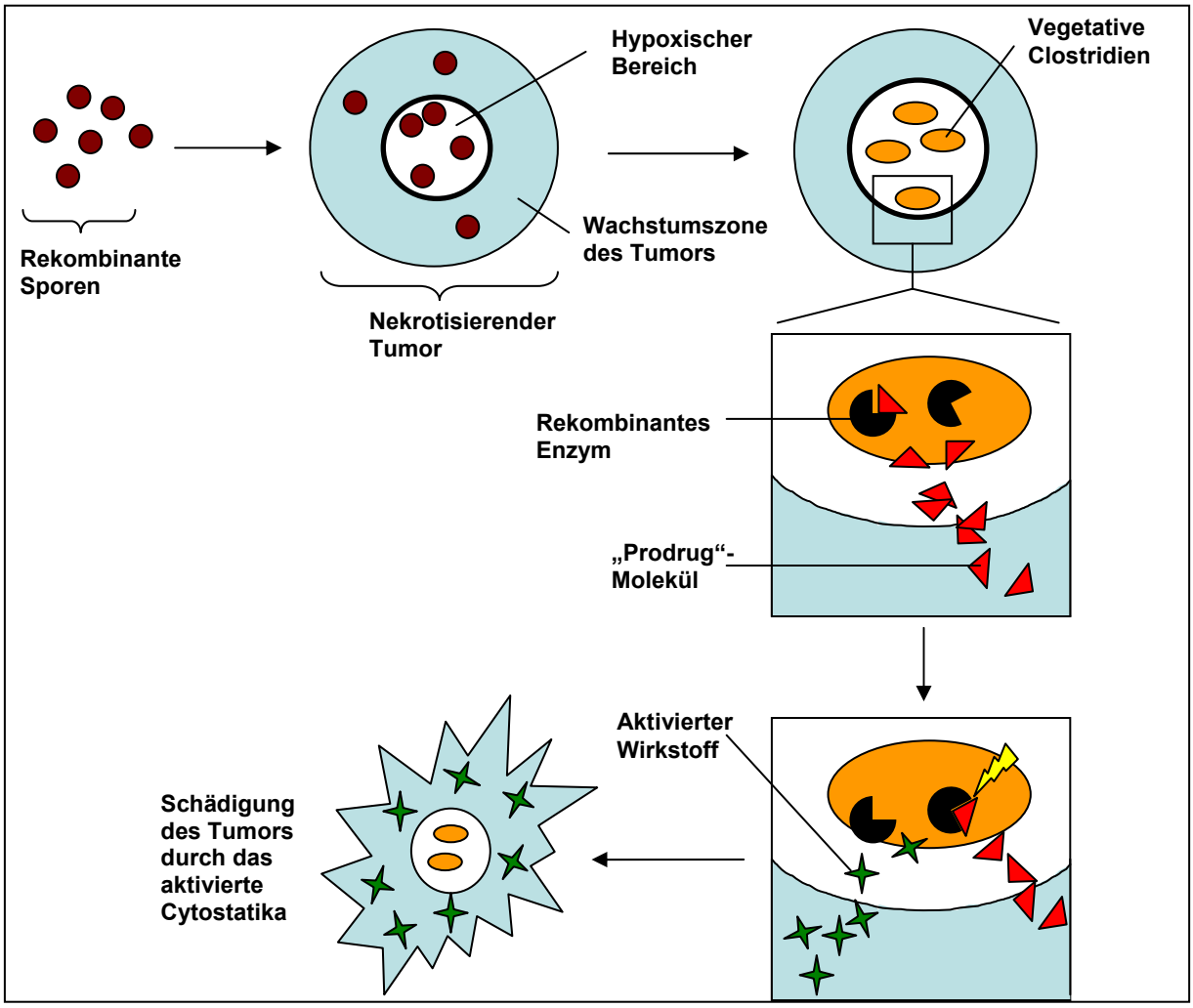


Abbildung 42: Schema der CDEPT. Die Sporen erreichen über die Blutbahn den Tumor und besiedeln diesen. Die von ihnen synthetisierten rekombinanten Enzyme aktivieren die „Prodrug"-Moleküle zu Cytostatika, welche den Tumor spezifisch schädigen.

Schon die Besiedelung hat aufgrund der Stimulation des Immunsystems einen onkolytischen Effekt. Zudem bilden proteolytische Clostridien Enzyme, die das Tumorgewebe direkt angreifen und schädigen können. Diese Effekte sind jedoch für eine vollständige Heilung des Patienten meist nicht ausreichend. Die rekombinanten Clostridien sollen deshalb zusätzlich Enzyme synthetisieren, die die Aktivierung von systemisch applizierbaren und weitgehend nebenwirkungsfreien Wirkstoffvorstufen, den sogenannten „Prodrugs", katalysieren. Im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie beschränkt sich somit die Wirkung der Zytostatika nur auf den Tumor und dessen direktes Umfeld. Dadurch werden die Nebenwirkungen der Chemotherapie auf ein Mindestmaß reduziert, so dass sehr viel höhere Dosen des Wirkstoffes bzw. dessen Vorstufen verabreicht werden können. Für eine solche

Therapie geeignete Clostridien sind inbesondere *C. sporogenes* und *C. novyi*-NT (Luis et al., 2005), da diese apathogenen Organismen sehr gute Tumorbesiedler sind.

Eine Hypoxie kann schon bei Tumoren ab einem Durchmesser von 2 mm auftreten, so dass sich diese Therapie auch für die Behandlung kleinerer Geschwülste oder von Makrometastasen eignet.

Aktuell befinden sich einige dieser vielversprechenden Therapieansätze, die in den Arbeitgruppen von Liu und Theys entwickelt und optimiert wurden, bereits in klinischen Erprobungsphasen (persönliche Mitteilung Prof. P. Dürre).

4.2.1.2. Die „Clostridial Directed Toxin Therapy“ (CDTT)

Ausschlaggebend für die Idee, ein tumorspezifisches Toxin im Rahmen einer Therapie zu verwenden, war der Bedarf nach einer alternativen Behandlungsmethode von Pankreaskarzinomen. Diese Erkrankung wird meist aufgrund der schwachen Symptomatik erst sehr spät diagnostiziert. Da bedingt durch das Einwachsen des Tumors in die Bauchorgane die einzig bekannte Möglichkeit der Heilung in der frühzeitigen operativen Entfernung der Bauchspeicheldrüse und eines Großteils des umliegenden Gewebes besteht (Whipple, 1949), ist die Mortalitätsrate extrem hoch. Chemotherapien sind nur selten effizient, da nur wenige geeignete Zytostatika bekannt sind und es vermehrt zu Resistenzbildungen kommt. Zudem sind Bestrahlungen wegen der Lage der Wucherung im Bauchfell nicht oder nur sehr eingeschränkt durchführbar. In den meisten Fällen bleibt nur eine palliative Behandlung des Patienten und die Überlebensrate der Patienten liegt nach 5 Jahren bei nur 3-5 %.

Bei Untersuchungen an Pankreaskarzinomzelllinien wurde festgestellt, dass diese bestimmte Strukturproteine von „Tight-Junction“-Zell-Zell-Verbindungen bis zu 1000fach überexprimieren (Michl et al., 2001). Die als Claudin-3 und Claudin-4 identifizierten Proteine wurden in früheren Arbeiten (Katahira et al., 1997) als Rezeptoren für das Enterotoxin von *Clostridium perfringens* (CPE) beschrieben. Dieses *Clostridium* ist als Verursacher ernster, aber selten letaler Lebensmittelvergiftungen bekannt, deren Symptome Diarrhö begleitet von krampfartigen Schmerzen im Abdomen sind. Neben CPE produziert es noch 13 weitere Toxine, die unter anderem bei Wundinfektionen mit diesem Organismus für Gasbrand (Gasgangrän) verantwortlich sind (Rood, 1998; Kuroda et al., 2005).

Die Bildung von CPE (319 AS, LD_{50} bei 81 µg/kg) erfolgt sporulationsabhängig und es wird bei der Lyse der Mutterzelle freigesetzt (Duncan, 1973). Der Wirkungsmechanismus des Toxins basiert hierbei auf einer elektrostatischen Anheftung der 35-kDa-Proteine an die zweite extrazelluläre Schleife der Claudin-3 und -4-Rezeptoren (Fujita et al., 2000). Das essentielle Bindemotiv hierfür ist bei Claudinen ein (148)NPL(150)VP-Motiv (Winkler et al., 2009) und bei CPE ein Bereich nahe des C-Terminus' (AS 306-315; Kimura, 2010). Der CPE-Rezeptor-Komplex interagiert mit mindestens einem weiteren Wirtsprotein (Occludin), was zur Ausbildung eines Porenkomplexes mit einer molekularen Masse von ca. 155 kDa führt (Chakrabarti et al., 2005). Durch diese Poren verliert die Zelle Wasser, Ionen und niedermolekulare Verbindungen, was ihren Kollaps bewirkt (McDonel et al., 1986). Geringe Konzentrationen des Toxins können zudem ausreichen, einen weiteren Weg der Zellschädigung einzuleiten. Durch die Poren können Calciumionen (Ca^{2+}) in die Zellen einströmen, die dort die natürliche Apoptose initiieren (Chakrabati et al., 2003). Da dieser Wirkmechanismus weitgehend unabhängig vom metabolischen Zustand der Tumorzellen ist, können sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen durch das Toxin geschädigt/abgetötet werden. Diese Eigenschaft unterscheidet diesen Therapieansatz maßgeblich von der CDEPT, deren Wirkstoffe auf proliferierende Zellen gerichtet sind und ruhende Zellen kaum schädigen können (Trédan et al., 2007). Zudem ist bisher keine Resistenzbildung gegen das Toxin beschrieben worden, obgleich es aufgrund der Abhängigkeit von einem spezifischen CPE-Bindemotiv nicht ausgeschlossen werden kann. Diese bisher fehlende Resistenzbildung ermöglicht auch die Therapie von größeren Metastasen, da diese gegen die meisten Zytostatika resistent sind.

Der hohe Nutzen von CPE für die Krebstherapie wurde schon mehrmals experimentell belegt (Kominsky et al., 2004; Santin et al., 2007). Allerdings scheiterte die klinische Verwendung des Toxins bisher an der nur sehr eingeschränkten systemischen Applizierbarkeit. Trotz des relativ geringen LD_{50}-Werts von 81 µg/kg sind die systemischen Nebenwirkungen zu stark, wenn das Toxin in den notwendigen Konzentrationen in die Blutbahn injiziert wird. Daher wird in den entsprechenden Experimenten das Protein bisher entweder direkt in den Tumor oder in die befallenen Körperhöhlen (z.B. der Peritonealraum) eingebracht. Dabei besteht zum einen die Möglichkeit einer Infektion und zum anderen kann nicht jeder Tumor erreicht werden.

