Herstellung rekombinanter Clostridien-Sporen zur Therapie nekrotisierender Tumore

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

vorgelegt von
Gunnar Box
aus Ulm

Ulm, 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung
Mikrobiologie und Biotechnologie
der Universität Ulm
angefertigt.

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. K.-D. Spindler
Referent:	Prof. Dr. P. Dürre
Korreferent:	Prof. Dr. B. Eikmanns

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungen VI

1 **Einleitung** 1

2 **Material und Methoden** 7

2.1 **Gase, Chemikalien und Geräte** 7
2.2 **Geräte und Materialien** 8
2.3 **Bakterienstämme** 11
2.4 **Zelllinien** 12
2.5 **Zellanzucht** 12
2.5.1 Nährmedien 12
2.5.1.1 2fach YTG Medium (OULTRAM et al., 1988; mod.) 13
2.5.1.2 LB-Medium (SAMBROOK et al., 2001) 13
2.5.1.3 TB-Medium (TARTOF and HOBBS, 1988) 13
2.5.1.4 Phosphatlimitiertes Minimalmedium, MES-gepuffert (BERTRAM et al., 1990) 14
2.5.1.4 CB-Medium (O`BRIEN und MORRIS, 1971) 15
2.5.1.5 SOB-Medium (SAMBROOK et al., 2001) 15
2.5.2 Zellkulturmedium 15
2.5.3 Medienzusätze 16
2.5.4 Stammhaltung 17
2.5.5 Anzuchtbedingungen 17
2.5.6 Bestimmung von Wachstumsparametern 18
2.5.6.1 Messungen der optischen Dichte 18
2.5.6.2 Messungen des externen pH-Werts 18
2.6 **Sporenfärbung** 18
2.7 **Arbeiten mit Nukleinsäuren** 19
2.7.1 Oligodesoxynukleotide und Plasmide 19

2.7.2 Behandlung von Geräten und Lösungen 28
2.7.3 Isolation chromosomaler DNA aus Clostridien 28
2.7.4 Isolation von Gesamt-RNA mittels „RNeasyTM-Kit“, modifiziertes Protokoll (Qiagen GmbH, Hilden) 29
2.7.5 DNase-Behandlung in wässrigen RNA-Lösungen 30
2.7.6 DNase-Behandlung auf einer Silica-Gel-Membran 30
2.7.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (BIRNBOIM et al., 1979; mod.) 30
2.7.8 Plasmidpräparation mittels „GFXTM Micro Plasmid Prep-Kit“ 32
2.7.9 RNaseA-Behandlung von DNA-Lösungen 32
2.7.10 einigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren 32
2.7.10.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 33
2.7.10.2 Ethanolfällung 33
2.7.10.3 Isopropanolfällung 34
2.7.10.4 Mikrodialysen mittels Membranfilter 34
2.7.10.5 Mikrokonzentratorsäulen 34
2.7.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 35
2.7.11.1 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren über die Agarose-Gelelektrophorese 35
2.7.11.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren über die photometrische Messung 35
2.7.12 Polymerasekettenreaktion (PCR) 36
2.7.13 Quantitative RT-PCR 37
2.7.14 Einfügen von Restriktionsschnittstellen über PCR 39
2.7.15 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten 39
2.7.15.1 Agarose-Gelelektrophorese 39
2.7.15.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 40
2.7.16 Größenbestimmung von Nukleinsäuren 41
2.7.17 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 41
2.7.18 Enzymatische Modifikationen von DNA 42
2.7.18.1 Restriktionsspaltungen von DNA 42
2.7.18.2 Dephosphorylierungen von DNA-Fragmenten (SAMBROOK et al., 2001; mod.) 42
2.7.19 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase (WEISS et al., 1968) 43

2.7.20 Sequenzierung von DNA 43
2.7.21 Analyse der Sequenzdaten 43
2.7.22 Transformation 44
2.7.22.1 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation (DOWER et al., 1988) 44
2.7.22.2 Transformation von *E. coli* durch kaltkompetente Zellen (INOUE et al., 1990; mod.) 45
2.7.22.3 Transformation von *E. coli* mit schnellkompetenten Zellen 46
2.7.22.4 Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation (MERMELSTEIN et al., 1992; mod.) 46
2.7.22.5 Konjugation von *C. sporogenes* (PURDY et al., 2002) 47
2.7.23 X-Gal-Färbung zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone 48
2.7.24 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (SAMBROOK et al., 2001) 49
2.8 **Arbeiten mit Proteinen** 49
2.8.1 Herstellung von zellfreien Extrakten 49
2.8.1.1 French® Pressure Cell-Press 49
2.8.1.2 „Ribolyser™ Cell Disruptor“ 50
2.8.1.3 Ultraschall 50
2.8.2 Proteinbestimmungen an zellfreien Extrakten 51
2.8.2.1 Proteinbestimmungen nach BRADFORD, 1976; mod. 51
2.8.2.2 Proteinbestimmungen mit Nanoquant™ 51
2.8.2.3 BCA-Proteinbestimmungen 51
2.8.3 Nachweis der Enzymaktivität von Cytochrom P_{450} CYP2BI mittels Resorufin (LUBET et al., 1985) 52
2.8.4 Bestimmung der Cytotoxizität des rekombinanten Enterotoxins (CPE) von *C. perfringens* 53
2.8.5 Konzentrierung von Proteinlösungen 53
2.8.5.1 Mikrokonzentratorsäulen 54
2.8.5.2 Dialyse 54
2.8.5.3 TCA-Fällung 55
2.8.6 Heterologe Überexpression plasmidkodierter Proteine in *E. coli* 55
2.8.7 Affinitätschromatographie an Nickel-NTA 56
2.8.8 Phosphorylierung von Proteinen 57

2.8.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (PAGE) 57
2.8.10 Denaturierende diskontinuierliche SDS-PAGE 58
2.8.11 Western-Transfer: Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulose 60
2.8.12 Immunofärbung von Proteinen 61
2.8.12.1 Coomassie-Färbung (WEBER und OSBORN, 1969; mod.) 62
2.8.12.2 Silberfärbungen von Polyacrylamid-Gelen (BLUM et al., 1987) 62
2.8.13 Radioaktive Gelretardationsexperimente 64
2.8.14 Isolation bakterieller Cytosol- und Membranproteine (PENECKY und COON, 1996) 65
2.9 **Rekombinante Clostridien-Sporen im Tierversuch** 66

3 **Experimente und Ergebnisse** 67

3.1 **Entwicklung rekombinanter C. acetobutylicum Sporen für die CDEPT (Clostridial Directed Enzyme Prodrug Therapy)** 67
3.1.1 Stand der Forschung zu Beginn dieser Arbeit 67
3.1.2 Untersuchung des Genoms von *C. acetobutylicum* auf Cytochrom P_{450}-Homologe 67
3.1.3 Expression von CYP2B1 aus *R. norvegicus* in *E. coli* 69
3.1.4 Expression von CYP2B1 aus *R. norvegicus* in *C. acetobutylicum* 71
3.1.5 Untersuchungen zur Funktionalität des rekombinanten CYP2B1 73
3.2 **Entwicklung rekombinanter *C. acetobutylicum* Sporen für eine CPE-Therapie** 75
3.2.1 Genetische Organisation des cpe-Gens in *C. perfringens* *76*
3.2.2 Herstellung von Schaukel-Vektoren mit DNA-Sequenzen für Signalpeptide 78
3.2.3 Konstruktion von Vektoren zur Expression von Signalpeptid-CPE Fusionen 82
3.2.4 Untersuchung der rekombinanten *C. acetobutylicum* Stämme 89
3.2.5 Konzentration des rekombinanten CPE-Toxins 95
3.2.6 Cytotoxizitätstests mit rekombinantem CPE-Toxin 97
3.2.7 Tierversuche mit rekombinanten *C. acetobutylicum*-Sporen 101
3.3 **Untersuchungen der Abhängigkeit der *cpe*-Gen-Expression von Spo0A** 102
3.3.1 Genetische Organisation des 5'-regulatorischen Bereichs des *cpe*-Gens 102

3.3.2 Gelretardationsexperimente mit rekombinantem Spo0A aus *C. acetobutylicum* 103
3.4 **Untersuchung der Genregion *cac*0338 und *cac*0339** 105
3.4.1 Homologien der untersuchten Gene zu Toxin-Genen aus *C. botulinum* 105
3.4.2 Überexpression und Suppression der Gene *cac*0338 und *cac*0339 107

4 **Diskussion** 111

4.1 **Vorbemerkungen zur Tumortherapie** 111
4.2 **Die Entwicklung rekombinanter *Clostridium acetobutylicum*-Sporen für eine CDEPT (Clostridial Directed Enzyme Prodrug Therapy)** 112
4.2.1 Verwendung von CYP2BI als Aktivator für Arzneimittelvorstufen 112
4.2.2 Cytochrom P_{450}-Enzyme und Häm-Synthese in *C. acetobutylicum* 114
4.2.3 Analyse der Untersuchungsergebnisse 115
4.2.4 Mögliche Ansatzpunkte für eine Verbesserung des angestrebten Cytochrom P_{450}-Systems 117
4.3 **Entwicklung einer Tumortherapie unter Verwendung des *Clostridium perfringens*-Enterotoxins (CPE)** 118
4.3.1 Verwendung von CPE als Mittel in der Tumortherapie 118
4.3.2 Durchgeführte Experimente und Analyse 120
4.3.3 Ansatzpunkte für eine Optimierung der CPE-Expression 122
4.3.4 Der Einfluss des zentralen Sporulationsregulators Spo0A auf die Enterotoxinbildung von *Clostridium perfringens* 124
4.4 **Untersuchung eines möglichen ADP-Ribosyltransferase-Systems in *C. acetobutylicum*** 125
4.4.1 Mono-ADP-Ribosyltransferase und ADP-Ribosylglykohydrolase 126
4.4.2 Untersuchung der Gene *cac*0338 und *cac*0339 aus *C. acetobutylicum* 127

5 **Literaturverzeichnis** 130

6 **Zusammenfassung** 144

7 **Summary** 146

Abkürzungen

®	„registered trademark” (eingetragenes Warenzeichen)
°C	Grad Celsius
µ	Mikro (10^{-6})
A	Adenin; Ampère
ACC	„American Cell Culture”
AG	Aktiengesellschaft
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	„American Type Culture Collection”
B.	*Bacillus*
BCA	Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin; Kohlenstoff
c	Konzentration
C.	*Clostridium*
ca.	circa
CAC	*Clostridium acetobutylicum* Genom
CAP	*Clostridium acetobutylicum* Megaplasmid pSol
CDEPT	Clostridial-directed enzyme-prodrug therapy
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Centimeter
Co	Kompanie
CPE	*Clostridium perfringens* Enterotoxin
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleotide
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosophat
Dr.	Doktor
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTTP	Desoxytyrosin-5'-triphosophat
E.	*Escherichia*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	„et alii" (und andere)
F	Farad
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
FPLC	„fast protein liquid chromatography"
G	Guanin
g	Gramm; -fache Erdbeschleunigung (9,81 ms^{-2})
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
HG	Handelsgesellschaft
Hrsg.	Herausgeber
Inc.	Incorporated
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
IRD	„infra-red detectable"
IS	Insertionssequenz
k	Kilo
KG	Kommanditgesellschaft
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
l	Liter
LB	„Luria Bertani"
m	Milli (10^{-3}); Meter
M	Molar (mol/l)
max.	Maximal
MES	„Pufferan"
min	Minute(n)
MLS	Makrolid-Lincosamid-Streptogramin
mod.	modifiziert
mol	Mol(e) ($6{,}023 \times 10^{23}$)

mRNA	„messenger”-RNA
n	Nano (10^{-9}); Anzahl
NAD+	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat
NCIMB	„National Collection of Industrial and Marine Bacteria“
Neo	Neomycin
NTA	Nitrilotrichloressigsäure
OD_x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ori	„origin of replication”
p	Pico (10^{-12});para ;Plasmid
P	Promoter
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	„Polymerase chain reaction”
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	Piperazin-N-N'-bis-[2-Ethan-Sulfonsäure]
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prof.	Professor
R	Elektrischer Widerstand
^{r}	Resistent
R.	*Rhodospirillum*
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
s	Seite
s.o.	Siehe oben
SAP	„Shrimp alkaline phosphatase”
SDS	Natriumdodecylsulfat
St.	Sankt
T	Thymin; Temperatur
t	Zeit
TAE	TRIS-Acetat-EDTA

TB	„Terrific broth”
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
T_m	Mittlere Schmelztemperatur
TM	„Trademark“; Warenzeichen
TRIS	Tris-hydroxyl-aminomethan
U	„Units” = internationale Enzymaktivitätseinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
USA	„United States of America”
UV	Ultraviolett
V	Volt; Spannung
v	Volumen
Vers.	Version
Vol.	Volumen
w	„weight” = Gewicht
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galactosid
YTG	„Yeast Tryptone Glucose“
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

1 Einleitung

Krebs gilt mittlerweile in den Industrienationen als zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Dies ist als direkte Folge des steigenden Lebensalters zu sehen. Alleine im Jahr 2000 sind weltweit 10 Millionen Neuerkrankungen registriert worden und 6 Millionen Menschen an Krebs gestorben, was ca. 12 % aller Verstorbenen in diesem Jahr entspricht (http://www.who.int/cancer/en/). Trotz dieser erschreckenden Zahlen bedeutet die Diagnose Krebs heutzutage nicht in allen Fällen ein Todesurteil.