Clostridium perfringens kommt aufgrund seiner hohen Pathogenität nicht für eine Tumortherapie in Frage. Deshalb soll das *cpe*-Gen in den proteolytischen und apathogenen Organismus *C. sporogenes* eingebracht werden. Um die CPE-Produktion von der Sporulation zu entkoppeln, soll das Gen unter die Kontrolle eines

starken konstitutiven Promoters gestellt werden. Eine mit dem 5′-Ende des Gens fusionierte DNA-Sequenz, die für ein clostridielles Signalpeptid kodiert, soll eine permanente Sezernierung des Toxins bewirken. Ein Schema der CDTT ist in der unten stehenden Abbildung 43 dargestellt:

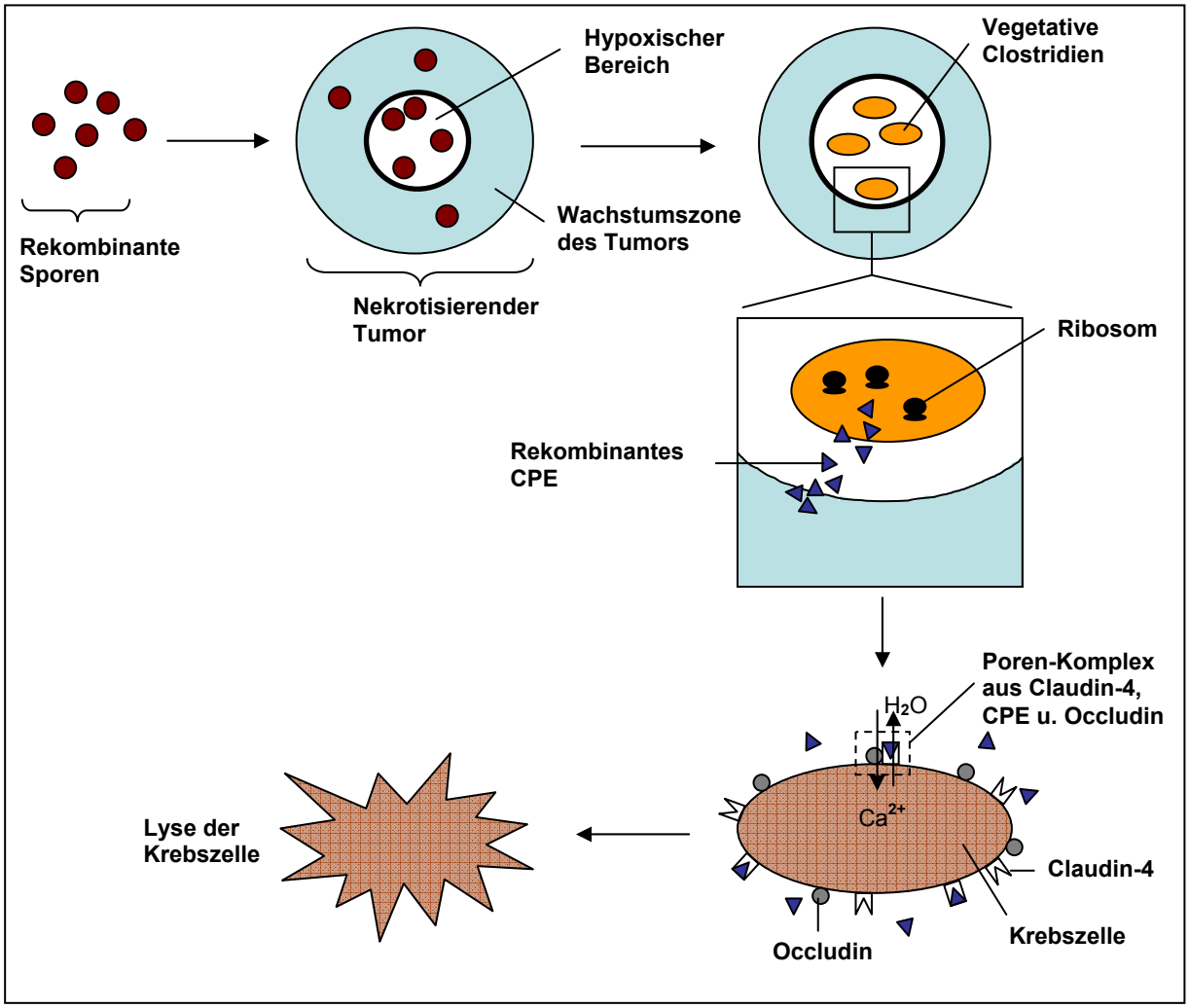


Abbildung 43: Schema der CPE-Therapie. Die den Tumor besiedelnden rekombinanten Clostridien synthetisieren und sezernieren CPE, welches spezifisch die Krebszellen zerstört.

Die Sporen eines modifizierten *C. sporogenes*-Stammes könnten systemisch appliziert werden und erreichen den Tumor mit dem Blutstrom. Dort keimen sie aus, besiedeln den Tumor und schädigen diesen primär durch eine Stimulation des Immunsystems und die Produktion des Toxins. Des Weiteren konkurrieren die Mikroorganismen mit den Krebszellen um die knappen Nährstoffressourcen. Die relativ hohe Sauerstofftoleranz, die proteolytische Lebensweise dieser Clostridien und die von ihnen sezernierten Enzyme fördern sowohl die Besiedelung des Tumors als auch die onkolytische Kapazität dieser Mikroorganismen.

Die CPE-Rezeptoren werden jedoch nicht nur in Pankreaskarzinomen überexprimiert, sondern auch in vielen anderen Tumoren. Zu nennen sind hier z.B.

Gebärmutterhalskrebs (Santin et al., 2005 und 2007), Eierstockkrebs (Litkouhi et al., 2007), Prostatakrebs (Landers et al., 2008), Brustkrebs (Kominsky et al., 2004), u.a.m. Somit ist eine *Clostridium*-vermittelte CPE-Therapie potentiell vielfältig einsetzbar. Eine weitere Variante ist die Fusion der C-terminalen Bindedomäne von CPE an ein anderes therapeutisches Protein wie z.B. PSIF („Protein synthesis inhibitory factor"; Saeki et al., 2010).

4.2.2. Bifidobakterien in der Tumortherapie

Neben Clostridien sollen auch einige Arten der Gattung *Bifidobacterium* (*B. infantis, B. longum*) für die Tumortherapie eingesetzt werden. Diese anaeroben Bakterien sind natürliche Besiedler des Gastrointestinaltraktes des Menschen, insbesondere von Säuglingen. Zudem werden sie schon seit längerem von der Lebensmittelindustrie als Zusatz für Milchprodukte wie z.B. Joghurt verwendet, da eine gesundheitsfördernde und das Immunsystem stimulierende Wirkung belegt ist. Ebenfalls wird ihnen in der Literatur eine prophylaktische Schutzfunktion vor Virusinfektionen (Saavedra et al., 1994) und bei der Entstehung von Krebs (Reddy, 1993) zugeschrieben. Dass Bifidobakterien nach deren systemischen Applikation spezifisch Tumore besiedeln, ist schon seit längerem bekannt (Kimura et al., 1980). Im Vergleich zu proteolytischen Clostridien ist die Besiedelungsrate dieser saccharolytischen Bakterien mit 10^4-10^6 KFE/g Tumor (Yazawa et al., 2000; Fujimori, 2006) jedoch deutlich geringer und es wurden zudem keine onkolytischen Effekte beobachtet. Da diese Gattung keine Endosporen bildet, müssen vegetative Zellen appliziert werden. Dies ist stets mit der Gefahr einer Bakteriämie und somit ernsten Folgen (z.B. Sepsis) verbunden (Wilson et al., 1975).

Da die Tumorbesiedelung mit diesen Organismen keinerlei Einfluss auf das Voranschreiten der Krankheit hat, wurden und werden Versuche unternommen, einige Bifidobakterien genetisch zu modifizieren. Wie bei der oben beschriebenen CDEPT wurde ebenfalls auf die Suizid-Gene zurückgegriffen, die in der Lage sind, Wirkstoffvorstufen in aktive Zytostatika umzusetzen. So konnte z.B. das Gen für eine Cytosindeaminase (CD) in *Bifidobacterium longum* eingebracht werden und die Produktion und Funktionalität des Enzyms nachgewiesen werden (Nakamura et al., 2002). Bei gleichartigen Versuchen mit *Bifidobacterium infantis* ergab sich in vitro und im in vivo-Mausmodel eine weitgehende Regression der infizierten Tumore. Neben der CD finden auch virale Thymidinkinasen Verwendung, deren Gene in Bifidobakterien eingebracht wurden. Diese modifizierten Bakterien werden aktuell im

Tiermodell mit induziertem Blasenkrebs für Experimente zur Etablierung einer potentiellen Tumortherapie verwendet (Tang et al., 2009).

4.2.3. Salmonellen in der Tumortherapie

Neben Gram-positiven Organismen sollen auch fakultativ anaerobe Gram-negative Bakterien in der Krebstherapie eingesetzt werden. Vertreter der Gattung *Salmonella* sind für ihre Tier- und Humanpathogenität bekannt und verursachen verschiedene Erkrankungen, die von relativ harmlosen und selbstausheilenden Durchfall-erkrankungen bis hin zu lebensbedrohlichen Symptomen wie Sepsis und Meningitis reichen. Um diese Bakterien für einen solchen Therapieansatz verwenden zu können, wurden Stämme erzeugt, deren Virulenzgene teilweise inaktiviert bzw. herunterreguliert wurden und die auxotroph für einige Aminosäuren sind. (Rosenberg et al., 2002; Thamm et al., 2005). Trotz dieser Attenuation können nach einer systemischen Applikation etwa 10^3 KFE/g Lebergewebe nachgewiesen werden, was bei den verwendeten Tieren jedoch keine negativen Auswirkungen hatte. Allerdings ist zu bedenken, dass es sich bei der Mehrzahl aller Krebspatienten um bereits immunsupprimierte ältere Personen handelt. Ob diese die systemische Applikation von lebenden Bakterien, die zudem noch potentiell in nahezu jedem Körpergewebe überlebens- und teilungsfähig sind, ohne Nebenwirkungen tolerieren können, ist fraglich.

Eine vollständige Ausschaltung der Virulenz-Gene kommt jedoch nicht in Frage, da diese für eine effiziente Tumorbesiedelung benötigt werden. Die Besiedlung einer Geschwulst mit diesen Stämmen ist mit 10^7 – 10^8 KFE/g Tumorgewebe relativ hoch, bewirkt aber lediglich eine deutliche Verlangsamung des Wachstums. Eine gewünschte Regression oder gar die vollständige Auslöschung der Geschwulst war nicht zu beobachten. Erst nach einer genetischen Modifikation des Mikroorganismus zur Produktion von Cytokinen (z.B. FasL; Löffler et al., 2008) oder Wirkstoffvorstufen umsetzenden Enzymen (z.B. Carboxypeptidase G2; Friedlos et al., 2008) konnten diese Effekte beobachtet werden.