Das wichtigste bei jeder Art von Krebsbehandlung ist die Früherkennung. Wird der Krebs rechtzeitig diagnostiziert, stehen den behandelnden Ärzten viele Möglichkeiten zur Verfügung, um erfolgreich einen Tumor zu bekämpfen. Zu den Therapieformen für Krebs gehören neben der klassischen Chirurgie auch Strahlentherapie und Chemotherapie. Bei der Chirurgie wird versucht, durch Operation das betroffene Gebiet weitläufig zu entfernen und somit ein Weiterwachsen des Tumors zu beenden. Der Nachteil liegt hierbei darin, dass Metastasen nicht erreicht werden und immer das Risiko besteht, dass krankes Gewebe im Körper verbleibt. Die Strahlentherapie bietet die Möglichkeit, ohne Operation gezielt einen Tumor zu schädigen und die Tumorzellen zu zerstören. Nachteilig hierbei ist, dass nicht alle Tumore gezielt bestrahlt werden können und die Chance, dass ansonsten gesundes Gewebe geschädigt wird, sehr hoch ist. Dieselbe Problematik ist auch bei der Chemotherapie zutreffend. Hierbei werden dem Patienten Cytostatika injiziert, die das Wachstum der Tumore verhindern sollen. Das Problem hierbei ist, dass es schwer ist, diese Wirkung nur auf Tumore zu begrenzen und Patienten häufig unter den schweren Nebenwirkungen zu leiden haben. In den letzten Jahrzehnten sind aufgrund des raschen Fortschritts in der Molekularbiologie viele neue Methoden entwickelt worden, die klassischen Methoden zu ergänzen und den Problemen der Resistenzbildung gegen Chemo- und Strahlentherapie zu begegnen.

Eine dieser Methoden ist die Verwendung von Bakterien, um Tumore zu behandeln, welche durch die anderen Methoden nicht ausreichend therapiert werden können. Insbesondere Tumore mit nekrotisierendem Kern und damit hypoxischem Gewebe bieten die Möglichkeit, durch diese Methoden behandelt zu werden. Tumore stellen das einzige Gewebe im menschlichen Körper dar, welches über einen hypoxischen Bereich verfügt. Aufgrund dieser Tatsache kann man gezielt anaerobe Bakterien verwenden, um diese Tumore zu besiedeln. Zu den verschiedenen dabei verwendeten Bakterien gehören Spezies der Gattung Salmonella und

Bifidobacteria und die in dieser Arbeit Verwendung gefundenen Clostridia (JAIN und FORBES, 2001). Gegenüber den anderen Bakterien bieten die Clostridien den großen Vorteil, dass sie Endosporen bilden können. Somit ist es möglich, gezielt diese Dauerformen in den Patienten zu injizieren und die Sporen keimen, wie in Studien gezeigt, nur in hypoxischen Geweben aus (MOESE et. al., 1959). Diese Spezifität für Tumorgewebe macht sie zum idealen Träger von neuen Antitumormitteln (MINTON, 2003). Der onkolytische Effekt dieser Bakterien auf den Tumor alleine ist aber noch nicht ausreichend, um eine Heilung des Patienten zu bewirken. Daher werden weltweit große Anstrengungen unternommen, die Bakterien genetisch so zu verändern, dass sie eine gezielte Therapie ermöglichen. Die verschiedenen Ansätze umfassen neben vielen anderen Methoden die in dieser Arbeit verwendete CDEPT (Clostridial-directed enzyme-prodrug therapy) und der Verwendung von bakteriellen Toxinen.

Bei der CDEPT (MINTON et al., 1995) werden dem Patienten Sporen von rekombinanten Clostridien injiziert, welche dann im Tumorgewebe auskeimen sollen und eine vollständige Besiedelung des Tumors gewährleisten (Abb. 1). Diese Clostridien sollen dann gezielt, bestimmte Enzyme in das Tumorgewebe abgeben, welche die Aktivierung von Arzneimitteln katalysieren sollen. Für den Patienten harmlose Vorstufen von Arzneimitteln („Prodrugs“) werden in die Blutbahn des Patienten injiziert und werden somit in den Tumor transportiert. Dort sollen sie durch die rekombinanten Enzyme in ihre aktive Form überführt werden. Der Vorteil gegenüber der Chemotherapie liegt darin, dass die Wirkung dieser Arzneimittel im sehr begrenzten Umfeld des Tumors entfaltet wird. Dadurch können zum einen die Nebenwirkungen der Chemotherapie reduziert und zum anderen sehr viel höhere Dosen des Wirkstoffs eingesetzt werden.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden ob *Clostridium acetobutylicum* über ein funktionierendes Cytochrom P_{450}-System verfügt und es sollten rekombinante Sporen des Stammes hergestellt werden. Diese rekombinanten Sporen sollten das Enzym CYP2BI (Cytochrom P_{450} 2BI) aus *Rattus norvegicus* tragen und gezielt in das Tumorgewebe abgeben. CYP2BI katalysiert eine Monooxygenase Reaktion, die dafür notwendigen Elektronen werden durch eine NADPH-Reduktase bereitgestellt und auf ein Cytochrom b5 übertragen. Innerhalb des Tumors sollte dieses eukaryotische Enzym die Aktivierung der „Prodrugs“ Iphosphamid und Cyclophosphamid (CREAVEN et al., 1976) katalysieren. Der fehlende Elektronendonor und Überträger sollten entweder durch den Organismus selbst oder durch das Einbringen weiterer Gene in den rekombinanten Stamm gewährleistet werden.

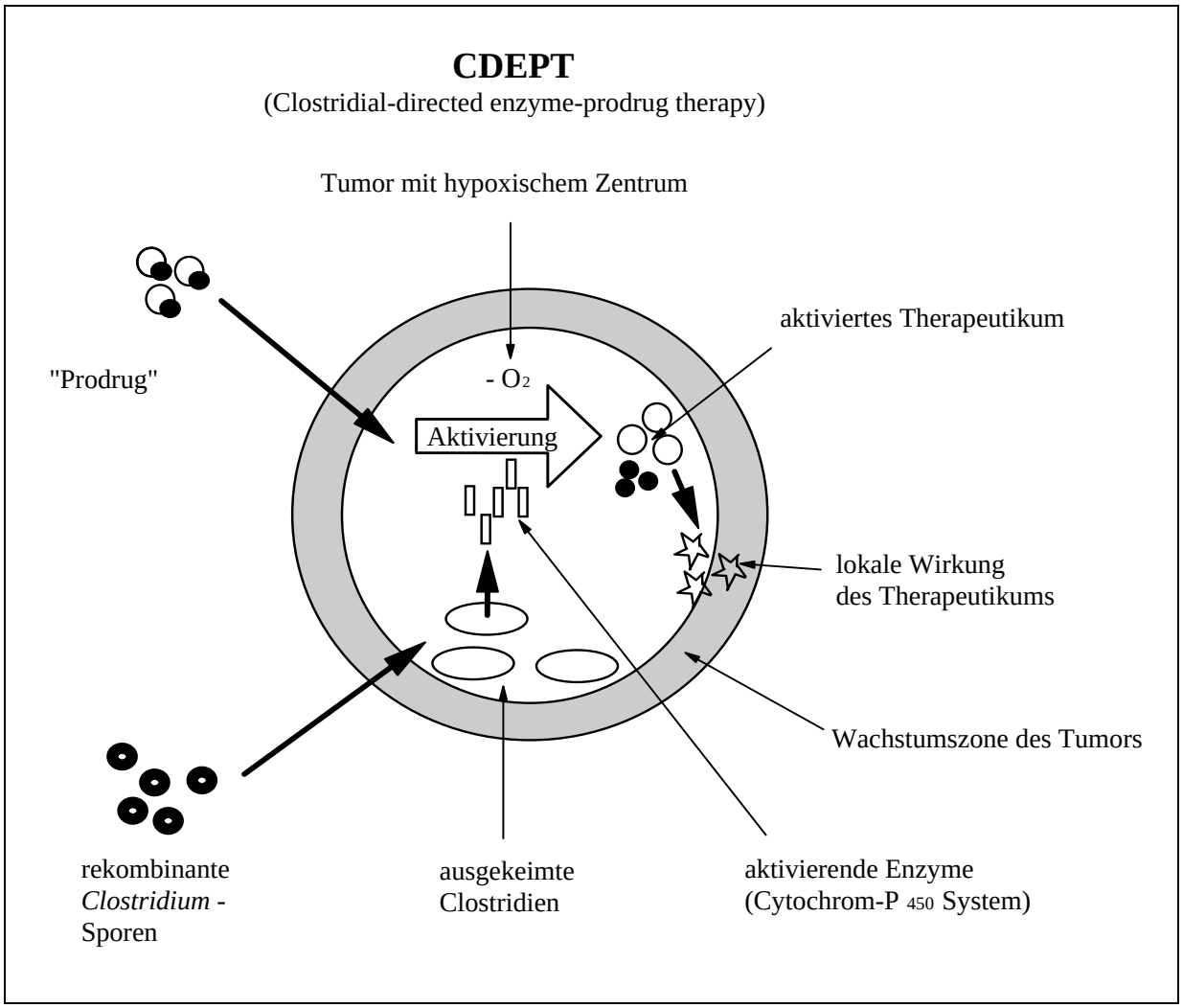


Abbildung 1: Schematische Darstellung der CDEPT. In grau dargestellt ist der Wachstumsbereich des Tumors.

Trotz aller Fortschritte im Bereich der Tumortherapie gibt es Krebserkrankungen, die gar nicht oder nur sehr schlecht behandelt werden können. Zu diesen gehört das Pankreaskarzinom. Die einzige bekannte Möglichkeit der Heilung besteht in der operativen Entfernung der Bauchspeicheldrüse und einem Grossteil des umliegenden Gewebes (WHIPLLE, 1949). Dieser massive Eingriff ist aber nur möglich bei einer frühzeitigen Diagnose, welche durch die mangelnde Zugänglichkeit und die wenigen Symptome des Tumors im Anfangsstadium erschwert wird. Somit bleibt in den meisten Fällen nur eine palliative Behandlung des Patienten. Nach 5 Jahren liegt die Überlebensrate bei dieser Tumorart bei 3-5 Prozent. Aufgrund der Lage des Tumorgewebes im Bauchfell der Patienten ist eine Bestrahlung nur sehr schlecht möglich und bislang untersuchte Formen der Chemotherapie erwiesen sich als nur bedingt wirksam. Mit neuen molekularbiologischen

Methoden erhofft man, eine Möglichkeit der Behandlung für diesen Tumor zu finden. In dieser Arbeit sollte eine solche Methode entwickelt werden.