Salmonellen können jedoch nicht nur einen Tumor besiedeln, sondern auch von Zellen aufgenommen werden. Deshalb wurde der Organismus dahingehend modifiziert, dass er spezifische Tumor-Antigene auf der Zelloberfläche präsentiert. Diese Bakterien wurden gesunden Mäusen systemisch appliziert, was zu einer Aktivierung von $CD8^+$-T-Zellen und zur Ausprägung eines immunologischen

Gedächtnisses führen sollte. Diese Versuche brachten aber nicht das erhoffte Ergebnis (Stark et al., 2009).

Obgleich fakultativ anaerobe Bakterien theoretisch auch oxygeniertes Tumorgewebe zu besiedeln vermögen, wurde dies in den entsprechenden Versuchen nur selten beobachtet. Die Ursache hierfür sind aufgrund der bakteriellen Besiedlung und Vermehrung in den Tumor einwandernde, neutrophile Granulozyten des Immunsystems des Wirtes. Diese können die hypoxischen Bereiche einer Geschwulst nicht penetrieren, bilden jedoch an der Grenze zum gut versorgten Tumorrand einen Schutzwall, der die Bakterien an einer vollständigen Besiedelung hindert (Westphal et al., 2008). Das temporäre Ausschalten dieses Zelltyps mit spezifischen Antikörpern führte zu einer vollständigen Besiedlung des Tumors. Allerdings ist diese Option mit einer deutlich erhöhten Infektionsgefahr für die immunsupprimierten Krebspatienten verbunden.

4.2.4. Abschließende Gegenüberstellung und Bewertung der einzelnen Vektor-basierten Therapiemethoden

Jeder der hier beschriebenen Therapieansätze weist im Vergleich zueinander Vor- und Nachteile auf. Um diese übersichtlich darzustellen, wurden die verschiedenen Therapieansätze sofern möglich nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeordnet, zusammengefasst und bewertet. Hierbei wurde die Therapie mit proteolytischen Clostridien in die Bereiche CDEPT und CDTT aufgeteilt und den beschriebenen Alternativen in der Tabelle 34 gegenübergestellt.

Tabelle 34: Gegenüberstellung und Bewertung der verschiedenen therapeuthischen Ansätze

	CDEPT	**CDTT**	***Bifidobacterium***	***Salmonella***	**Viren**
Applikationsmethode	systemisch	systemisch	systemisch	systemisch	intra-tumoral
Immunogenität	gering	gering	gering-mittel	mittel	gering
Tumorspezifität	hoch	hoch	hoch	mittel	hoch
Tumorbesiedlung	hoch	hoch	mittel	hoch	mittel
Onkolysepotential nativ	hoch	hoch	gering	mittel-hoch	-
Abhängigkeit der Therapie vom metabolischen Zellstatus	mittel	gering	mittel	mittel	hoch
Onkolysepotential nach genetischer Modifikation	hoch	hoch	mittel-hoch	hoch	mittel-hoch
Resistenzbildung	mittel	gering	mittel	mittel	mittel

Onkolysepotential gegen Makrometastasen	gering	hoch	gering	hoch	gering
Kanzerogenes Potential	keines	keines	keines	keines	mittel
Vektorbeseitigung	einfach	einfach	einfach	einfach	schwierig
Produktion	einfach	einfach	einfach	einfach	schwierig
Haltbarkeit	sehr lange	sehr lange	gering	gering	mittel

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich wird, weisen die auf Bakterien basierenden Therapieansätze einige Vorteile im Vergleich zu den viralen Systemen auf. Sie sind keine Gentherapien im klassischen Sinn, so dass keine Fremd-DNA in die Krebszellen eingeschleust werden muss und somit auch nicht die Gefahr der Kanzerogenität besteht. Im Gegensatz zu Viren sind fast alle verwendeten Bakterien (mit Ausnahme der meisten *Bifidobacterium*-Vertreter) schon nativ onkolytisch oder zumindest kanzerostatisch. Dieses Potential kann durch eine entsprechende genetische Modifizierung noch deutlich verbessert werden. Die vereinfachte Applikation der Bakterien und die vom metabolischen Status oder der Art der Krebszellen unabhängige Besiedelung (Viren benötigen meist sich teilende Zellen einer Art für eine Infektion) ermöglichen eine nahezu universelle Einsatzmöglichkeit dieser Vektoren. Ein weiterer Vorteil ist der Effekt, dass eine einzige Bakterienzelle in der Lage ist, sehr viele Wirkstoffvorstufen-Moleküle zu aktivieren und somit viele Tumorzellen direkt schädigen kann. Pro Virus jedoch kann jedoch nur eine einzige Krebszelle infiziert und angegriffen werden. Ebenfalls können Bakterien durch die Gabe von Antibiotika leicht und effizient aus dem Körper des Patienten entfernt werden, was für Viren nicht der Fall ist.

Innerhalb der bakteriellen Vektoren nehmen die Clostridien eine Sonderstellung ein. Aufgrund ihrer strikt anaeroben Lebensweise können sie nur hypoxische Tumorbereiche besiedeln und sind aufgrund der Applikation von Endosporen immunologisch absolut unbedenklich. Von den anderen Bakterienarten müssen jedoch vegetative Zellen injiziert werden, was mit Gefahren für den Patienten verbunden ist. Des Weiteren besitzen viele proteolytische Clostridien eine sehr hohe native Besiedelungs- und Onkolysefähigkeit.

Durch die Verwendung von Chemotherapeutika bzw. derer Wirkstoffvorstufen ist die CDEPT jedoch im Vergleich zur CDTT etwas eingeschränkt. Gegen diese Zytostatika kann es zu Resistenzbildungen kommen, was die Effizienz der Therapie deutlich senkt. Des Weiteren wirken diese Stoffe nur bei sich schnell teilenden Zellen, bei ruhenden dagegen nur eingeschränkt. Ebenso sind viele (Makro-)Metastasen multiresistent gegen Therapeutika. Die Verwendung eines spezifischen Toxins,

dessen Wirkmechanismus nicht an den metabolischen Status einer Zelle gebunden ist, stellt deshalb eine sinnvolle Erweiterung der klassischen CDEPT dar. So könnten im Rahmen einer CDTT mit CPE als therapeutisches Toxin gezielt multiresistente Tumore und/oder Makrometastasen angegriffen und beseitigt werden, unabhängig davon, ob die Zellen ruhen oder sich aktiv teilen. Ebenso ist ermutigend, dass bisher keine Resistenzbildung gegen CPE beobachtet werden konnte bzw. beschrieben ist.

4.3. Problemstellung des Projektes

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt, um ein bereits für den saccharolytischen Organismus *C. acetobutylicum* bestehendes schwaches CPE-Expressions-System (Box, 2006) auf das proteolytische Bakterium *C. sporogenes* zu übertragen und zu verbessern. Der kritische Punkt bei all diesen Versuchen war hierbei entweder die permanente Produktion und Unverträglichkeit des Toxins an sich oder der für die verlangte permanente Sekretion in *C. sporogenes* notwendigen Signalpeptid-CPE-Fusionsproteine im Klonierungszwischenwirt *E. coli*.
Obgleich keine zu Claudin-3 und -4 homologen bakteriellen Proteine bekannt sind, wurde nach möglichen Rezeptoren für CPE in *E. coli* gesucht. Hierbei wurde eine putative Permease identifiziert, deren extrazelluläre Bereiche eine hohe Sequenzhomologie mit der zweiten extrazellulären Schleife der Claudine aufwies. Eine aktuelle Veröffentlichungen bzgl. des CPE-Bindemotivs ergab jedoch, dass eine für die Bindung essentielle Aminosäure nicht vorhanden ist (Winkler et al., 2009). Zudem konnte bewiesen werden, dass das gebildete Fusionsprotein für den letalen Wachstumsnachteil der *E. coli*-Klone verantwortlich ist. Getrennte Klonierungen von Signalpeptid-DNA-Sequenzen und *cpe* hatten keinen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *E. coli*. Sobald jedoch die beiden Teile dieses Systems in einem Vektor vereinigt werden sollten, konnten keine positiven Klone mehr identifiziert werden. Ebenfalls wurden Wachstumsversuche durchgeführt, bei denen sowohl *cpe* und *amyP'-cpe* unter die Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promoters gestellt wurden. Nach der Induktion wuchsen die Bakterien, die nur CPE produzierten, weiter, wogegen es bei den Produzenten des Fusionsproteins zu einer Stagnation und einem Absterben kam (siehe Punkt 3.4.3.).

Wie Sandra König in ihrer Diplomarbeit (König, 2008) für Fusionsproteine aus verschiedenen Signalpeptiden mit einer clostridiellen Crotonase nachweisen konnte, kommt es zu einer Akkumulation der Fusionsprodukte in der Zellmembran dieses Organismus.

Wieso es zu diesem Phänomen kommt, ist bisher ungeklärt. Eine mögliche Ursache könnten z.B. mangelhafte Erkennungssequenzen und Schnittstellen für die Signalpeptidasen von *E. coli* sein, da sowohl die Signalpeptide als auch das damit fusionierte CPE aus Gram-positiven Organismen stammen. Da CPE nativ nicht ausgeschleust wird, könnte eine weitere Möglichkeit die vorzeitige Reifung bzw. Faltung des Fusionsproteins sein, so dass dieses nicht mehr prozessiert und exportiert werden kann. In der Literatur sind Ansätze zu finden, um gleichartige Probleme durch die Überproduktion von Chaperon-Komplexen zu lösen (Freigassner et al., 2009).

Die Anreicherung dieses Proteins in der Membran wirkt vermutlich destabilisierend und/oder beeinträchtigt die Exportmechanismen dieses Gram-negativen Bakteriums so schwerwiegend, dass es unter allen bisher getesteten Bedingungen nicht zu überleben vermag.

4.3.1. Lösungsansatz 1: Spezifische asRNA

Um die durch den verwendeten konstitutiven Promoter verursachte Produktion des Fusionsproteins zu unterbinden, kommen mehrere Vorgehensweisen in Betracht. In den ersten Experimenten sollte die Transkription des Fusionsprotein-Gens durch die Bildung einer spezifischen asRNA minimiert werden. Es konnte jedoch kein positiver Effekt des konstruierten asRNA-Systems auf die Klonierungsersuche mit Fusionsprotein-Konstrukten beobachtet werden. In Untersuchungen konnte in *E. coli* keine Überproduktion und Akkumulation der kleinen asRNA nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass dies auf eine sehr geringe Stabilität der asRNA zurückzuführen sein könnte. Aus der Literatur ist bekannt (Engdahl et al., 1997 und 2001), dass eine Akkumulation der asRNA für deren Wirkung von großer Bedeutung ist. Um die asRNA vor dem enzymatischen Abbau zu schützen, wurden deshalb Anstrengungen unternommen, diese durch das Anfügen flankierender Enden, die miteinander hybridisieren und eine Haarnadelschlaufe bilden können, zu schützen. Dieses Vorgehen ist in der Literatur beschrieben (Nakashima et al., 2006) und ermöglicht eine deutliche Verbesserung bei der Transkriptions-Inhibierung des Zielgens.

Die experimentelle Umsetzung dieses Projekts war trotz mehrerer Herangehensweisen nicht erfolgreich. So konnten zwar die einzelnen Bestandteile des Konstruktes amplifiziert und subkloniert werden, das endgültige Zusammenfügen im Zielvektor ergab aber kein funktionelles System. Mögliche Gründe hierfür sind nur

schwer zu bestimmen, jedoch könnte es z.B. aufgrund der eingeführten hybridisierungsfähigen Bereiche zu Problemen bei der Plasmidreplikation kommen. Ebenfalls bekannt ist, dass es bei der Klonierung AT-reicher Fragmente und deren Einbringen in *E. coli* zu Problemen kommen kann.

Dieses Projekt wurde an diesem Punkt eingestellt, da zusätzlich zu den bestehenden Problemen mit den asRNA-Konstrukten auch keine vollständige Stilllegung eines Gens erreicht werden kann. Da aber bereits eine schwache Transkription für die Bildung einer letalen Menge des Fusionsproteins ausreichend ist, kommt dieses Vorgehen nur bei der Verwendung schwacher clostridieller Promotoren wie dem bisher verwendeten P_{bdhA} in Frage. Mittelfristig sollte dieser jedoch durch einen stärkeren ersetzt werden, um in *C. sporogenes* eine ausreichende Produktion des Fusionsproteins zu gewährleisten.

4.3.2. Lösungsansatz 2: Test alternativer Signalpeptidsequenzen

Da als mögliche Ursache für die Anreicherung der Fusionsproteine in der Zellmembran mangelhafte Erkennungssequenzen und Schnittstellen für die Signalpeptidasen in Frage kommen, sollten alternative Kombinationen untersucht werden. Sandra König identifizierte im Rahmen ihrer Diplomarbeit einige potentielle Signalpeptid-Sequenzen von verschiedenen Clostridien, die sie in Kombination mit dem *crt*-Gen charakterisierte (König, 2008).

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Signalpeptid aus einem dritten Organismus sowohl in *C. sporogenes* als auch in *E. coli* funktioniert, ist gering. Alleiniges Ziel dieser Versuche war es deshalb, die Toleranz von *E. coli* bzgl. der Fusionsproteine zu erhöhen.

Die für die verschiedenen Signalpeptide kodierenden DNA-Bereiche wurden unter Einhaltung des Leserasters vor das *cpe*- bzw. das am 5′-Ende um 132 Bp (44 AS) verkürzte *cpe*-Gen (*cpeT*) kloniert. Die resultierenden Fusionskonstrukte wurden unter die Kontrolle eines induzierbaren Promoters gestellt. Das Genprodukt von *cpeT* weist im Vergleich zu CPE eine um den Faktor 3 erhöhte Toxizität auf.

Die in silico-Vorhersage der Signalpeptid-Güte, der Schnittwahrscheinlichkeit und der Schnittstelle wurde mit dem internetbasierten und frei verfügbaren Programm Signal P 3.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) durchgeführt. Dieses Programm liefert laut der entsprechenden Literatur aufgrund der verwendeten

Algorhitmen und Datenbanken und im Vergleich zu Alternativen relativ verlässliche Ergebnisse, wenngleich die Vorhersage der genauen Schnittstelle immer noch eine Herausforderung ist (Choo et al., 2009).

Von allen so untersuchten Signalpeptiden wies AmyP′ sowohl für Gram-positive als auch für Gram-negative Organismen die schlechteste Prognose auf. Dies schien zunächst den schädlichen Effekt auf *E. coli* zu erklären. Die Ergebnisse aus den Wachstumsversuchen (siehe Punkt 3.7.) korrelierten jedoch nicht mit den Vorhersagen. So ergaben sich bei der Verwendung eines der Signalpeptide in Kombination mit CPE oder CPE_T trotz gleicher in silico-Vorhersagen z.T. stark voneinander abweichende Verträglichkeiten für *E. coli*. Somit lag die Schlussfolgerung nahe, dass nicht nur das Signalpeptid, sondern auch die damit fusionierte Aminosäuresequenz von CPE oder CPE_T einen maßgeblichen Einfluss auf die Prozessierung und damit auch auf die Verträglichkeit des Fusionsproteins in *E. coli* hat.

Die Signalpepid-vermittelte Proteinsekretion von Gram-positiven Bakterien ist hauptsächlich am Modellorganismus *Bacillus subtilis* untersucht worden (Tjalsma et al., 2000). In der Literatur sind zwar Beispiele für die erfolgreiche Produktion und Sekretion von heterologen Proteinen in Clostridien zu finden (Barbé et al., 2005), es ist jedoch hervorzuheben, dass das jeweilige Vorgehen spezifisch für ein bestimmtes Protein ist und sich solch ein System nicht oder nur sehr eingeschränkt auf ein anderes Protein übertragen lässt.

Da offensichtlich auch die an das Signalpeptid anschließende AS-Sequenz von Bedeutung ist, wurde die DNA-Sequenz jedes Signalpeptids um 30 Bp (10 AS) verlängert und wiederum mit *cpe* oder *cpeT* fusioniert. Vergleichende Wachstumsversuche mit diesen Konstrukten ergaben ebenfalls kein einheitliches Bild (siehe Punkt 3.7.), da abhängig vom Signalpeptid die kurzen Konstrukte schlechter oder besser verträglich als die mit einem langen Signalpeptid waren. Es konnte jedoch keine Signalpeptid-CPE- oder -CPE_T-Variante identifiziert werden, die in Kombination mit einem konstitutiven Promoter eine Klonierung in *E. coli* ermöglicht hätte.

Erstmalig wurden vor kurzem annotierte „Shot gun“-Sequenzen des Genoms von *C. sporogenes* veröffentlicht (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5936). Auf der Basis dieser Informationen werden aktuell potentielle neue Signalpeptide aus diesem Organismus identifiziert, die auf ihre Verwendbarkeit als Alternativen hin untersucht werden sollen. Die bisher verwendeten Sequenzen stammen nicht aus dem Zielorganismus, da dieser bisher nicht sequenziert war. Damit besteht erneut die Möglichkeit, dass die potentiellen

neuen Signalpeptide einen positiven Einfluss auf die Produktion und Verträglichkeit in *E. coli* aufweisen und zudem in *C. sporogenes* funktionell sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Auswahl des richtigen Signalpeptides der wichtigste Schritt bei der Etablierung eines Sekretionssystems darstellt (Yoon et al., 2010).

4.3.3. Lösungsansatz 3: Etablierung eines neuen Gram-positiven Zwischenwirtes für die Klonierungsvorhaben

Die Produktion des toxischen Fusionsproteins schädigt alle getesteten *E. coli*-Stämme in hohem Maße. Dadurch werden die Klonierungsarbeiten massiv erschwert bzw. unmöglich gemacht. Diese Intoleranz basiert vermutlich auf der Verwendung der für Gram-positive Bakterien ausgelegten Signalpeptid-Sequenzen. Eine hypothetische Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, wäre die Verwendung eines Gram-positiven Zwischenwirtes. Für eine gute genetische Zugänglichkeit ist hierbei neben *Bacillus subtilis* auch *Lactococcus lactis* bekannt. Für Letztgenannten stehen effiziente Transformationsmethoden zur Verfügung, die eine Effizienz von bis zu 10^6 KFE/µg Plasmid-DNA aufweisen (Gerber et al., 2007). *B. subtilis* wurde diesbezüglich schon zuvor von Mandy Wensche im Rahmen ihrer Diplomarbeit untersucht (Wensche, 2008). Um *L. lactis* auf seine potentielle Eignung als Klonierungszwischenwirt hin zu untersuchen, wurde zunächst die Elektroporation in diesen Organismus erfolgreich etabliert. Anschließend wurden alle zur Verfügung stehenden und in *Clostridium* verwendbaren Vektoren in Transformations-experimenten eingesetzt, um deren Replikationsfähigkeiten in diesem Bakterium zu untersuchen.

Parallel hierzu wurden die Vektoren verdaut, gereinigt und religiert. Ebenfalls wurde direkt versucht, *sp'-cpe*-Fragmente in einige der Vektoren zu ligieren und zu transformieren. Mit diesen Experimenten sollte geklärt werden, ob sich auch Ligationen erfolgreich einbringen lassen. Dies ist neben einer guten Replikationsfähigkeit die zweite essentielle Voraussetzung für die Verwendung dieses Organismus.

Die ersten Versuche ergaben, dass die Vektoren mit einem Replikationsursprung für Clostridien nicht in ausreichendem Maße in diesem Organismus replizieren. Somit müsste in diese Plasmide der bisherige Ursprung für Gram-positive Bakterien durch einen neuen ersetzt werden, der sowohl in *C. sporogenes* als auch in *L. lactis* ausreichende Kopienzahlen ermöglicht. Die Ligationsexperimente ergaben jedoch zudem, dass keine effiziente Transformation von Ligationen möglich ist. Selbst das

ebenfalls verdaute und religierte Plasmid, welches unverdaut als Positivkontrolle diente, konnte nicht erfolgreich in diesen Organismus übertragen werden. Somit stellte *L. lactis* keinen geeigneten Zwischenwirt für die Klonierungsarbeiten dar.

4.3.4. Lösungsansatz 4: Identifizierung und Entwicklung neuer Promotoren

Die Identifizierung oder Konstruktion neuer Promotoren ist ebenfalls ein Schlüsselfaktor innerhalb des Gesamtprojektes. Ziel war es, einen Promoter zu identifizieren oder zu entwickeln, der im Zwischenwirt *E. coli* nicht oder nur minimal aktiv ist, im Zielorganismus *C. sporogenes* dagegen stark konstitutiv aktiv ist.