Bei Untersuchungen von Pankreaskarzinomzellen wurde festgestellt, dass die Bildung bestimmter Rezeptoren der „Tight-junction“ bei diesen Zellen bis zu 1000fach erhöht ist (MICHL et al., 2001). Diese Claudin-3- und Claudin-4-Rezeptoren wurden in früheren Arbeiten als Zielpunkte für das Anheften des Enterotoxins von *Clostridium perfringens* (CPE) ermittelt (KATAHIRA et al., 1997). *C. perfringens* ist einer der Auslöser für Lebensmittelvergiftungen und besitzt neben diesem Enterotoxin noch weitere 13 Toxine, die unter anderem für die Symptome bei Wundinfektionen wie Gasbrand verantwortlich sind (ROOD, 1998). Das Toxin wird in der Mutterzelle bei der Sporulation gebildet (DUNCAN, 1973) und bei der Lysis der Zelle in die Umgebung abgegeben. Bei der Aufnahme nicht genügend erhitzter Speisen können die Sporen in den Darm gelangen und dort auskeimen. Bei der Sporulation setzten sie dann das Toxin frei und dieses führt aufgrund seiner Wirkung zu Diarrhö und krampfartigen Schmerzen. Der Wirkungsmechanismus basiert hierbei auf einer Anheftung der 35-kDa-Toxinmoleküle an die Claudin-4-Rezeptoren der „Tight- Junction“ von Dünndarmepithel-Zellen. Das Anheften mehrerer Toxinmoleküle führt zur Ausbildung eines Porenkomplexes mit 155 kDa (WNEK und MCCLANE, 1989) und damit zu einer erhöhten Permeabilität der Membran. Durch diese Schädigung kommt es zum Flüssigkeitsaustritt und somit zum Kollaps der Zelle (MCDONEL und DORNER, 1986). Bereits kleine Mengen des Toxins können ausreichen, um einen weiteren Weg der Zellschädigung einzuleiten. Durch die Poren können Ca^{2+}-Ionen einströmen, dadurch kann die natürliche Apoptose der eukaryotischen Zelle initiiert werden und somit kommt es zum Absterben der Zelle (CHAKRABARTI et al., 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, einen rekombinanten Clostridienstamm zu erzeugen, der das Toxin sporulationsunabhängig produziert und in das umgebende Medium abgibt. Das Toxin sollte in großer Menge produziert werden, und der verwendete Stamm sollte keine weiteren Pathogenitätsfaktoren aufweisen. Als Modellorganismus wurde *C. acetobutylicum* verwendet. Um das Ausschleusen des rekombinant hergestellten Toxins zu gewährleisten sollte es durch das Anheften verschiedener Signalpeptidsequenzen modifiziert werden. Um eine Unabhängigkeit der Toxinexpression von der Sporulation zu gewährleisten, sollten verschiedene clostridielle Promotoren auf ihre Verwendbarkeit getestet werden. Das rekombinant hergestellte Toxin sollte anschließend quantifiziert und auf seine Cytotoxizität getestet werden. Die Theorie zu diesem in Abbildung 2 dargestellten Modell, sollte

letztendlich im Tierversuch bestätigt werden.

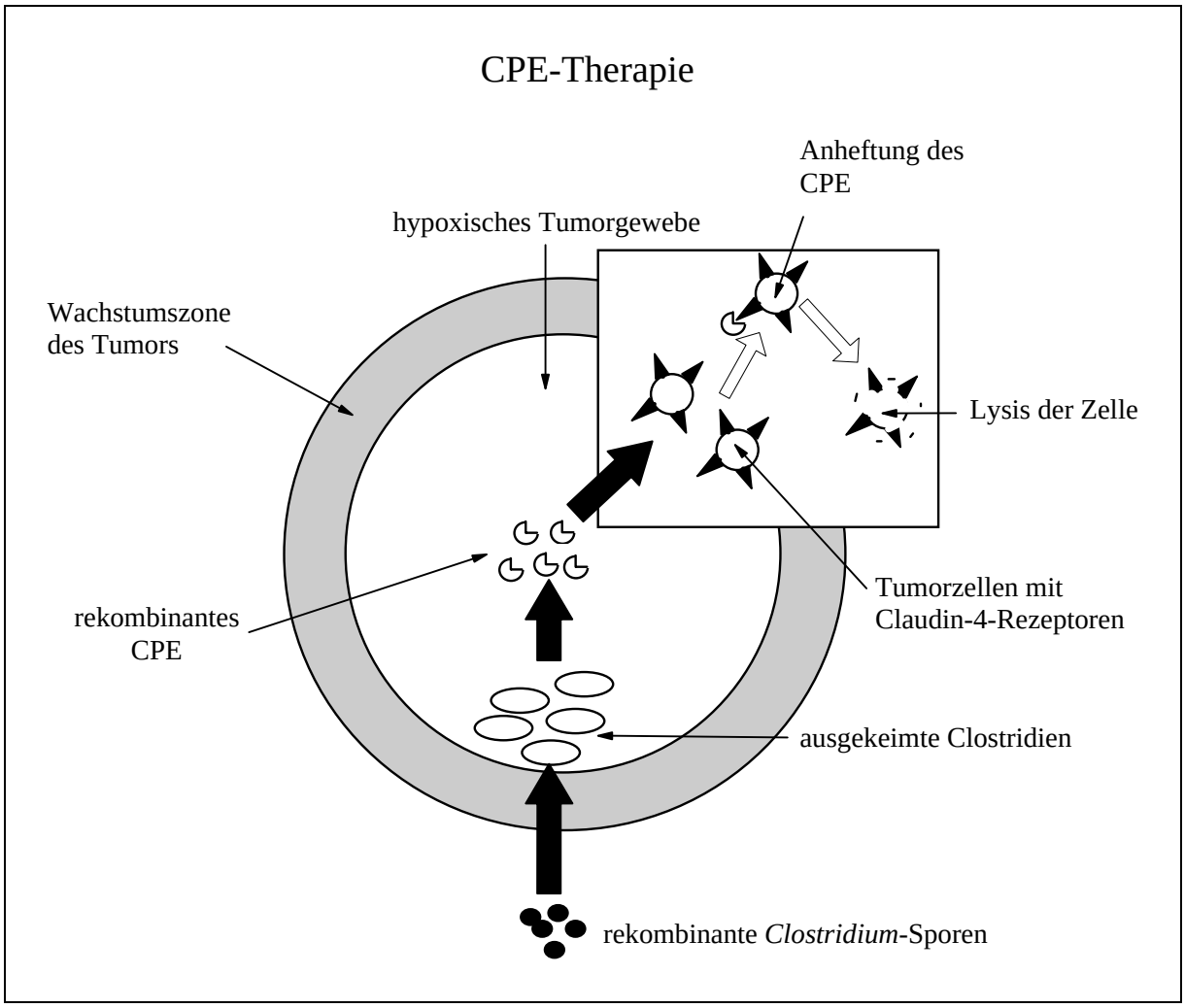


Abbildung 2: Schematische Darstellung der CPE-Therapie. In grau dargestellt ist der Wachstumsbereich des Tumors. In der Vergrößerung ist vereinfacht die Wirkung des Toxins auf vegetative Tumorzellen dargestellt.

In einem weiteren Aspekt dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der zentrale Regulator der Sporulation in Clostridien, Spo0A, einen direkten Einfluss auf die Regulation des *cpe*-Gens besitzt. Sequenzvergleiche der gut untersuchten Promoterregion (MELVILLE et al., 1994) des Gens zeigen, dass Bindemotive für Spo0A vorhanden sind. In Gelretardations-Experimenten sollte untersucht werden, ob gereinigtes, rekombinant hergestelltes Spo0A, in seiner phosphorylierten Form daran binden kann.

Bei Sequenzanalysen des Genoms von *C. acetobutylicum* (NÖLLING et al., 2001) wurden zwei hintereinander liegende Gene entdeckt, die Homologien zu Toxin-Genen aus

C. botulinum aufweisen. Die Gene *cac*0338 und *cac*0339 kodieren möglicherweise für eine Mono-ADP-Ribosyltransferase und eine ADP-Ribosylglycohydrolase. Das Übertragen von ADP-Ribosylresten kann einen toxischen Effekt oder einen regulatorischen Einfluss ausüben. Die ermittelte räumliche Nähe der beiden Gene spricht für eine Operonstruktur. In dieser Arbeit sollte die Funktion und die genetische Organisation dieser Gene untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Gase, Chemikalien und Geräte

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Riedel de Häen AG (Seelze), Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG (Heidelberg)oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen und besaßen mindestens p. a.-Qualität. Die Gase für die Begasung der Kulturmedien wurden von der Firma MIT Industriegase AG (Elchingen) geliefert.

Spezielle Chemikalien, Enzyme und Produkte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Abott GmbH; Wiesbaden:

Clarithromycin

Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg

„GFX™ *Micro* Plasmid Prep. Kit"

Appligene Oncor; Heidelberg:

AquaPhenol™; ReadyRed™

Biomers.net GmbH; Ulm

Oligonukleotide

Biomol Feinchemikalien GmbH; Hamburg:

Lysozym

Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe:

IPTG; Roti®-Phenol

Invitrogen GmbH; Karlsruhe:

Agarose; TEMED; Oligonukleotide

MBI Fermentas GmbH; St. Leon-Rot

dNTP; SAP; Taq-DNA-Polymerase; PEG 4000; Restriktionsendonukleasen; "High Fidelity"-*Taq*-DNA-Polymerase (5 U/ µl); T4-DNA-Ligase (1 U/ µl)

Millipore GmbH; Schwalbach

Microcon® YM-100 „Centrifugal Filter Units"

Centricon® YM-100 „Centrifugal Filter Units"

Centricon® YM-50 „Centrifugal Filter Units"

Centricon® YM-30 „Centrifugal Filter Units"

Millipore „VS" Membranfilter, Porengröße 0,025 mm

MWG Biotech AG; Ebersberg:

Oligonukleotide; IRD_{800}-markierte Oligonukleotide

New England Biolabs GmbH; Schwalbach:

Restriktionsendonukleasen

Perbio Science Deutschland GmbH; Bonn:

„BCA Protein Assay Kit"

Qiagen GmbH; Hilden:

„RNeasy Mini Kit"

Roche Diagnostics GmbH; Mannheim:

Ampicillin; Kanamycin; Proteinase K; Rifampicin; Thiamphenicol; Anti-DIG-Fab-Fragment; ATP; CSPD®

Sartorius AG; Göttingen:

Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)

Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg:

Chloramphenicol

Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen:

Erythromycin; Tetracyclin-Hydrochlorid; Kanamycin

USB Corporation; Cleveland, Ohio, USA vertrieben durch Amersham Biosciences Europe GmbH

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

2.2 Geräte und Materialien

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte und Materialien sind in der folgenden Tabelle alphabetisch aufgelistet:

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller / Bezugsquelle
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Werkstatt der Universität Ulm
Autoklav	H+P Labortechnik GmbH; Oberschleißheim