Eines der am striktesten regulierten Expressionssysteme in *E. coli* ist das Tet-System (Skerra, 1994). Sofern der Repressor TetR an die Operatorsequenz des zugehörigen Promoters gebunden hat, ist die Transkriptionsrate drastisch gesenkt. Es konnte gezeigt werden, dass ein davon abgeleitetes System und der zugehörige Promoter auch in *B. subtilis* funktioniert (Kamionka et al., 2005). Unter der Annahme, dass *C. sporogenes* kein Tet-System bzw. einen Repressor mit identischer Bindesequenz besitzt, sollte die Entwicklung eines in *E. coli* ausgeschalteten, im Endorganismus jedoch konstitutiv aktiven Transkriptionssystems möglich sein (siehe Punkt 3.8.1.). Die Konstruktion dieses 2-Vektor-Systems (ein Expressions- und ein Repressor-Vektor) konnte erfolgreich abgeschlossen und in *E. coli* getestet werden. Nach der Übertragung in *C. sporogenes* konnte jedoch keine Aktivität des Promoters und damit keine Produktion des Fusionsproteins nachgewiesen werden, auch nicht nach einer Induktion mit geringen und verträglichen Mengen Tetracyclin. Eine mögliche Ursache ist das Vorhandensein eines Repressors mit demselben Bindemotiv wie TetR in *C. sporogenes*. Diese Annahme konnte jedoch bisher aufgrund der immer noch mangelhaften Kenntnis des Genoms und fehlender Literatur nicht gefestigt/bestätigt werden. Da der verwendete Promoter eine Konsensussequenz aufweist, ist unklar, warum dieser in *C. sporogenes* nicht aktiv ist. Der Grund hierfür könnte an der „Spacer"-Sequenz zwischen der -35- und -10-Region liegen, da diese eine der beiden TetR-Bindestellen (*tetO*) darstellt. Es ist bekannt, dass Modifikationen in diesem Bereich großen Einfluss auf die Funktionalität eines Promoters haben können (India et al., 2009). Um diese Fragestellung zu klären, wurde der clostridielle *abrB310*-Promoter herangezogen (Scotcher et al., 2005), da von diesem bekannt ist, dass er in *C. sporogenes* stark konstitutiv aktiv ist und er zudem schon im Rahmen des CDEPT verwendet wird (Liu et al., 2008). Die native Spo0A-Box dieses Promoters wurde gegen eine einzelne *tetO*-Sequenz ersetzt. Hinter diesen Promoter wurden verschiedene *sp-cpe*- und *sp-*

cpeT-Varianten ligiert und in *E. coli* transformiert. Es gelang lediglich die Identifikation eines einzigen positiven Klones, was darauf schließen lässt, dass eine einzelne Repressor-Bindestelle nicht ausreicht um die Transkription vollständig zu blockieren. Dieser Klon konnte erfolgreich in *C. sporogenes* konjugiert werden, wonach allerdings keine Produktion des Fusionsproteins beobachtet wurde. Bei der anschließenden Überprüfung wies der modifizierte *abrB310*-Promoter im Gegensatz zu dem ursprünglich verwendeten jedoch viele Mutationen auf, die sich bis in den Bereich des Signalpeptids erstreckten (siehe Punkt 3.8.4.). Obgleich bekannt ist, dass *C. acetobutylicum* geringe Mengen des Fusionsproteins produzieren und auszuschleusen vermag (Box, 2006), ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, dass *C. sporogenes* die Produktion dieses Proteins zumindest in größeren Mengen nicht tolerieren kann. Gleichzeitig deutet es darauf hin, dass der ursprüngliche Promoter nicht funktional war und das Tet-System zukünftig weiter verwendet werden kann. Allerdings müssen nun geeignete Promotoren verschiedener Stärke identifiziert werden, mit denen eine Produktionsrate erreicht werden kann, die der Zielorganismus noch zu tolerieren vermag, jedoch eine ausreichende Produktion des therapeutischen Proteins ermöglicht.

Parallel zu den obigen Versuchen wurde ein auf der T7-RNA-Polymerase und Teilen des kommerziell erhältlichen pET29a-Vektors (Studier et al., 1990) basierendes Expressionssystem für das Fusionsprotein konstruiert (siehe Punkt 3.8.2.). Zur Kontrolle des auf dem Expressionsvektor liegenden Polymerase-Gens wurde der schwache Promoter des *bdhA*-Gens (Walter et al., 1992) verwendet, der um eine LacI-Bindestelle (*lacO*) erweitert wurde. Dieses Konstrukt erwies sich letztlich jedoch als nicht funktional. Deshalb wurde der deutlich längere native *bdhA*-Promoter um eine *lacO*-Sequenz ergänzt.

Dieser Promoter wurde nicht nur vor das Gen der T7-Polymerase kloniert, sondern wurde auch verwendet, um – analog zum bereits bestehenden Expressionssystem von *C. acetobutylicum* (Box, 2006) – die Expression des Fusionsproteins direkt im Zielorganismus zu ermöglichen (siehe Punkt 3.8.3.). Der erwartete Mangel durch die niedrige Aktivität des Promoters sollte durch die Einführung eines besseren Replikationsursprungs für Gram-positive Organismen in das Expressions-Plasmid ausgeglichen werden. Für den Ursprung pIP404 wurde beschrieben, dass er in Clostridien eine höhere Kopienzahl ermöglicht (Bannam et al., 1993). Zudem wird er ebenfalls im Rahmen der CDEPT verwendet, wobei er hierbei mittels Elektroporation in den Zielorganismus transformiert wird (Liu et al., 2002). Die Konjugations-experimente mit diesem fertigen Expressions-Plasmid blieben jedoch erfolglos. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der Art des Ursprungs begründet, da die Replikation nicht nach dem „rolling-circle“-Prinzip, sondern nach dem Theta-Prinzip verläuft

(Jennert et al., 2000). Die Konjugationseffizienz ist jedoch eng mit der „rolling circle“-Vervielfältigung verbunden (Lanka et al., 1995). Das pIP404-Replikon wurde aufgrund der beschriebenen Stabilität in *C. sporogenes* und des Mangels an verfügbaren Alternativen gewählt.

Der native *bdhA*-Promoter ist in *C. sporogenes* nicht stark genug um die Produktion einer detektierbare Menge des Fusionsproteins zu ermöglichen. Jedoch weisen Experimente darauf hin, dass er in diesem Organismus eine geringe Aktivität aufweisen, (K. Riegel, unveröffentlicht) und somit für die Fertigstellung des T7-Expressions-Systems von Nutzen sein könnte. Gleichzeitig sollen zusätzlich weitere in *C. sporogenes* schwach konstitutiv aktive Promotoren identifiziert und charakterisiert werden. Diese Arbeiten werden aktuell durchgeführt.

In einer Publikation über den Promoter *P23* aus *Lactococcus* ist beschrieben, dass dieser in einer Vielzahl Gram-positiver Organismen stark konstitutiv aktiv ist, in *E. coli* jedoch nicht (Que et al., 2000). Der Mechanismus dieser Regulation ist bisher noch unbekannt. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde der Promoter für Klonierungs-experimente mit *sp'-cpe*-Fragmenten herangezogen (siehe Punkt 3.9.). Die ersten Versuche in *E. coli* ergaben positive Klone, aber nach der anschließenden erfolgreichen Konjugation in *C. sporogenes* konnte kein Fusionsprotein nachgewiesen werden. Eine Überprüfung des Plasmids aus *C. sporogenes* ergab keinerlei Mutationen im Promoterbereich oder im Strukturgen des Fusionsproteins. Somit kann davon ausgegangen werden, dass dieser Promoter in diesem Organismus nicht oder nicht ausreichend aktiv ist.

5a. Zusammenfassung

1. Die Produktion der Signalpeptid-CPE-Fusionsproteine konnte als Ursache der ineffizienten Klonierungsversuche im Zwischenwirt *E. coli* nachgewiesen werden. Die Akkumulation dieses Genproduktes in dessen Zellmembran bewirkt einen letalen Wachstumsnachteil.

2. Die Etablierung der Konjugation in *C. sporogenes* konnte erfolgreich durchgeführt werden. Es können nur Plasmide effizient übertragen werden, die nach dem „rolling circle“-Prinzip replizieren.

3. Weder *B. subtilis* noch *L. lactis* kommen als alternative Zwischenwirte für die Klonierungsarbeiten in Frage. Alle verfügbaren Replikationsurspünge für Clostridien replizieren nicht oder nur sehr schlecht in *L. lactis*. Des Weiteren ist die Transformation von Ligationsansätzen in diesen Organismus nicht möglich bzw. sehr ineffizient.

4. Es wurden neue potentielle clostridielle Signalpeptide in Kombination mit CPE oder CPE_T charakterisiert. Trotz positiver in silico-Vorhersagen war keines für *E. coli* wesentlich besser verträglich als AmyP’. Die entsprechenden Programme sind deshalb nur eingeschränkt von Nutzen. Obgleich Hinweise vorliegen, dass auch die auf die Signalpeptidsequenz folgende AS-Sequenz Einfuß auf die Verträglichkeit hat, ergab eine Verlängerung des Signalpeptids ebenfalls keine bessere Verträglichkeit in *E. coli*.

5. Es konnte gezeigt werden dass (synthetische) Promotoren, die in *E. coli* aufgrund eines spezifischen Repressors reprimiert werden und in *C. sporogenes* dagegen konstitutiv aktiv sind (kein Repressor vorhanden), eine effiziente Möglichkeit zur Minimierung der unerwünschte Genexpression im Zwischenwirt sein können.

6. Der aufgrund eines unbekannten Regulationsmechanismus in *E. coli* vollständig inaktive, jedoch in einigen Gram-positiven Bakterien aktive Promotor P23 aus *Lactococcus* weist in *C. sporogenes* keine Aktivität auf.

7. Experimentelle Ergebnisse weisen darauf hin, dass die massive Überproduktion der Fusionsproteine auch für *C. sporogenes* schädlich sein könnte. Deshalb müssen zunächst Promotoren mit verschiedenen Aktivitäten in *C. sporogenes*

identifiziert werden. Mit diesen könnte ein Expressionslevel erreicht werden, der eine genügend hohe Bildung des Fusionsproteins und gleichzeitig das Überleben der *C. sporogenes*-Klone gewährleistet.

5b. Summary

1. It could be shown that the inefficient cloning attempts in *E. coli* were caused by the production of the signal peptide-CPE fusion proteins. Their accumulation in the cell membrane leads to a lethal growth defect.

2. A conjugation protocol for C. sporogenes was successfully established. An efficient transfer was only possible for plasmids that replicate by the “rolling circle” principle.
3. Neither *B. subtilis* nor *L. lactis* can be used as alternative hosts for intermediate cloning steps. All available clostridial origins of replication do not or do only badly replicate in *L. lactis*. Furthermore, the direct transformation of ligation reactions into this organism is inefficient.

4. Potentially new clostridial signal peptides in combination with CPE or CPE_T have been characterized. Although the in silico predictions were positive, none of them showed a less toxic effect on *E. coli* compared to AmyP′. Therefore, these programs are only of limited use. Although there are hints that the amino acid sequence following the signal peptide sequence also impacts the toxicity, it could be shown that an elongation of the respective signal peptide sequence did not result in an improved tolerance in *E. coli*.