Autoklav	ZIRBUS technology GmbH; Bad Grund
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Einmalküvetten (1/2 Mikro; 1,6 ml)	VWR International GmbH; Darmstadt
Eismaschine (Scotsman AF-20)	Scotsman Ice Systems Frimont S.p.a.; Mailand; Italien
Electrophoresis Power Supply (EPS 601)	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg
Electrophoresis Power Supply (ST 606)	Gibco BRL Life Technologies; Eggenstein
Elektroporationsgerät (Gene-Pulser® II)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Elektroporationsküvetten	Biozym Scientific GmbH; Oldendorf
ELISA Lesegerät SLT Spectra	SLT-Labinstruments; Salzburg, Austria; Software: Synelis
Feinwaage (AE 16S)	Mettler-Toledo GmbH; Gießen
FRENCH® Pressure Cell / Press	G. HEINEMANN Ultraschall- und Labortechnik; Schwäbisch Gmünd
Heizblock (Thermoblock 1.0)	Störk GmbH & Co. KG; Stuttgart
Heizpilz (2l)	Isopad GmbH; Heidelberg
Inkubationsschüttler (G24 Environmental Incubation Shaker)	New Brunswick Scientific GmbH; Nürtingen
Inkubationsschüttler (HF)	Infors AG; Bottmingen, Schweiz
Kühlregal	Sümak GmbH; Stuttgart
Kühlschrank	Liebherr-Holding GmbH; Biberach an der Riß
Magnetrührer (MR 2000)	Heidolph Instruments GmbH; Schwabach
Mikrotiterplatten (Microtiter® System)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
Mikrotiterplattenphotometer (htIII)	Anthos Mikrosysteme GmbH; Krefeld
Mikroskop (Axioskop)	Carl Zeiss AG; Oberkochen
Mikrowellengerät (Moulinex OPTIQUICK)	SAMOU GmbH; Radolfzell
PCR-Maschine (PTC-200® Peltier Thermal Cycler)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
PCR-Maschine (Techne)	Labtech International; Burkhardtsdorf
pH-Meßgerät (WTW pH 521)	Wissenschaftliche-Technische Werkstätten; Weilheim

Phosphoimager FUJIX BAS 1000	Raytest GmbH; Staubenhardt
Photodokumentationsanlage	MWG Biotech GmbH; Ebersberg
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer	Biometra GmbH i. L.; Göttingen
Reagenzglasschüttler (REAX 2000)	Heidolph Instruments GmbH; Schwabach
Reinstwasseranlage (Elgastat Maxima)	USF Deutschland GmbH; Ransbach-Baumbach
Ribolyser	Hybaid GmbH; Heidelberg
Schüttelgerät (Heidolph REAX 2000)	Heidolph Instruments GmbH; Schwabach
Spektralphotometer (Ultrospec® 3000)	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg
Sterilfilter	SARSTEDT AG & Co.; Nümbrecht
Tiefkühlschrank (-20 °C)	Liebherr-Holding GmbH; Biberach an der Riß
Tiefkühlschrank (-70 °C)	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Tischzentrifuge (Biofuge *pico*)	Kendro Laboratory Products GmbH; Langenselbold
Ultrazentrifuge (L8-60M)	Beckman Coulter GmbH; Krefeld
Ultraschall (Sonifier W-250)	Branson Ultraschall, Niederlassung der Emerson Technologies GmbH & Co. OHG; Dietzenbach
UV-Schirm	ehemals Bachhofer; Reutlingen
Vakuumzentrifuge (SpeedVac Concentrator SVC 100H)	Savant Instruments; Farmingdale N.Y., USA; jetzt Thermo electron corporation; Cheshire; England
Waage (BP8100)	Sartorius AG; Göttingen
Wasserbad	GFL; Burgwedel
Wasserbad mit Pumpe (an Photometer angeschlossen)	MWG Biotech GmbH; Ebersberg
Western Blot Apparatur (Fastblot Typ B 33)	Whatman Biometra, Biometra GmbH i. L., Göttingen
Zentrifuge (SK 30)	Sigma Laborzentrifugen GmbH; Osterode am Harz
Zentrifuge (ZK 401)	Hermle Labortechnik; Wehingen

2.3 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2 folgenden Bakterienstämme verwendet.

Tabelle 2: Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Geno- oder Phäno-typ*	Herkunft/ Referenz
Clostridium acetobutylicum DSM 792	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
Clostridium perfringens (Typ A) DSM 11784	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
Clostridium sporogenes AL NCIMB 10696	Wildtyp	NCIMB Ltd., Aberdeen, Schottland
Escherichia coli BL 21(DE3)	F'*ompT*, *hsdS*$_B$($r_B^- m_B^-$), *gal*, *dcm* (DE3)	Novagen R&D Systems, Wiesbaden
ER 2275	*trp*-31, *his*-1, *tonA2*, *rpsL*104, *supE*44, *xyl*-7, *mtl*-2, *metB*1, e14$^-$, Δ(*lac*)*U*169, *endA*1, *recA*1, R(zbgZ10::Tn*10*)Tc^s, Δ(mcr-hsd-mrr)114::1510, [F', *proAB*, *lacI*^{q}ZΔM15 zzd::mini Tn*10*(Km^r)]	Prof. Dr. E.T. PAPOUTSAKIS, Northwestern University, Evanston, USA
JM 109	*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *subE*44, *relA*1, Δ, Δ(*lac-proAB)*, [F', *traD*36, *proAB*, *lacI*^{q}ZΔM15]	YANISCH-PERRON et al., 1985
Escherichia coli XL1-Blue MRF'	Δ(*mcrA*)183, Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA*1, *supE*44, *thi*-1, *recA*1, *gyrA*96, *relA*1, [F', *proAB*, *laqI*^{q}ZΔM15, Tn10(Tc^r)]	Stratagene GmbH, Heidelberg

Stamm	Relevanter Geno- oder Phäno-typ*	Herkunft/ Referenz
DH5α	F', *mcrAΔ-(mrr hsdRMS-mcrBC), φ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, λ-, rspL, endA1, nupG*	HANAHAN, 1983
CA434	*hsdS* (rB^-mB^-) *supE44 thi-1 recAB ara-14 leuB5proA2 lacY1 galK rpsL20* (str^R) *xyl-5 mtl-1* (pACYC184::Sau5) mit konjugativen Plasmid R702 (Tc^R , Sm^R , Su^R , Hg^R, Tra+, Mob+)	PURDY et al., 2002

*)Für die Genotyp-Bezeichnungen siehe Berlyn et al., 1996.

2.4 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde die in Tabelle 3 folgende Zelllinie verwendet.

Tabelle 3: Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenzen/ Herkunft
CAPAN1	Menschliche	DSMZ, Braunschweig
ACC 244	Pankreaskarzinomzelllinie	(FOGH et. al., 1977)

2.5 Zellanzucht

2.5.1 Nährmedien

Alle aufgeführten Medien wurden in speziell aufgereinigtem Wasser (Elgasat Maxima; USF Deutschland GmbH; Ransbach-Baumbach) gelöst. Nach dem Ansetzen der Flüssigmedien erfolgte eine Überprüfung des pH-Wertes. Zur Herstellung von Festmedien wurde den Lösungen Agar in einer Konzentration von 1,5 % (w/v) zugegeben. Anschließend wurden die Medien bei 121 °C und einem Druck von 1,2 bar für mindestens 20 Minuten autoklaviert.
Medien für anaerobe Kulturen wurden aufgekocht, um gelösten Sauerstoff aus dem Medium

zu entfernen, und während der Abkühlung mit N_2 begast. Anschließend wurde das Medium luftdicht verschlossen und die verbleibende Gasphase mittels eines Vakuums abgezogen und durch N_2 ersetzt. Zur Kontrolle des Sauerstoffgehaltes wurde dem Medium ein Redox-indikator (Resazurin, 1 mg / ml) zugegeben. Anaerobe Agarplatten wurden in der Anaeroben-Kammer gegossen und zum Aushärten zwei Tage stehen gelassen. Alle Medienplatten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Medien „LB“, „SOB“ und „TB“ wurden für *E. coli* benötigt, während die Medien „2× YTG“, „CB“ und das phosphatlimitierte Medium „MES“ anaerobisiert und für *C. acetobutylicum* eingesetzt wurden.

2.5.1.1 2fach YTG 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	

2.5.1.2 LB-Medium (SAMBROOK et al., 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	

2.5.1.3 TB-Medium (TARTOF and HOBBS, 1988)

Trypton	12 g	1,2 % (w/v)
Hefeextrakt	24 g	2,4 % (w/v)
Glycerin	4 ml	54,7 mM

Die Medienbestandteile wurden mit H_2O auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Anschließend wurde das Medium mit 100 ml einer sterilen KH_2PO_4-Lösung (170 mM KH_2PO_4 / 720 mM K_2HPO_4) auf 1000 ml ergänzt.

2.5.1.4 Phosphatlimitiertes Minimalmedium, MES-gepuffert (BERTRAM et al., 1990)

Glucose × H_2O	40 g	202 mM
MES	21,3 g	100 mM
$(NH_4)_2SO_4$	2 g	15,1 mM
K_2HPO_4	100 mg	0,7 mM
$MgSO_4$ × 7 H_2O	100 mg	0,4 mM
$FeSO_4$ × 7 H_2O	15 mg	54,0 µM
$MnSO_4$ ×H2O	15 mg	88,7 µM
NaCl	10 mg	170,0 µM
$CaCl_2$ × 2 H_2O	10 mg	68,0 µM
Na_2MoO_4 × 2 H_2O	10 mg	41,3 µM
Thiamin-HCl	2 mg	5,9 µM
p-Aminobenzoesäure	2 mg	16,0 µM
Biotin	100 µg	0,4 µM
H_2O	ad 1000 ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt und betrug nach dem Autoklavieren zwischen 6,8 und 6,9.

2.5.1.4 CB-Medium (O`BRIEN und MORRIS, 1971)

Glucose × H_2O	10 g	50,0 mM
Casein Hydrolysat	4 g	0,4 % (w/v)
KH_2PO_4	500 mg	3,7 mM
K_2HPO_4	500 mg	2,9 mM
L-Cystein-HCl × H_2O	250 mg	1,4 mM
$MgSO_4$ × 7 H_2O	200 mg	0,8 mM
$MnSO_4$ × H_2O	10 mg	59,0 µM
$FeSO_4$ × 7 H_2O	10 mg	36,0 µM
Thiamin-HCl	2 mg	5,9 µM
p -Aminobenzoesäure	2 mg	16,0 µM
Biotin	100 µg	0,4 µM
H_2O	ad 1000 ml	

Der pH-Wert wurde mit 6 M HCl auf 6,9 eingestellt.

2.5.1.5 SOB-Medium (SAMBROOK et al., 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
$MgCl_2$ × 6 H_2O	2,03 g	10 mM
$MgSO_4$ × 7 H_2O	2,44 g	10 mM
H_2O	ad 1000 ml	

Die Medienkomponenten $MgSO_4$ und $MgCl_2$ wurden getrennt von den übrigen Bestandteilen autoklaviert und nach dem Abkühlen den übrigen Komponenten zugegeben.

2.5.2 Zellkulturmedium

Die in den Cytotoxizitätstests verwendeten CAPAN1 (Pankreaskarzinom)-Zellen wurden in

D-MEM Medium (Life Technologies, Inc., Karlsruhe) mit 10 % FCS (Fötales Rinderserumalbumin, Life Technologies, Inc., Karlsruhe) bis zu einer Konfluenz von 80 % gezogen.

2.5.3 Medienzusätze

Alle Medienzusätze wie Antibiotika, IPTG und X-Gal wurden erst sterilfiltriert, dann aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Kulturmedien wurden für mindestens 20 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert. Zusätze wurden nach dem Abkühlen auf mindestens 50 °C zugegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze sind in den Tabellen 4-6 aufgeführt.

Tabelle 4: Medienzusätze

Substanz	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]
IPTG	24 (H_2O)	12-48
X-Gal	20 (Dimethylformamid)	40

Tabelle 5: Antibiotika zur Kultur rekombinanter *E. coli*-Stämme

Substanz	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]
Ampicillin, Na-Salz	100 (H_2O)	100
Chloramphenicol	35 (Ethanol, 96 % (v/v))	35
Erythromycin	25 (Ethanol, 50 % (v/v))	250
Spectinomycin	80 (H_2O)	80
Tetracyclin-HCl	20 (H_2O)	20
Kanamycin	50 (H_2O)	50

Tabelle 6: Antibiotika zur Kultur rekombinanter *C- acetobutylicum* Stämme

Substanz	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml]
Clarithromycin	5 (H_2O)	5
Thiamphenicol	20 (H_2O)	20

Clarithromycin wurde in mit HCl angesäuertem Wasser suspendiert, der pH-Wert nach dem Lösen des Antibiotikums mit NaOH auf 6,5–7 eingestellt.

2.5.4 Stammhaltung

Die Stammhaltung der verwendeten *E. coli*-Stämme erfolgte, indem 0,5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 50 % sterilem Glycerin (v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert wurden.

Zur Herstellung von Stammkulturen von *C. acetobutylicum* wurden logarithmisch wachsende Kulturen anaerob auf 2x YTG-Platten ausgestrichen und mehrere Tage bei 37 °C inkubiert. Die sich bildenden typischen „Sporenhütchen“ wurden unter anaeroben Bedingungen mit 1 bis 2 ml frischem 2x YTG-Medium abgeschwemmt und in Schraubdeckelröhrchen bei -20 °C aerob aufbewahrt.

Alternativ wurde eine 50-ml-MES-Medium (s.o.)-Kultur mehrere Tage bei 37 °C inkubiert und dann zentrifugiert. Das Sediment wurde mit sterilem PBS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in frischem PBS-Puffer gelöst und aerob bei -20 °C gelagert.

2.5.5 Anzuchtbedingungen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte standardmäßig in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium. Bei größeren Volumina wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C auf einem Rundschüttler bei 150-200 upm.

Sporen von *C. acetobutylicum* wurden mit einem Hitzeschock (10 min, 80 °C) reaktiviert und in anaerobes Medium injiziert. Die Zellen von *C. acetobutylicum* wurden bei 37 °C anaerob in Volumina bis 5 ml in Hungate-Röhrchen (Bellco Glass Inc.; Vineland; USA) mit Butylstopfen und Schraubdeckeln kultiviert. Größere Volumina wurden in 125-ml-, 500-ml- und 1000-ml-Müller-Krempel-Flaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) mit Naturgummi-Stopfen und Edelstahldeckel angezogen. Aufgrund der starken Gasentwicklung durch *C. acetobutylicum* (H_2 und CO_2) wurden die Gefäße nur bis zur Hälfte befüllt. Beim Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase wurden die Kulturflaschen mit einer Kanüle versehen, welche einen Druckausgleich gewährleistete.

2.5.6 Bestimmung von Wachstumsparametern

2.5.6.1 Messung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen erfolgte in 1 ml Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Leerwert. Um die Linearität der Messwerte zu gewährleisten, wurde bei Werten über 0,3 die Probe mit sterilem Medium verdünnt.

2.5.6.2 Messung des externen pH-Werts

Um den pH-Wert von Kulturüberständen zu bestimmen, wurde ein Präzisions-pH-Meter verwendet. Um sicher zu gehen, dass die Elektrode nicht verschmutzte, wurden 2 ml der Kultur 5 Minuten bei 13.400 × g zentrifugiert und der Überstand in ein Reagenzglas überführt.

2.6 Sporenfärbung

Um Sporen von Clostridien sichtbar zu machen, wurde ein hitzefixierter Ausstrich auf einem Objektträger mit 5 % wässriger Malachitgrün-Lösung (w/v) überdeckt und solange über einer leuchtenden Bunsenbrennerflamme erhitzt, bis ein aufsteigender Dampf zu sehen war. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass die Malachitgrün-Lösung weder kochte noch eintrocknete. Die Malachitgrün-Lösung wurde dann unter fließendem Wasser abgespült, wobei die vegetativen Zellen entfärbt wurden. Die vegetativen Zellen wurden mit Safranin-lösung (250 mg in 10 ml Ethanol gelöst) für 5 min gegengefärbt. Die Färbelösung wurde mit Wasser abgespült und der Objektträger getrocknet. Die Auswertung erfolgte im Hellfeldmikroskop. Sporen erschienen grün gefärbt und vegetative Zellen rot.

2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.7.1 Oligodesoxynukleotide und Plasmide

Alle für diese Arbeit benötigten Oligodesoxynukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech AG, Ebersberg, Biomers.net GmbH, Ulm, oder der Invitrogen GmbH, Karlsruhe, bezogen. Die Oligodesoxynukleotide sind mit Name, Sequenz und errechnetem Schmelzpunkt (Tm) in Tabelle 7 aufgeführt. Bei der Synthese wurden einigen Oligodesoxynukleotiden gezielt Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingefügt, diese sind in kursiver Schrift gekennzeichnet.

Tabelle 7: Oligodesoxynukleotide

Name	Sequenz	Tm [°C]
41-Salstop	5`- aggc*gtcgac*ggatcaccgagctgagaagc-3`	73,6
41vPAE-r	5`- acat*gcatgc*cgggcacctggctgcc -3`	72,7
41vRBS-f	5`- cgg*gtcgac*taaggagtgaattcatggctcc -3`	70,8
41vRBS2-f	5`- cgg*gtcgac*taaggaggtgaattcatggctcc -3`	72,1
41v-rstop	5`- acat*gcatgc*ggatcaccgagctgagaagc -3`	70,9
M13 seq	5`- gtaaaacgacggccagt -3`	52,9
M13 reverse seq	5`- caggaaacagctatgac -3`	50,4
cyprt-f	5`- cgcttaatggggcaaagg -3`	56
cypRT-r	5`- cagcaggcatttgctgtcc -3`	58,8
Orf5sig-f	5`- ggc*gtcgac*atgaatttattaaatctttttac -3`	61,8
Orf5sig-r	5`- ggc*ctgcag*ggatccgcttgtcacagctttgttaag -3`	74
Orf5sig-r2	5`- ggc*ctgcag*tctagagcttgtcacagctttgttaag -3`	71,7
CPE-bam-r	5`- cgc*ggatcc*ttaaaatttttgaaataatattgaataaggg -3`	65,3
CPE-bam-f	5`- cgc*ggatcc*atgcttagtaacaatttaaatcc -3`	65,6
Orf5sig-rsal	5`- ggc*gtcgactctaga*gcttgtcacagctttgttaag -3`	71,7
Orf5sig-rHind	5`- ggc*aagctttctaga*gcttgtcacagctttgttaag -3`	69,5
Cpe-xba-f-5-3	5`- cgc*tctaga*atgcttagtaacaatttaaatcc -3`	63,1
Cpe-xba-r-5-3	5`- cgc*tctaga*ttaaaatttttgaaataatattgaataaggg -3`	63,3
Cpe-int-f-sal1	5`- cca*gtcgac*atacatacgcagggttagag -3`	68,1
Cpe-int-r-pst1	5`- gct*ctgcag*gcattttcgaacaccattgg -3`	68,1

Cpe-xho-xba-rev2	5`- cgc*tctagactcgag*ctattaaaatttttgaaataatattgaataagg -3`	67,7
Cpe-ecor1-for	5`- cgc*gaattc*atgcttagtaacaatttaaatcc -3`	53
Ermc-xho-f	5`- gcg*ctcgag*gtgaatgcgcaaaagacataatcg -3`	51
Cyp-10-seq-rev	5`- cgggcctcttcgctattacgccagc -3`	59
Cyp-10-seq-for	5`- agctcactcattaggcaccccaggc -3`	58
Cyp2b-pc3-r-xbaI	5`- gcg*tctaga*tcaccgagctgagaagcagatctgg -3`	55
Cyp-pc3-f-xbaI	5`- cgc*tctaga*atggagcccagtatcttgctcc -3`	54
Ermc-xho-rev	5`- cgc*ctcgag*tgtgctctacgaccaaaagtataaaacc -3`	62
Primer-ADP-for	5`- gcg*ggatcc*taattttaaagaaaagtatccgg -3`	65,6
Primer-ADP-rev	5`- gcg*ggatcc*ctagacagaataactacctcc -3`	69,5
Primer-ADP-for2	5`- gcg*ggatcc*gaaaagtatccggataatgtg -3`	68,1
Ermc-xho-rev2	5`- cgc*ctcgag*ggatgtattcactaatagaataagag -3`	68,3
Adp2-for	5`- gagtgga*cttaag*aaagcaagtg -3`	48
CpeI-for2	5`- aggagatgtcaattgtagcatgcttag -3`	52
CpeI-rev1	5`- ctaagcatgctacaattgacatctcc -3`	51
CpeI-rev2	5`- gcg*ggatcc*gtatgtaataatttaatattacatactgtc -3`	56
CpeI-for1	5`- gcg*ctgcag*gaaaaatacatacgcagggttagag -3`	61
Cpe-sig-seq-rev	5`- ttgacttgaaactactgaggg -3`	55,9
ADP-2-rev-pstpae	5`- gcg*ctgcaggcatgc*ctagacagaataactacctcc -3`	74
BdhA-pro-f-xho	5`- gcg*ctcgag*aaatggggatggttattgtaatc -3`	58
BdhA-pro-f-hind	5`- gcg*aagctt*aaatggggatggttattgtaatc -3`	55
BdhA-pro-rev-sal	5`- gcg*gtcgac*tacctcctagtaatagatttatag -3`	57
Ptb-pro-rev-sal	5`- gcg*gtcgac*tacactccctttactatttaattatc -3`	57
Ptb-pro-f-hind	5`- gcg*aagctt*ttgttggggattttatgaaggatacag -3`	58
Ptb-pro-f-xho	5`- gcg*ctcgag*ttgttggggattttatgaaggatacag -3`	61
Rep-for-hind	5`- gcg*aagctt*gtaagttaagggatgcataaactgc -3`	58
Rep-rev-xho-pst	5`- gcg*ctgcagctcgag*aatcgcattttcatagattgacctccc -3`	65
Sig2-rev-xba-bam	5`- gcg*ggatcctctaga*aagttctctattctcacttg -3`	59
Sig2-for-sal	5`- gcg*gtcgac*ttgagtaaacgttctaaattg -3`	55
Cpe-cas-rev-bam	5`- cggggatcc*tctagactcgag*g -3`	55
ADP1-rev	5`- gcg*gtcgac*ggaacacttgctttc*ttaag*tcc -3`	70,8
ADP2-rev	5`- gcg*gtcgac*agaataactacctcc -3`	69,5
Pell-sal-for	5`- gcg*gtcgac*atgaaaaaaatagtatgcttagtcgc -3`	68,3

Pell-xba-bam-rev	5`- cta*ggatcctctaga*agttacaggtgcactagctgc -3`	71,7
Prot-sal-for	5`- gcg*gtcgac*atgaaaaacaaaatttaggcc -3`	65,5
Prot-xba-bam-rev	5`- cta*ggatcctctaga*ttcttgtaaagaattatcgg -3`	66
Spoermcas-rev1	5`- cgcg*gatccgaattc*gactcgaggtgaatgcgcaaaag -3`	81
ADP-Seq-rev	5`- catattcagattgtcctccac -3`	46
Spo0A-xba-for	5`- gcg*tctaga*atggaaagtagaaaaataagtg -3`	62.9
Spo0A-xho-xba-rev	5`- gcg*tctagactcgag*ttagctaactttatttttaagtc -3`	67,3
ADP2-his-rev-XhoI	5`- gcg*ctcgag*caaacttccgtacttttcaataac -3`	58
ADP1-his-for-NdeI	5`- gcg*catatg*ataggacaaacagctgcg -3`	56
ADP1-his-rev-XhoI	5`- gcg*ctcgag*cctctttaaattcaaatc -3`	53
ADP2-his-for-mut NocI	5`- gcgccattggcaggtgtaagaatgattg -3`	56
ADP1-SalI-rev	5`- gcg*gtcgac*ctacctctttaaattcaaatc -3`	55
ADP2-SalI-for	5`- gcg*gtcgac*atgtcaggtgtaagaatgattg -3`	58
ADP2-SalI-rev	5`- gcg*gtcgac*ctacaaacttccgtacttttcaataac -3`	59
HISTAGTER-For	5`- gcg*tctagactcgag*caccaccaccaccaccactgag -3`	67
HISTAGTER-Rev	5`- cgc*ggatcc*caaaaaacccctcaagaccc -3`	61
ADP1-SalI-for	5`- gcg*gtcgac*gtgataggacaaacagctgcg -3`	62
Adp-rt-for	5`- ggttggaaaaacatttaaagatgatgg -3`	57
ADP1-RT-REV	5`- gtccatgatttaaaagtaattctgcc -3`	54
ADP1-RT-FOR	5`- gatagtgagagaaatgctatcaggc -3`	53
ADP2-RT-FOR	5`- ggataataaaatgtttcttcgcc -3`	51
ADP2-RT-REV	5`- aatggagatattctcataatagctcc -3`	51
Spo0A-fhis-XHOI-rev	5`- gcg*ctcgac*gctaactttatttttaagtcttagc -3`	64
Cpe-Int-BSII-rev	5`- cgttaaagagatcaagttgaaatg -3`	50
Cpe-BSII-for	5`- gagtatctataaacttgatactc -3`	37
CPE-BS-Start	5`- ctaagcatattataattaacatctcc -3`	46
Adp1-rt-rev-nest	5`- caattttccatcactacctacagtggc -3`	58
Adp1-xbaI-for	5`- gcg*tctaga*gtgataggacaaacagctgcg -3`	66
Adp1-xbaI-rev	5`- gcg*tctaga*ctacctctttaaattcaaatc -3`	56
Adp2-rt-rev-nest	5`- ccgtatattgtttaataacttctgcc -3`	52
GyrA-RT-for	5`- gcaatgagcgttatagtaagccgtgc -3`	61
GyrA-RT-rev	5`- gcagcagcagagtcaccgtcaaccg -3`	68
GyrA-RT-rev-nest	5`- cctatatctcttaccatttcaagagc -3`	51