5. It could be demonstrated that (synthetic) promoters which are repressed by a specific repressor in *E. coli,* but are constitutively active in *C. sporogenes*, are an efficient method for minimizing undesired gene expression in the intermediate host *E. coli*.

6. Due to an unknown regulation mechanism, the lactococcal promoter P23 is completely inactive in *E. coli* but active in some Gram-positive bacteria. However, this promoter does not show any activity in *C. sporogenes*.

7. Results indicate that a massive overproduction of the fusion proteins could also be toxic for *C. sporogenes*. Therefore, it is necessary to identify promoters showing different activities in this organism. By using said promoters it should be possible to reach an expression level that leads to a sufficient production of fusion proteins without being toxic for the *C. sporogenes* culture.

6. Literaturverzeichnis

Agrawal, N., Bettegowda, C., Cheong, I., Geschwind, J., Drake, C.G., Hipkiss, E.L., Tatsumi, M., Dang, L.H., Diaz, L.A., Pomper, M., Abusedera, M., Wahl, R.L., Kinzler, K.W., Zhou, S., Huso, D.L. & Vogelstein, B., 2004. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15172-15177.

Bannam, T.L. & Rood, J.I., 1993. *Clostridium perfringens-Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants. *Plasmid*, 29, 233-235.

Barak, Y., Schreiber, F., Thorne, S.H., Contag, C.H., Debeer, D. & Matin, A., 2010. Role of nitric oxide in *Salmonella typhimurium*-mediated cancer cell killing. *BMC Cancer*, 10, 146.

Barbé, S., Van Mellaert, L. & Anné, J., 2006. The use of clostridial spores for cancer treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 571-578.

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

Barbé, S., Van Mellaert, L. & Anné, J., 2004. *Clostridium*-mediated transfer system of therapeutic proteins to solid tumors: increased heterologous protein production. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 69, 49-52.

Bermudes, D., Zheng, L. & King, I.C., 2002. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 5, 194-199.

Bertram, J., Kuhn, A. & Dürre, P., 1990. Tn*916*-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in regulation of solvent formation. *Archives of Microbiology*, 153, 373-377.

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

Bettegowda, C., Dang, L.H., Abrams, R., Huso, D.L., Dillehay, L., Cheong, I., Agrawal, N., Borzillary, S., McCaffery, J.M., Watson, E.L., Lin, K., Bunz, F., Baidoo, K., Pomper, M.G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. & Zhou, S., 2003. Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 15083-15088.

Bignotti, E., Tassi, R.A., Calza, S., Ravaggi, A., Romani, C., Rossi, E., Falchetti, M., Odicino, F.E., Pecorelli, S. & Santin, A.D., 2006. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. *Gynecologic Oncology*, 103, 405-416.

Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513-1523.

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

Brynestad, S., Synstad, B. & Granum, P.E., 1997. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology*, 143, 2109-2115.

Camps, M., 2010. Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 4, 58-73.

Caserta, J.A., Hale, M.L., Popoff, M.R., Stiles, B.G. & McClane, B.A., 2008. Evidence that membrane rafts are not required for the action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infection and Immunity*, 76, 5677-5685.

Chabalgoity, J.A., Dougan, G., Mastroeni, P. & Aspinall, R.J., 2002. Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. *Expert Review of Vaccines*, 1, 495-505.

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

Chakrabarti, G., Zhou, X. & McClane, B.A., 2003. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infection and Immunity*, 71, 4260-4270.

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

Chen, C., Lin, J.T., Goss, K.A., He, Y., Halpert, J.R. & Waxman, D.J., 2004. Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. *Molecular Pharmacology*, 65, 1278-1285.

Cheong, I., Huang, X., Thornton, K., Diaz, L.A. & Zhou, S., 2007. Targeting cancer with bugs and liposomes: ready, aim, fire. *Cancer Research*, 67, 9605-9608.

Choi, J.H. & Lee, S.Y., 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 625-635.

Choo, K.H., Tan, T.W. & Ranganathan, S., 2009. A comprehensive assessment of N-terminal signal peptides prediction methods. *BMC Bioinformatics*, 10 Suppl 15, S2.

Creaven, P.J., Allen, L.M., Cohen, M.H. & Nelson, R.L., 1976. Studies on the clinical pharmacology and toxicology of isophosphamide (NSC-109724). *Cancer Treatment Reports*, 60, 445-449.

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

Dallo, S.F. & Weitao, T., 2010. Bacteria under SOS evolve anticancer phenotypes. *Infectious Agents and Cancer*, 5, 3.

Dang, L.H., Bettegowda, C., Agrawal, N., Cheong, I., Huso, D., Frost, P., Loganzo, F., Greenberger, L., Barkoczy, J., Pettit, G.R., Smith, A.B., Gurulingappa, H., Khan, S., Parmigiani, G., Kinzler, K.W., Zhou, S. & Vogelstein, B., 2004. Targeting vascular and avascular compartments of tumors with *C. novyi*-NT and anti-microtubule agents. *Cancer Biology & Therapy*, 3, 326-337.

Dang, L.H., Bettegowda, C., Huso, D.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B., 2001. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 15155-15160.

Diaz, L.A., Cheong, I., Foss, C.A., Zhang, X., Peters, B.A., Agrawal, N., Bettegowda, C., Karim, B., Liu, G., Khan, K., Huang, X., Kohli, M., Dang, L.H., Hwang, P., Vogelstein, A., Garrett-Mayer, E., Kobrin, B., Pomper, M., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. & Huso, D.L., 2005. Pharmacologic and toxicologic evaluation of *C. novyi*-NT spores. *Toxicological Sciences*, 88, 562-575.

Dietzel, F., Gericke, D. & König, W., 1976. Tumor hyperthermia using high frequency for increase of oncolysis by *Clostridium butyricum* (M 55). *Strahlentherapie*, 152, 537-541.

Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16, 6127-6145.

Drasar, B.S. & Hill, M.J., 1972. Intestinal bacteria and cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25, 1399-1404.

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

Duncan, C.L., Strong, D.H. & Sebald, M., 1972. Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology*, 110, 378-391.

Ebihara, C., Kondoh, M., Hasuike, N., Harada, M., Mizuguchi, H., Horiguchi, Y., Fujii, M. & Watanabe, Y., 2006. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316, 255-260.

Engdahl, H.M., Hjalt, T.A. & Wagner, E.G., 1997. A two unit antisense RNA cassette test system for silencing of target genes. *Nucleic Acids Research*, 25, 3218-3227.

Engdahl, H.M., Lindell, M. & Wagner, E.G., 2001. Introduction of an RNA stability element at the 5'-end of an antisense RNA cassette increases the inhibition of target RNA translation. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 11, 29-40.

Engelbart, K. & Gericke, D., 1964. Oncolysis by clostridia. V. Transplanted tumors of the hamster. *Cancer Research*, 24, 239-242.

Feustel, L., Nakotte, S. & Dürre, P., 2004. Characterization and development of two reporter gene systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 798-803.

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

Freigassner, M., Pichler, H. & Glieder, A., 2009. Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial Cell Factories*, 8, 69.

Friedlos, F., Lehouritis, P., Ogilvie, L., Hedley, D., Davies, L., Bermudes, D., King, I., Martin, J., Marais, R. & Springer, C.J., 2008. Attenuated *Salmonella* targets prodrug activating enzyme carboxypeptidase G2 to mouse melanoma and human breast and colon carcinomas for effective suicide gene therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14, 4259-4266.

Fujimori, M., 2008. Anaerobic bacteria as a gene delivery system for breast cancer therapy. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 66, 1211-1218.

Fujimori, M., 2006. Genetically engineered *Bifidobacterium* as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer*, 13, 27-31.

Fujimori, M., Amano, J. & Taniguchi, S., 2002. The genus *Bifidobacterium* for cancer gene therapy. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 5, 200-203.

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

Gerber, S.D. & Solioz, M., 2007. Efficient transformation of *Lactococcus lactis* IL1403 and generation of knock-out mutants by homologous recombination. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 281-286.

Gericke, D., Dietzel, F., König, W., Rüster, I. & Schumacher, L., 1979. Further progress with oncolysis due to apathogenic clostridia. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 243, 102-112.

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

Granum, P.E. & Richardson, M., 1991. Chymotrypsin treatment increases the activity of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon*, 29, 898-900.

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

Groot, A.J., Mengesha, A., van der Wall, E., van Diest, P.J., Theys, J. & Vooijs, M., 2007. Functional antibodies produced by oncolytic clostridia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 985-989.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.

Hanna, P.C., Mietzner, T.A., Schoolnik, G.K. & McClane, B.A., 1991. Localization of the receptor-binding region of *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 11037-11043.

Hanna, P.C., Wieckowski, E.U., Mietzner, T.A. & McClane, B.A., 1992. Mapping of functional regions of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infection and Immunity*, 60, 2110-2114.

Hauschild, A.H., Hilsheimer, R. & Martin, W.G., 1973. Improved purification and further characterization of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Canadian Journal of Microbiology*, 19, 1379-1382.

Hayashi, K., Zhao, M., Yamauchi, K., Yamamoto, N., Tsuchiya, H., Tomita, K. & Hoffman, R.M., 2009. Cancer metastasis directly eradicated by targeted therapy with a modified *Salmonella typhimurium*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106, 992-998.

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

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77, 51-59.

Hoffman, R.M., 2009. Tumor-targeting amino acid auxotrophic *Salmonella typhimurium*. *Amino Acids*, 37, 509-521.

Hook-Barnard, I.G. & Hinton, D.M., 2009. The promoter spacer influences transcription initiation via σ70 region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 737-742.

Huang, I., Waters, M., Grau, R.R. & Sarker, M.R., 2004. Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbiology Letters*, 233, 233-240.

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

Jain, R.K. & Forbes, N.S., 2001. Can engineered bacteria help control cancer? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 14748-14750.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. & Thun, M.J., 2008. Cancer statistics, 2008. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58, 71-96.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. & Thun, M.J., 2009. Cancer statistics, 2009. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59, 225-249.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J. & Thun, M.J., 2007. Cancer statistics, 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57, 43-66.

Jennert, K.C., Tardif, C., Young, D.I. & Young, M., 2000. Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Microbiology*, 146, 3071-3080.

Kamionka, A., Bertram, R. & Hillen, W., 2005. Tetracycline-dependent conditional gene knockout in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 728-733.

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

Kanthou, C. & Tozer, G.M., 2007. Tumour targeting by microtubule-depolymerizing vascular disrupting agents. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11, 1443-1457.

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

Katahira, J., Sugiyama, H., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M. & Sugimoto, N., 1997. *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 26652-26658.