CPE-trunc-xba-for	5`- cgc*tctaga*gtaatagataaaggagatggttgg -3`	61
Per-fdx-for-HindIII	5`- cgc*aagctt*aaggtgaagtagtaggtaac -3`	58
Per-fdx-rev-SalI	5`- cat*gtcgac*acacctcctaaaatgttgg -3`	62
CPE-int-BS-for	5`- aattaacatttcaacttgatctc-3`	58

Alle in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Plasmide

Plasmid	Grösse [Bp]	Eigenschaften	Referenz / Herkunft
p7big1	7077	pJIR750-bdhA mit Signal-peptidsequenz von *orf*5 als *Sal*I / *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit
p7BIG1SPO	9067	P7BIG1 mit MLS^r und *spo0A* aus pUCSPOERM als *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit
p7big2	7101	pJIR750-bdhA mit Aignal-peptidsequenz von *amy*A als *Sal*I / *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit
p7BIG2SPO	9091	P7BIG2 mit MLS^r und *spo0A* aus pUCSPOERM als *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit
p7BIG2TOX	9208	P7BIG2 mit MLS^r und *cpe* aus pUC-cpe-ermC2 als *Xba*I- Fragment	Diese Arbeit
p7big3	7065	pJIR750-bdhA mit Signal-peptidsequenz von *pel*L als *Sal*I / *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit
p7BIG3SPO	9055	P7BIG3 mit MLS^r und *spo0A* aus pUCSPOERM als *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit
p7BIG3TOX	9172	P7BIG3 mit MLS^r und *cpe* aus pUC-cpe-ermC2 als *Xba*I- Fragment	Diese Arbeit
p7big4	7065	pJIR750-bdhA mit Signal-peptidsequenz von *cac*0746 als *Sal*I / *Xba*I- Fragment	Diese Arbeit
p7BIG4SPO	9055	P7BIG4 mit MLS^r und *spo0A* aus pUCSPOERM als *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit

p7BIG1TOX	9184	P7BIG1 mit MLS^r und *cpe* aus pUC-cpe-ermC2 als *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit
pANS1	6,2 kBp[6]	Methyltransferase ϕ3T-Gen des Phagen ϕ3TI in pACYC184, Sp^r	BÖHRINGER, 2002
pCYP10	6652	pJIR750 mit P_{ptb}[1] als *Eco*RI / *Sal*I-Fragment	BÖHRINGER, 2002
pCYP10 2b1	8151	pCYP10 mit *cyp2b1* als *Sal*I-Fragment	Diese Arbeit
pCYP-2b1	7,06 kBp[6]	*cyp*2B1 als 1,59-kBp-*Eco*RI-Fragment in pMM40	BARTH, 2001
pET28a ADP2	6256	pET28a mit *cac*0339 als *Nco*I / *Xho*I-Fragment	Diese Arbeit
pJIR750-bdhA	6960	pJIR750 mit P_{bdhA} aus *C. acetobuytlicum* als *Hind*III / *Sal*I-Fragment	Diese Arbeit
pJIR750-ptb	7029	pJIR750 mit P_{ptb} aus *C. acetobuytlicum* als *Hind*III / *Sal*I-Fragment	Diese Arbeit
pJIRptb-ADP2	8061	pJIR750-ptb mit *cac*0338 als *Sal*I-Fragment	Diese Arbeit
pLF1-SigxbaI	5291	pLF1 (FEUSTEL, 2004) mit Signalpeptidsequenz von *orf*5 als *Sal*I-Fragment	Diese Arbeit
pMM40	5,47 kBp[6]	pBR322-Derivat, P_{tac}, *rrnB*T_1T_2, Ap^r, $laqI^q$[3]	KLEINER et al., 1988
pMM40-cyp2b1-K	6,9 kBp[6]	*cyp*2B1 [mit gekürztem Genanfang] als 1,48-kBp *Eco*RI / *Xba*I-Fragment in pMM40	BARTH, 2001

pMM40-cyp2b1-v	6,9 kBp[6]	*cyp*2B1 [mit verändertem Genanfang] als 1,48-kBp *Eco*RI / *Xba*I-Fragment in pMM40	BARTH, 2001
pMM41	5471	pMM40 mit veränderter RBS	BARTH, 2001
pMM41-cyp2b1-v	6,9 kBp[6]	*cyp*2B1 [mit verändertem Genanfang] als 1,48-kBp *Eco*RI / *Xba*I-Fragment in pMM41	BARTH, 2001
pSIGbam	6775	pCYP10 mit Signal-peptidsequenz von *orf*5 als *Sal*I / *BamH*I-Fragment	Diese Arbeit
pSIGX	6763	pCYP10 mit Signal-peptidsequenz von *orf*5 als *Sal*I / *Hind*III-Fragment	Diese Arbeit
pUC18	2686	Ap^r, *lacPOZ'*, MB1 oriR	VIEIRA und MESSING, 1982
pUC18-ADP	5304	pUC18-ADP1 mit *cac*0339 als *Bsp*TI / *Pst*I-Fragment	Diese Arbeit
pUC18-ADP1	3883	pUC18 mit *cac*0338 als *Bam*HI / *Bsp*TI-Fragment	Diese Arbeit
pUC18-bdhA	3078	pUC18 mit P_{bdhA} aus *C. acetobuytlicum* als *Hind*III / *Sal*I-Fragment	Diese Arbeit
pUC18-cpe	3661	pUC18 mit *cpe* aus *C. perfringens* als *Xba*I-Fragment; neue *Xho*I-Schnittstelle eingefügt	Diese Arbeit
pUC18-cpe-ermC2	4793	pUC18-cpe mit MLS^r Kassette aus pETSPO als *Xho*I-Fragment	Diese Arbeit
pUC18-cpe-int	3356	pUC18 mit Promoterbereich vor *cpe* aus *C. perfringens* als *Sal*I / *Pst*I-Fragment	Diese Arbeit

pUC18-ptb	3147	pUC18 mit P_{ptb} aus *C. acetobuytlicum* als *Hind*III / *Sal*I-Fragment	Diese Arbeit
pUC18-repL	3631	pUC18 mit repL aus pETSPO als *Hind*III / *Pst*I-Fragment	Diese Arbeit
pUC19sig	2803	pUC19 mit Signalpeptid-sequenz von *orf*5 als *Sal*I / *Xba*I-Fragment	Diese Arbeit
pUC19	2686	Ap^r, *lacPOZ'*, MB1 oriR	VIEIRA und MESSING, 1982
pUC19-sig-tox	4910	pUC19sig mit MLS^r und *cpe* aus pUC-cpe-ermC2 als *Xba*I- Fragment	Diese Arbeit
pUC-Sig2-tox	4934	pUC18 mit Signalpeptid-sequenz von *amy*A, MLS^r und *cpe* aus pUC-cpe-ermC2 als *Xba*I- Fragment	Diese Arbeit
pUCSpo0A	3544	pUC18 mit *spo0A* aus *C. acetobutylicum* als *Xba*I-Fragment; neue *Xho*I-Schnittstelle eingefügt	Diese Arbeit
pUCSpoErm	4676	pUCSpo0A mit MLS^r-Kassette aus pETSPO als *Xho*I-Fragment	Diese Arbeit
pET28a(+)	5369	*E. col*- Expressionsvektor, Km^r, ori (3286), f1 (+) ori, *laqI*	Novagen Inc., Madison, USA
pIMP1	4696	Ap^r, ermC, pMB1 oriR, pIM13 oriR(+)	MERMELSTEIN et al., 1992
pJIR750	6568	*catP*, *lacPOZ'*, pMB1, oriR, pIP404, ori R+	BANNAM und ROOD, 1993

pUCCPET2	3535	pUC18 mit gekürztem *cpe* aus *C. perfringens* als *Xba*I-Fragment; neue *Xho*I-Schnittstelle eingefügt	Diese Arbeit
pUCCPETERM2	4667	pUCCPET2 mit MLS^r-Kassette aus pETSPO als *Xho*I-Fragment	Diese Arbeit
pJIRptb-ADP2-anti	8061	pJIR750-ptb mit *cac*0339 als *Sal*I-Fragment in „antisense“ Orientierung	Diese Arbeit
pETSPO	5107	Cm^r; fragmentiertes *spo0A* mit dazwischen klonierter MLS^r-Kassette für die Integration in das Chromosom	HARRIS et al., 2002
pC3/2b1	6995	*cyp*2B1 als 1,56-kBp-*Xho*I / *Xba*I-Fragment aus pSW1[4] in pcDNA3 [5]	P. KARLE, Wien

[1] *ptb*: Phosphotransbutyrylase-Gen von *C. acetobutylicum*

[2] *bdh*A: Butyraldehyddehydrogenase-Gen von *C. acetobutylicum*

[3] mit nachträglich eingebrachter Multipler Klonierungstelle aus pUC19

[4] KEDZIE, 1991

[5] 5,4 kBP[6]; Ap^r, Neo^r, ColE1 oriR; Invitrogen

[6] keine genaue Gensequenz vorhanden

2.7.2 Behandlung von Geräten und Lösungen

Zur Entfernung von DNasen bzw. RNasen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen bei 121 °C für mindestens 20 min autoklaviert. Kleinteile aus Metall oder Glas wurden in Ethanol (96 %, v/v) getaucht und abgeflammt. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert und Geräte, die nicht autoklavierbar waren, wurden mit Ethanol (70 %, v/v) gespült bzw. abgewaschen und anschließend unter einer sterilen Werkbank (HLB 2448 GS, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) getrocknet. Bei Arbeiten mit RNA mussten besondere Vorkehrungen getroffen werden, da sich RNasen sehr schlecht durch Hitze inaktivieren lassen. Alle autoklavierbaren Geräte wurden zweimal autoklaviert und verwendete Lösungen wurden zusätzlich mit DEPC versetzt. Die Geräte wurden außerdem noch mit sterilem, deionisierten DEPC-Wasser abgewaschen. Bei allen Arbeitsschritten mit RNA wurden Einweghandschuhe getragen. Die RNA-Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.7.3 Isolation chromosomaler DNA aus Clostridien