Katalin, B., 2009. Claudin expression in different pancreatic cancers and its significance in differential diagnostics. *Magyar Onkologia*, 53, 273-278.

Kimura, J., Abe, H., Kamitani, S., Toshima, H., Fukui, A., Miyake, M., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, S. & Horiguchi, Y., 2010. *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 401-408.

Kimura, N.T., Taniguchi, S., Aoki, K. & Baba, T., 1980. Selective localization and growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following intravenous administration. *Cancer Research*, 40, 2061-2068.

Kleiner, D., Paul, W. & Merrick, M.J., 1988. Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. *Journal of General Microbiology*, 134, 1779-1784.

Kojima, F., Ishida, M., Takikita-Suzuki, M., Hotta, M., Katsura, K., Nagata, A., Enoki, Y., Kato, G. & Okabe, H., 2010. Claudin expression profiles in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Oncology Reports*, 23, 927-931.

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

Kokai-Kun, J.F. & McClane, B.A., 1997. Deletion analysis of the *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infection and Immunity*, 65, 1014-1022.

Kominsky, S.L., 2006. Claudins: emerging targets for cancer therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 8, 1-11.

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

Kominsky, S.L., Vali, M., Korz, D., Gabig, T.G., Weitzman, S.A., Argani, P. & Sukumar, S., 2004a. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *The American Journal of Pathology*, 164, 1627-1633.

Kominsky, S.L., Vali, M., Korz, D., Gabig, T.G., Weitzman, S.A., Argani, P. & Sukumar, S., 2004b. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *The American Journal of Pathology*, 164, 1627-1633.

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

Kretschmer, H., 1971. First experiences with the treatment of malignant brain neoplasms by use of spores of the strain M 55. *Das Deutsche Gesundheitswesen*, 26, 1704-1705.

Kretschmer, H. & Grässer, A., 1972. Treatment of malignant tumors with spores of *Clostridium butyricum* M 55. IV. Serological studies on tumor-bearing patients. *Archiv für Geschwulstforschung*, 39, 322-327.

Lal-Nag, M. & Morin, P.J., 2009. The claudins. *Genome Biology*, 10, 235.

Lambin, P. & Landuyt, W., 2003. Vascular targeting: a potential additional anti-cancer treatment. *Verhandelingen - Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van België*, 65, 29-46.

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

Landers, K.A., Samaratunga, H., Teng, L., Buck, M., Burger, M.J., Scells, B., Lavin, M.F. & Gardiner, R.A., 2008. Identification of claudin-4 as a marker highly overexpressed in both primary and metastatic prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 99, 491-501.

Lanka, E. & Wilkins, B.M., 1995. DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 141-169.

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

Li, Z., Fallon, J., Mandeli, J., Wetmur, J. & Woo, S.L.C., 2008. A genetically enhanced anaerobic bacterium for oncopathic therapy of pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 100, 1389-1400.

Li, Z., Fallon, J., Mandeli, J., Wetmur, J. & Woo, S.L.C., 2009. The oncopathic potency of *Clostridium perfringens* is independent of its alpha-toxin gene. *Human Gene Therapy*, 20, 751-758.

Litkouhi, B., Kwong, J., Lo, C., Smedley, J.G., McClane, B.A., Aponte, M., Gao, Z., Sarno, J.L., Hinners, J., Welch, W.R., Berkowitz, R.S., Mok, S.C. & Garner, E.I.O., 2007. Claudin-4 overexpression in epithelial ovarian cancer is associated with hypomethylation and is a potential target for modulation of tight junction barrier function using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Neoplasia*, 9, 304-314.

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

Liu, S. C., Ahn, G., Kioi, M., Dorie, M., Patterson, A.V. & Brown, J.M., 2008. Optimized *Clostridium*-directed enzyme prodrug therapy improves the antitumor activity of the novel DNA cross-linking agent PR-104. *Cancer Research*, 68, 7995-8003.

Loeffler, M., Le'Negrate, G., Krajewska, M. & Reed, J.C., 2008. Inhibition of tumor growth using *Salmonella* expressing Fas ligand. *Journal of the National Cancer Institute*, 100, 1113-1116.

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

Mazodier, P., Petter, R. & Thompson, C., 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *Journal of Bacteriology*, 171, 3583-3585.

McClane, B.A., 1996. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon*, 34, 1335-1343.

McClane, B.A., 2001. The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial tight junctions. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39, 1781-1791.

Melvillé, S.B., Labbe, R. & Sonenshein, A.L., 1994. Expression from the *Clostridium perfringens cpe* promoter in *C. perfringens* and *Bacillus subtilis*. *Infection and Immunity*, 62, 5550-5558.

Mermelstein, L.D. & Papoutsakis, E.T., 1993. In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1077-1081.

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

Michelsen, B.K., 1995. Transformation of *Escherichia coli* increases 260-fold upon inactivation of T4 DNA ligase. *Analytical Biochemistry*, 225, 172-174.

Michl, P., Barth, C., Buchholz, M., Lerch, M.M., Rolke, M., Holzmann, K., Menke, A., Fensterer, H., Giehl, K., Löhr, M., Leder, G., Iwamura, T., Adler, G. & Gress, T.M., 2003. Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Research*, 63, 6265-6271.

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

Minton, N.P., 2003. Clostridia in cancer therapy. *Nature Reviews. Microbiology*, 1, 237-242.

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

Mirza, N.N., McCloud, J.M. & Cheetham, M.J., 2009. *Clostridium septicum* sepsis and colorectal cancer - a reminder. *World Journal of Surgical Oncology*, 7, 73.

Miyamoto, K., Chakrabarti, G., Morino, Y. & McClane, B.A., 2002. Organization of the plasmid *cpe* locus in *Clostridium perfringens* type A isolates. *Infection and Immunity*, 70, 4261-4272.

Moese, J.R. & Moese, G., 1959. Oncolysis experiments with apathogenic, anaerobic spore suspensions on the Ehrlich tumor of the mouse. *Zeitschrift Für Krebsforschung*, 63, 63-74.

Moese, J.R. & Moese, G., 1964. Onkolysis by clostridia. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other nonpathogenic clostridia against the Ehrlich carcinoma. *Cancer Research*, 24, 212-216.

Moese, J.R., Moese, G., Propst, A. & Heppner, F., 1967. Oncolysis of malignant tumors through the M 55 *Clostridium* strain. II. *Medizinische Klinik*, 62, 220-225.

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

Nichols, L.S., Ashfaq, R. & Iacobuzio-Donahue, C.A., 2004. Claudin-4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *American Journal of Clinical Pathology*, 121, 226-230.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10, 1-6.

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

Nuyts, S., Theys, J., Landuyt, W., van Mellaert, L., Lambin, P. & Anné, J., 2001. Increasing specificity of anti-tumor therapy: cytotoxic protein delivery by non-pathogenic clostridia under regulation of radio-induced promoters. *Anticancer Research*, 21, 857-861.

Nuyts, S., Van Mellaert, L., Theys, J., Landuyt, W., Bosmans, E., Anné, J. & Lambin, P., 2001. Radio-responsive recA promoter significantly increases TNFα production in recombinant clostridia after 2 Gy irradiation. *Gene Therapy*, 8, 1197-1201.

Nuyts, S., Van Mellaert, L., Theys, J., Landuyt, W., Lambin, P. & Anné, J., 2002. *Clostridium* spores for tumor-specific drug delivery. *Anti-Cancer Drugs*, 13, 115-125.

Nuyts, S., Van Mellaert, L., Theys, J., Landuyt, W., Lambin, P. & Anné, J., 2001. The use of radiation-induced bacterial promoters in anaerobic conditions: a means to control gene expression in *Clostridium*-mediated therapy for cancer. *Radiation Research*, 155, 716-723.

O'Brien, R.W. & Morris, J.G., 1971. The ferredoxin-dependent reduction of chloramphenicol by *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of General Microbiology*, 67, 265-271.

Oultram, J.D., Loughlin, M., Swinfield, T., Brehm, J.K., Thompson, D.E. & Minton, N.P., 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 56, 83-88.

Paredes-Sabja, D. & Sarker, M.R., 2009. *Clostridium perfringens* sporulation and its relevance to pathogenesis. *Future Microbiology*, 4, 519-525.

Patyar, S., Joshi, R., Byrav, D.S.P., Prakash, A., Medhi, B. & Das, B.K., 2010. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science*, 17, 21.

Pawelek, J.M., Low, K.B. & Bermudes, D., 2003. Bacteria as tumour-targeting vectors. *The Lancet Oncology*, 4, 548-556.

Phillips, Z.E.V. & Strauch, M.A., 2002. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 392-402.

Popoff, M.R. & Bouvet, P., 2009. Clostridial toxins. *Future Microbiology*, 4, 1021-1064.

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

Que, Y.A., Haefliger, J.A., Francioli, P. & Moreillon, P., 2000. Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. cremoris using a new shuttle vector. *Infection and Immunity*, 68, 3516-3522.

Rafter, J., 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *The British Journal of Nutrition*, 88, Suppl 1, S89-94.

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

Rood, J.I., 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annual Review of Microbiology*, 52, 333-360.

Rousseau, P., Chagnon, A. & Fredette, V., 1970. Effect of oncolytic anaerobic spores on animal cell cultures. *Cancer Research*, 30, 849-854.

Ryan, R.M., Green, J. & Lewis, C.E., 2006. Use of bacteria in anti-cancer therapies. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 28, 84-94.

Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A. & Yolken, R.H., 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*, 344, 1046-1049.

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

Saeki, R., Kondoh, M., Kakutani, H., Matsuhisa, K., Takahashi, A., Suzuki, H., Kakamu, Y., Watari, A. & Yagi, K., 2010. A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977a. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977b. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.

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

Santin, A.D., Cané, S., Bellone, S., Palmieri, M., Siegel, E.R., Thomas, M., Roman, J.J., Burnett, A., Cannon, M.J. & Pecorelli, S., 2005. Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cancer Research*, 65, 4334-4342.

Sasaki, T., Chihara, G., Takasuka, N. & Suzuki, S., 1976. Effect of *Clostridium* toxoids, especially of *Clostridium perfringens* toxoid, on mouse transplanted tumors. *Japanese journal of cancer research*, 67, 275-277.

Schlechte, H. & Elbe, B., 1988. Recombinant plasmid DNA variation of *Clostridium oncolyticum*-model experiments of cancerostatic gene transfer. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 268, 347-356.

Schlechte, H., Kopp, J., Elbe, B. & Baumbach, L., 1982. Germination of *Clostridium oncolyticum* in spheroid cell cultures as an in vitro tumor model. *Archiv für Geschwulstforschung*, 52, 613-620.

Schmidt, W., Fabricius, E. & Schneeweiss, U., 2006. The tumour-*Clostridium* phenomenon: 50 years of developmental research (Review). *International Journal of Oncology*, 29, 1479-1492.

Scotcher, M.C., Rudolph, F.B. & Bennett, G.N., 2005. Expression of *abrB310* and *sinR*, and effects of decreased *abrB310* expression on the transition from acidogenesis to solventogenesis, in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1987-1995.

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S. & Hayashi, H., 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 996-1001.

Shine, J. & Dalgarno, L., 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 1342-1346.

Singh, U., Van Itallie, C.M., Mitic, L.L., Anderson, J.M. & McClane, B.A., 2000. CaCo-2 cells treated with *Clostridium perfringens* enterotoxin form multiple large complex species, one of which contains the tight junction protein occludin. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 18407-18417.

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. & McClane, B.A., 2004. Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *Clostridium perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infection and Immunity*, 72, 6914-6923.

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

Stark, F.C., Sad, S. & Krishnan, L., 2009. Intracellular bacterial vectors that induce CD8(+) T cells with similar cytolytic abilities but disparate memory phenotypes provide contrasting tumor protection. *Cancer Research*, 69, 4327-4334.

Studier, F.W. & Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189, 113-130.

Swisshelm, K., Macek, R. & Kubbies, M., 2005. Role of claudins in tumorigenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 919-928.

Takahashi, A., Kondoh, M., Masuyama, A., Fujii, M., Mizuguchi, H., Horiguchi, Y. & Watanabe, Y., 2005. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin in its interaction with claudin-4. *Journal of Controlled Release*, 108, 56-62.

Tang, W., He, Y., Zhou, S., Ma, Y. & Liu, G., 2009. A novel *Bifidobacterium infantis*-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28, 155.

Tartof, K.D. & Hobbs, C.A., 1988. New cloning vectors and techniques for easy and rapid restriction mapping. *Gene*, 67, 169-182.

Thamm, D.H., Kurzman, I.D., King, I., Li, Z., Sznol, M., Dubielzig, R.R., Vail, D.M. & MacEwen, E.G., 2005. Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting *Salmonella typhimurium* to dogs with spontaneous neoplasia: phase I evaluation. *Clinical Cancer Research*, 11, 4827-4834.

Theys, J., Barbé, S., Landuyt, W., Nuyts, S., Van Mellaert, L., Wouters, B., Anné, J. & Lambin, P., 2003. Tumor-specific gene delivery using genetically engineered bacteria. *Current Gene Therapy*, 3, 207-221.

Theys, J., Landuyt, A.W., Nuyts, S., Van Mellaert, L., Lambin, P. & Anné, J., 2001. *Clostridium* as a tumor-specific delivery system of therapeutic proteins. *Cancer Detection and Prevention*, 25, 548-557.

Theys, J., Landuyt, W., Nuyts, S., Van Mellaert, L., Bosmans, E., Rijnders, A., Van Den Bogaert, W., van Oosterom, A., Anné, J. & Lambin, P., 2001. Improvement of *Clostridium* tumour targeting vectors evaluated in rat rhabdomyosarcomas. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 30, 37-41.

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

Theys, J., Nuyts, S., Landuyt, W., Van Mellaert, L., Dillen, C., Böhringer, M., Dürre, P., Lambin, P. & Anné, J., 1999. Stable *Escherichia coli-Clostridium acetobutylicum* shuttle vector for secretion of murine tumor necrosis factor α. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4295-4300.

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

Thormann, K. & Dürre, P., 2001. Orf5/SolR: a transcriptional repressor of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27, 307-313.

Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S. & van Dijl, J.M., 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 515-547.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4354.

Trédan, O., Galmarini, C.M., Patel, K. & Tannock, I.F., 2007. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99, 1441-1454.

Van Mellaert, L., Barbé, S. & Anné, J., 2006. *Clostridium* spores as anti-tumour agents. *Trends in Microbiology*, 14, 190-196.

Vaupel, P., 2008. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *The Oncologist*, 13, 21-26.

Vaupel, P., 2004. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist*, 9, 10-17.

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

Vaupel, P., Höckel, M. & Mayer, A., 2007. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO2 histography. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9, 1221-1235.

Varga, J., Stirewalt, V.L. & Melville, S.B., 2004. The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (*cpe*) regulation in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology*, 186, 5221-5229.

Walter, K.A., Bennett, G.N. & Papoutsakis, E.T., 1992. Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes. *Journal of Bacteriology*, 174, 7149-7158.

Weber, K. & Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 4406-4412.

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

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

Wei, M.Q., Ren, R., Good, D. & Anné, J., 2008. Clostridial spores as live 'Trojan horse' vectors for cancer gene therapy: comparison with viral delivery systems. *Genetic Vaccines and Therapy*, 6, 8.

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

Weiss, S.B., Hsu, W.T., Foft, J.W. & Scherberg, N.H., 1968a. Transfer RNA coded by the T4 bacteriophage genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61, 114-121.

Weiss, S.B., Hsu, W.T., Foft, J.W. & Scherberg, N.H., 1968b. Transfer RNA coded by the T4 bacteriophage genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61, 114-121.

Westphal, K., Leschner, S., Jablonska, J., Loessner, H. & Weiss, S., 2008. Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. *Cancer Research*, 68, 2952-2960.

Whipple, A.O., 1949. An evaluation of radical surgery for carcinoma of the pancreas and ampullary region. *Annals of Internal Medicine*, 31, 624-627.

Wilson, W.R., Rosenblatt, J.E. & Washington, J.A., 1975. Anaerobic bacteremia. *Connecticut Medicine*, 39, 597-600.

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

Wnek, A.P. & McClane, B.A., 1989. Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a 160,000-Mr complex in mammalian membranes. *Infection and Immunity*, 57, 574-581.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103-119.

Yazawa, K., Fujimori, M., Amano, J., Kano, Y. & Taniguchi, S., 2000. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Therapy*, 7, 269-274.

Yazawa, K., Fujimori, M., Nakamura, T., Sasaki, T., Amano, J., Kano, Y. & Taniguchi, S., 2001. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 66, 165-170.

Wensche, M., 2009. Etablierungs von B. subtilis als Zwischenwirt im Rahmen des Projektes zur Behandlung nekrotisierender Tumore mir clostridiellen Endosporen. Diplomarbeit, Unsiversität Ulm.

Yi, C., Huang, Y., Guo, Z. & Wang, S., 2005. Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on melanoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26, 629-634.

Yoon, S.H., Kim, S.K. & Kim, J.F., 2010. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent Patents on Biotechnology*, 4, 23-29.

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

Zhao, Y. & Melville, S.B., 1998. Identification and characterization of sporulation-dependent promoters upstream of the enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology*, 180, 136-142.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Dürre möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine Ratschläge und Anregungen, sein Interesse an den Fortschritten meiner Arbeit und für die Ermöglichung eines selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens bedanken. Ebenfalls möchte ich ihm für die interessanten Einblicke in das „hard-“ und „software“-Innenleben eines Apple-Computers danken. Ich weiß nun, dass MACs auch nur PCs sind.

Herrn Prof. Dr. Bernhard J. Eikmanns möchte ich für das Koreferat dieser Arbeit danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas M. Gress und Herrn PD Dr. Patrick J. Michl von der Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel des Universitätsklinikums Marburg möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes bedanken.

Besonders danken möchte ich Brigitte Zickner, Petra Dangel, Anne Frank-Barone und Brigitte Ehrler, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Denise Emer möchte ich für die erfrischenden und witzigen, aber auch ernsten Gespräche während der Pausen danken. Auch wird sie mir als „Böser Engel“ stets in Erinnerung bleiben. Es war eine schöne Zeit, an die ich mich gerne erinnere.

Bei der Heimkehrerin Annette Arndt, deren Esprit und Schlagfertigkeit einfach großartig ist, möchte ich mich für die Hilfe bei der Anfertigung der englischen Zusammenfassung bedanken. Erstaunlich, dass sie sich in einem Labor angesiedelt hat, in dem sowohl das Ethidiumbromid-Bad als auch ich zu finden sind.

Einen besonderen Dank auch an Karin Riegel und Sandra König, die diese Arbeit im Vorfeld in mühseliger und akribischer Arbeit nach großen und kleinen Fehlern durchforsteten. Ohne ihre Hilfe und das eine oder andere Lächeln auf meine Kosten wäre das Schreiben nicht so unterhaltsam und angenehm gewesen.

Natürlich möchte ich mich auch bei den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern meines Labors, der gesamten AG Dürre und allen Angehörigen des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie bedanken. Insbesondere auch bei den verbliebenen beiden

„Alten“ Marc Auchter und Thomas Rimpf. Wären nicht die erholsamen Gespräche und die anregenden Unterhaltungen am Mittagstisch gewesen, so hätte ich die Tiefs der Laborarbeit viel stärker empfunden. Ihr alle habt das hervorragende Arbeitsklima mit gestaltet.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und den Rückhalt während der gesamten Studien- und Doktorandenzeit bedanken. Ohne Euren Zuspruch und Euer Vertrauen wäre dies alles nicht möglich gewesen. Ich hoffe, ihr seid stolz auf mich.

Frau Gertrud (Tante) Jann möchte ich für ihr Vertrauen schon in jungen Jahren danken. Sie hatten recht und ich hoffe, Sie wären stolz auf mich.

Wolfgang Schüle möchte ich für die Einblicke in die faszinierende Unterwasserwelt und die Erfahrung der Stille danken. Ein Tauchgang mit Freunden und der Stress des Laboralltags fällt einfach ab.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei Lisa bedanken. Ohne Dich, Dein Lächeln, Deinen Zuspruch und vieles, vieles mehr wäre ich heute nicht hier und nicht ich.

Curriculum vitae

28. September 1978	Geburt in Überlingen am Bodensee
09/1985 – 07/1989	Besuch der Grundschule in Überlingen
09/1989 – 07/1990	Besuch der Hauptschule in Überlingen
09/1990 – 07/1996	Besuch der Realschule in Überlingen
09/1996 – 07/1999	Besuch des Wirtschaftsgymnasiums in Überlingen Abschluß mit dem Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
09/1999 – 05/2006	Ableistung des Grundwehrdienstes in Sigmaringen
10/2000 – 09/2002	Grundstudium der Biologie an der Universität Ulm Abschluss mit der Diplomvorprüfung
10/2002 – 05/2005	Hauptstudium der Biologie an der Universität Ulm Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Molekularbiologie, Pharmakologie und Toxikologie, Betriebswirtschaft
06/2005 – 03/2006	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm mit dem Thema „Herstellung rekombinanter *Clostridium* Sporen als Therapieansatz bei Pankreaskarzinomen“
04/2006 –	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Univesität Ulm
04/2006 –	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm
05/2006	Erlangungen des akademischen Grades „Diplom Biologe“

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 _____

Dominik Meisohle