Für die Isolation chromosomaler DNA wurden *C. acetobutylicum* oder *C. perfringens* in 50 ml anaerobem 2x YTG Medium bei 37 °C inkubiert. Die Zellernte erfolgte jeweils in der späten logarithmischen Phase. Die Zellen wurden bei 4 °C für 15 min mit 5000 x g zentrifugiert. Das Sediment der Kultur wurde in 2-3 ml Kaliumphosphatpuffer (10 mM pH 7,5) suspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 1,9 ml STE-Puffer aufgenommen und mit 300 µl Lysozym (20 mg (135000 U/mg) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Für den Zellaufschluss wurden der Zellsuspension dann 280 µl einer 10 % SDS (w/v) Lösung zugesetzt und es erfolgte eine weitere Inkubation von 10 min bei 37 °C. Zur Hemmung von DNasen wurden der Lösung 240 µl Na-EDTA 0,5 M und 20 µl TRIS-HCl, 1 M (pH 8), zugesetzt. Zur Beseitigung von RNA-Verunreinigungen wurde die Suspension bei Bedarf mit 100 µl RNaseA (10 mg/ml; 10 min bei 100 °C inkubiert) behandelt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden 100 µl Proteinase K (2,5 mg/ml) zu dem Ansatz pipettiert, um vorhande Proteine abzubauen. Die Suspension wurde 3 h, oder über Nacht, bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 600 µl einer 5 M Na-Perchlorat-Lösung wurde die DNA gereinigt. Hierfür wurden der Suspension 3 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben. Nach einer Zentrifugation bei RT für

10 min mit 5000 x g wurde die DNA-haltige Phase abgenommen und zwei weitere Male gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit Isopropanol gefällt. Dabei wurde 1 vol. Isopropanol zu der Lösung pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einer im Bunsenbrenner zu einem Glashaken gebogenen Pasteurpipette wurde die DNA aus der Lösung geangelt und kurz in 70 % Ethanol (-20 °C) getaucht um sie zu waschen. Die DNA wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der so gewonnenen chromosomalen DNA erfolgte bei -20 °C.

STE-Puffer (pH 8.0)

Saccharose	67 g	6,7 % (w/v)
TRIS	6,06 g	50 mM
Na-EDTA	0,37 g	1 mM
H_2O		ad 1000 ml

2.7.4 Isolation von Gesamt-RNA mittels „RNeasyTM-Kit“, modifiziertes Protokoll (Qiagen GmbH, Hilden)

Zur Isolation von RNA aus *C. acetobutylicum* mussten, aufgrund der stabilen Zellhülle, hohe Lysozym-Konzentrationen von 20 mg/ml in TE-Puffer eingesetzt werden. Für die Gewinnung von RNA aus *E. coli* war es ausreichend, Lysozym in Konzentrationen von 400 µg/ml zu verwenden. Folgende Schritte wurden bei RT und unter Beachtung der Vorsichtsmaßnahmen für RNA ausgeführt: Zentrifugierte (8000 × g, 3 min, RT) und vom Überstand befreite Zellen aus 1-2 ml Kultur wurden in 100 µl TE-Puffer mit Lysozym in entsprechender Konzentration suspendiert und für 5-10 min bei RT inkubiert. 350 µl Lysispuffer wurden jeweils frisch mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt und zu der Zellsuspension pipettiert. Anschließend wurden 250 µl Ethanol (96 %, v/v) zugegeben und durch vorsichtiges Aufziehen der Pipette gemischt. Das Lysat wurde nun auf eine „RNeasy spin“-Säule aufgetragen und bei RT für 30 s zentrifugiert (8000 × g). Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule mit 700 µl Waschpuffer RW1 beladen und zentrifugiert (8000 × g, 30 s, RT). Die Säule wurde nun zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert (8000 × g, 30 s, RT). Beim letzten Waschschritt wurde der RPE-Puffer durch eine verstärkte Zentrifugation entfernt (10000 × g, 2 min, RT). Die RNA konnte jetzt mit 50 µl DEPC-Wasser von der Säule eluiert werden. Die Elution wurde mit dem Eluat einmal wiederholt, da dieser Schritt die Ausbeute

erhöhte. War die so erhaltene RNA noch nicht DNA-frei, wurde eine DNase-Behandlung angeschlossen.

2.7.5 DNase-Behandlung in wässrigen RNA-Lösungen

Der DNase-Verdau fand in einem Volumen von 500 µl mit folgenden Komponenten statt: 100 U RNase-freie-DNase (DNaseI FPLC*pure*™, Amersham Bioscience GmbH, Freiburg), 100 µl 5x DNase-Puffer (200 mM TRIS-HCl, pH 7,5; 30 mM $MgCl_2$). Einer Inkubation von 30 min bei 37 ºC schlossen sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.7.10.1) und eine Ethanolfällung (2.7.10.2) an. Diese Behandlung musste teilweise 2-3-mal wiederholt werden, um die RNA komplett von DNA zu befreien. Das Sediment wurde in 10-20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

DNase-Puffer, 5x

TRIS	2,4 g	200 mM
$MgCl_2$	286 mg	30 mM
H_2O	ad 100 ml	
pH 7,5 eingestellt mit HCl		

2.7.6 DNase-Behandlung auf einer Silica-Gel-Membran

RNA wurde hierbei auf der Silica-Gel-Membran des „RNeasy™-Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden) einer DNase-Behandlung des „RNase-Free DNase set“ (Qiagen GmbH, Hilden) unterzogen.Die Durchführung fand nach Angaben des Herstellers statt. Diese Methode erlaubte es, RNA schneller und mit weniger Verlusten von unerwünschter DNA zu befreien.

2.7.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (BIRNBOIM et al., 1979; mod.)

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe der Alkalischen-Lysis-Methode gewonnen. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Abzentrifugieren von 1, 5 ml Zellen (14000 x g, 1 min, RT)
2. Suspendieren des Sediments in 300 µl kaltem Puffer P1
3. Zugabe von 300 µl frisch angesetztem Puffer P2 und vorsichtiges Mischen, 5 min Inkubation auf Eis, Lyse der Zellen
4. Zugabe von 300 µl eiskaltem Puffer P3 und vorsichtiges Mischen
5. Zentrifugation (18000 x g , 15 min, 4 °C) von ausgefällten Proteinen, chromosomaler DNA und Zellresten
6. Isopropanolfällung des Überstandes (2.7.10.3)

Mit dieser Methode konnten bis zu 10 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Probleme bei weiterführenden Versuchen, die auf Verunreinigungen mit Proteinen hindeuteten, wurden durch eine nachträgliche Extraktion mit Phenol (2.7.10.1) beseitigt.

Puffer P1:

RNase A (10 mg/ml)	1 ml	100 µg
TRIS-HCl (1 M, pH 8)	5 ml	50 mM
EDTA (0,5 M, pH 8)	1 ml	5 mM
H_2O	ad 100 ml	

Puffer P2:

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

Puffer P3:

K-Acetat	29,4 g	3 M
H_2O	ad 100 ml	
pH 5,5 eingestellt mit Eisessig		

2.7.8 Plasmidpräparation mittels „GFX™ Micro Plasmid Prep-Kit“

Um Plasmide in kleinen Mengen bis ca. 3-6 µg aus *E. coli* zu isolieren, wurde der „GFX™ Micro Plasmid Prep“-Kit (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) eingesetzt. Dieses Verfahren zur DNA-Isolation 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 frischen *E. coli*-Kultur bei RT abzentrifugiert (14000 × g, 1 min) und das Zellsediment nach dem vom Hersteller angegebenen Verfahren behandelt.
Das Protokoll fand auch Anwendung, um geringe Mengen Plasmide aus Clostridien zu isolieren. Hierfür wurden die Zellen vor der Behandlung 30 min bei 37 °C mit Lysozym 20 mg /ml (135000 U / mg) behandelt.

2.7.9 RNaseA-Behandlung von DNA-Lösungen

Da nach einer Extraktion von chromosomaler DNA diese nicht frei von RNA war, schloss sich eine RNaseA-Behandlung an. Es wurde darauf geachtet, dass die RNaseA-Lösung (10 mg/ml TE-Puffer, pH 8,0) vor Gebrauch 10 min bei 100 ºC erhitzt wurde, um DNasen zu inaktivieren. Anschließend wurden auf 1 ml DNA-Lösung 5 µl RNaseA-Lösung zugesetzt und der Ansatz 1 h bei 37 ºC inkubiert. Danach schloss sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.7.10.1) und eine Ethanolfällung (2.7.10.2) an.

2.7.10 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Verunreinigungen von Nukleinsäuren durch Salze und Proteine wirken störend auf weiterführende Versuche. Aus diesem Grund wurden die nukleinsäurehaltigen Lösungen aufgereinigt.

2.7.10.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Phenol besitzt die Eigenschaft Proteine, zu denaturieren. Um zu verhindern, dass sich ebenfalls die DNA in Phenol löst, wurde TE-gesättigtes Phenol mit einem pH von 8,0 (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg) eingesetzt. Zur Aufreinigung wurde ein Gemisch von Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (24:24:1, v/v/v), SAMBROOK et al., 2001) verwendet. Das zugesetzte Chloroform verschärft die Phasengrenze zwischen Phenol und der wässrigen Phase und wirkt ebenfalls denaturierend auf Proteine. Der Isoamylalkohol soll das Schäumen der Lösung verhindern. Der erste Schritt musste, je nach Proteinverunreinigung, mehrmals durchgeführt werden. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (8000 × g, 5 min, RT) verbessert, und die wässrige Phase bis zur Interphase wurde für weitere Schritte vorsichtig entnommen. Um das Phenol aus der Lösung nahezu vollständig zu entfernen, wurde mindestens zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) ausgeschüttelt (WALLACE, 1987). Eine Konzentrierung erfolgte mit einer darauffolgenden Fällung, deren Art von der weiteren Verwendung abhängig war (2.7.12, 2.7.18). RNA-Lösungen wurden im Gegensatz zu DNA-Lösungen mit wassergesättigtem Phenol (AquaPhenol^{TM}, Appligene, Frankreich, Illkirch) so lange ausgeschüttelt, bis die Interphase durchsichtig klar war. Überschüssiges Phenol wurde ebenfalls durch Ausschütteln mit Chloroform- Isoamylalkohol (ReadyRed^{TM}, Appligene, Frankreich, Illkirch) entfernt.

2.7.10.2 Ethanolfällung

Die Ethanolpräzipitation stellt die gebräuchlichste Fällungs- und Konzentrierungs-Methode für DNA und RNA dar. Die Nukleinsäuren bilden in Anwesenheit monovalenter Kationen einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation von der wässrigen Phase getrennt werden kann. Hierfür wird die zu fällende Probelösung mit Na-Acetat (Stammlösung 3 M, pH 5,2) auf 10 % (v/v) eingestellt, sodass die Endkonzentration von Na-Acetat ca. 0,3 M betrug. Daraufhin wurde das 2,5- bis 3fache Volumen der Lösung mit Ethanol (96 %, v/v) aufgefüllt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die ausgefallene DNA zentrifugiert (15000 × g, 20 min, 4 °C). Im Gegensatz zur Fällung von DNA wurde bei der Fällung von RNA eine Temperatur von -70 °C über 1 h eingehalten. Damit sollte das Risiko verringert werden, dass noch aktive RNasen die RNA verdauen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Ethanolüberstand mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und der sedimentierte

Rückstand mit ca. 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge bei RT getrocknet. Das Sediment wurde dann in einer geeigneten sterilen Lösung aufgenommen.

2.7.10.3 Isopropanolfällung

Um möglichst salzfreie DNA-Lösungen zu erhalten, wurde DNA mit Isopropanol präzipitiert. Dabei wurde die DNA-Lösung mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und anschließend zentrifugiert (14000 × g, 10 min, 4 °C). Das Sediment wurde, wie bei (2.7.10.2), mit Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und getrocknet.

2.7.10.4 Mikrodialyse mittels Membranfilter

Eine weitere Möglichkeit, DNA salzfrei zu bekommen, war die Mikrodialyse. Diese wurde zur Aufreinigung geringer Mengen DNA in Ligationsanätzen vor dem Einsetzen in Elektroporationen verwendet. Dabei wurde pro Ansatz eine Petrischale mit 20 ml sterilem, bidestillierten Wasser gefüllt und ein Filterplättchen (Millipore „VS“ Membranfilter, Porengröße 0,025 mm, Millipore GmbH, Schwalbach) so auf die Wasseroberfläche gelegt, dass kein Wasser die Oberseite des Filters benetzte. 15-25 µl zu reinigende DNA-Lösung wurde auf die Oberseite des Filters getropft. Eine Inkubation von ca. 10-15 min bei RT gewährleistete, dass Salze und kleine DNA-Fragmente durch die Filterporen in das große Volumen Wasser darunter diffundierten und somit die DNA nahezu salzfrei war. Der DNA-Tropfen konnte nun vom Filter pipettiert und für weitere Versuche verwendet werden.

2.7.10.5 Mikrokonzentratorsäulen

Um DNA-Lösungen speziell nach PCR-Ansätzen und einem Verdau mit Restriktionsenzymen zu entsalzen, wurden Mikrokonzentratorsäulen Microcon100 (Millipore GmbH, Schwalbach) verwendet. Sie boten weiterhin den Vorteil, Oligodesoxynukleotide, dNTP`s und andere DNA-Fragmente kleiner als 100 Bp abzutrennen. Dazu wurden bis zu 50 µl Lösung auf eine Säule aufgetragen und mit 450 µl sterilem bidestillierten Wasser gemischt und bei 2000-3000 × g für 9 min bei RT zentrifugiert. War das gewünschte Volumen erreicht,

wurde der Durchlauf verworfen und die DNA-Lösung wieder mit frischen 450 µl bidestillierten Wasser aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Durch die Wiederholung des Schrittes sollte ein Auswaschen noch in der Lösung vorhandener Salze erreicht werden. Sobald das gewünschte Volumen erreicht war, wurde die Säule umgekehrt in ein frisches Auffanggefäß überführt und bei 10000 × g bei RT für 1 min zentrifugiert, um alle DNA-Reste von der Säule zu entfernen. So behandelte Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.7.11.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren über die Agarose-Gelelektrophorese

Um eine ungefähre Abschätzung der Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung zu erhalten, wurden diese zusammen mit einem Kalibrierstandard in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Diese Methode wurde angewendet, wenn keine exakte Mengenbestimmung der Nukleinsäure für die weiteren Versuche notwendig war. Weiterhin hilfreich war die Nachweisgrenze von Nukleinsäuren im ethidiumbromidgefärbten Agarose-Gel, die bei ca. 20-25 ng liegt.

2.7.11.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren über die photometrische Messung

Eine exaktere Methode stellt die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA über eine photometrische Messung dar. Die Messung beruht auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der Basen bei 260 nm Wellenlänge. So gilt annäherungsweise für DNA in einer Quarzglasküvette mit der Schichtdicke 1 cm: OD_{260} = 1 entspricht ca. 50 mg/ml. Durch den Hyperchromie-Effekt gelten für RNA und cDNA andere Werte. So entspricht eine OD_{260} von 1 bei einzelsträngiger DNA etwa 40 mg/ml DNA, während bei RNA eine OD_{260} von 1 nur ca. 33 mg/ml entspricht. Die Messung erfolgte in einer speziellen 70-µl-Quarzglasküvette. Durch eine simultane Messung bei 280 nm Wellenlänge wurden hauptsächlich aromatische Proteine nachgewiesen, und durch den Quotienten von

OD_{260}/OD_{280} nm konnte eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung getroffen werden. Eine reine RNA-Lösung besitzt dabei einen Wert von 2,0, während eine reine DNA-Lösung einen Wert von 1,8 besitzt (SAMBROOK et al., 2001). Darunterliegende Werte deuteten auf Verunreinigungen durch Proteine und Salze hin.

2.7.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine sehr wirkungsvolle Methode zur Vermehrung kurzer DNA-Abschnitte, die von Kary B. Mullis entwickelt wurde (SAIKI et al., 1988). Hierbei werden zwei Oligodesoxynukleotide (Oligonukleotide) synthetisiert, die jeweils komplementär zu einem der beiden 3´-Einzelstrangenden des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges sind. Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert. Im zweiten Schritt hybridisieren die beiden Oligonukleotide, entsprechend ihrer Sequenzhomologie, bei einer definierten Anlagerungstemperatur an die einzelsträngige DNA. Im dritten Schritt beginnt die DNA-Polymerase an diesen kurzen, doppelsträngigen Abschnitten mit den im Ansatz enthaltenen vier Desoxynukleosidtriphosphaten die Oligonukleotide in 3´-Richtung zu verlängern. Der gesamte Zyklus wird nun wiederholt. Bei einer Anzahl von n Zyklen können so im Idealfall 2^n Kopien der von den Oligonukleotiden eingerahmten Sequenz erhalten werden. In einem PCR-Ansatz sind folgende Komponenten enthalten:

- 10x Reaktionspuffer: 5 µl
- DNA: ca. 100 ng
- 25 mM $MgCl_2$: 2,5 µl
- dNTP-„Mix” (jeweils 2 mM): 5 µl
- 10 pmol/µl Oligonukleotid A: 1 µl
- 10 pmol/µl Oligonukleotid B: 1 µl
- DNA-Polymerase (1 U/µl): 1 µl
- A. bidest: ad 50 µl

Nachfolgend ist ein typisches PCR-Programm dargestellt:

Vorabdenaturierung: 95 °C; 5 min
1) Denaturierung: 95 °C; 30 s
2) Anlagerung: 50-55 °C; 30 s
3) Verlängerung: 72 °C; 60 s/1000 Bp
Schritt 1-3 wird 32 x wiederholt
Endverlängerung: 72 °C; 5 min

Die Anlagerungs- und Verlängerungszeiten wurden in dieser Arbeit je nach Größe des zu amplifizierenden Genabschnitts variiert. Die verwendeten Lösungen wurden den unterschiedlichen Protokollen der verwendeten DNA-Polymerasen angepasst. Die Sequenz der Oligonukleotide wurde, wenn möglich, nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:
G+C-Gehalt um 50 %, Schmelztemperatur (Tm) von 56 ± 8 ºC, G oder C am 3'-Ende, nicht mehr als vier gleiche Basen in Folge und Vermeidung von Sequenzen, die zu einer internen Sekundärstrukturbildung führen könnten. Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde mit folgender Formel berechnet (SUGGS et al., 1981):

$$Tm\ [ºC] = 4 \times (nG + nC) + 2 \times (nA + nT)$$

Für Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 20 Nukleotiden wurde folgende Formel herangezogen (MWG-Biotech AG, Ebersberg):

$$Tm\ [ºC] = 69{,}4 + 0{,}41 \times \%\ (G+C) - 650/nX$$

Als Hybridisierungstemperatur wurde ein Wert von 3-5 ºC unter der berechneten Schmelztemperatur Tm gewählt. Nach Ablauf der Reaktion wurde jeweils ein Aliquot jedes Ansatzes auf einem Agarose-Gel kontrolliert.

2.7.13 Quantitative RT-PCR

Um Aussagen über das Vorhandensein von mRNA-Transkripten bestimmter Gene zu treffen, wurde die Methode der quantitativen RT-PCR verwendet. Hierbei wurden mit der Reversen

Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia*-Virus (*M-MuLV*) RNA-Fragmente in cDNA-Stücke umgeschrieben und quantitativ bewertet. Die Reaktionsbedingungen wurden durch die Verwendung des „Ready-To-Go™ RT-Bead"-Kit (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) konstant gehalten. Das stellte eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Aussage dar. In diesem „Kit" befinden sich alle für die erfolgreiche Reaktion notwendigen Substanzen. Zum Starten der Reaktion müssen nur die entsprechenden Oligodesoxynukleotide und die RNA zugegeben werden. Die eingesetzten RNA-Mengen wurden durch Verdünnungen photometrisch bestimmter Ausgangslösungen ermittelt. Die Vorversuche zeigten, dass eine Menge von 100 ng Gesamt-RNA nötig war, um im ethidiumbromidgefärbten Agarose-Gel Banden sichtbar zu machen. Als Startmoleküle der Reaktion wurden Oligodesoxynukleotide verwendet, die an Stellen im Gen hybridisieren sollten, an denen keine erkennbare, sequenzbedingte Sekundärstruktur lag. Durch eine begrenzte Zyklenzahl (max. 20 Zyklen) konnten Effekte, die durch limitierende Reaktionsedukte verursacht wurden, ausgeschlossen werden. In den Reaktionsgefäßen befanden sich getrocknete „beads", welche die Reverse Transkriptase und die *Taq*-Polymerase enthielten. Sie wurden zu Anfang mit 20 ml DEPC-Wasser aufgefüllt und auf Eis inkubiert, bis sie sich völlig gelöst hatten. Es wurden 100 ng RNA in 5 µl DEPC-Wasser pro Ansatz eingesetzt. Des weiteren wurden 25 pmol eines Starter-Oligodesoxynukloetids zugesetzt, um der RT als Startpunkt für die cDNA-Synthese zu dienen. Danach wurde der Ansatz auf 50 µl aufgefüllt. Als Negativ-Kontrolle wurde die RT in einem gleichen Ansatz bei 95 °C 10 min erhitzt, um sie zu deaktivieren. Waren in diesem Ansatz nach der eigentlichen PCR Banden zu sehen, so befand sich in der RNA-Lösung DNA, und alle Ansätze waren nicht auswertbar. In einem solchen Falle wurde die RNA einer DNase-Behandlung unterzogen (2.7.6). Als Positivkontrolle diente bei RT-PCR Experimenten mit RNA aus *C. acteobutylicum* das *gyrA*-Gen. Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte bei 42 °C für 30 min Nach der Inkubation wurde die so entstandene cDNA denaturiert und die Reverse Transkriptase inaktiviert (95 °C, 5 min). Danach wurde ein Gegen-Oligodesoxynukleotid (25 pmol) zugegeben, und es folgte eine Standard-PCR mit 30 Zyklen und einer Denaturierungszeit von 1 min (95 °C), einer Hybridisierungszeit von 30 s (50 °C) und einer Polymerisationszeit von 1 min (72 °C). Die quantitative Analyse erfolgte nach Auftrennung durch die Agarose-Gelelektrophorese (2.7.15.1).

2.7.14 Einfügen von Restriktionsschnittstellen über PCR

Um eine gerichtete Klonierung von DNA-Fragmenten zu ermöglichen, wurden mittels der in der PCR verwendeten Oligodesoxynukleotide Erkennungsequenzen für Restriktionsendonukleasen eingefügt. Hierfür wurden spezielle Oligodesoxynukleotide verwendet, deren 3'-Enden zwar komplementär zur eingesetzten Matrizen-DNA waren, im 5'-Bereich allerdings veränderte Basen enthielten. Die Veränderung wurde so gewählt, dass sie von bestimmten Restriktionsendonukleasen erkannt werden konnte. Zusätzlich wurde ein kurzer nicht paarender Bereich am 5'-Ende angefügt, der es dem Restriktionsenzym erlauben sollte, an die DNA zu binden. Die Reaktion erfolgte analog der Standard-PCR (2.7.12), wobei die Anlagerungstemperatur aufgrund der nicht paarenden Sequenzbereiche 3 bis 10 °C niedriger als errechnet gewählt wurde.

2.7.15 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten

2.7.15.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA oder RNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Phosphatgruppen der Nukleinsäure-Moleküle sind bei den verwendeten pH-Werten negativ geladen, wodurch diese zur Anode wandern. Die elektrisch neutrale Agarose-Gelmatrix fungiert hierbei als Sieb, wodurch kleinere Fragmente schneller wandern als große (SAMBROOK et al., 2001).

Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst und bis zur Verwendung bei 60 °C gelagert. In horizontalen Gelkammern eigener Bauart wurden je nach zu trennender Größe ca. 20-30 ml 0,8 %ige (Fragmente > 1000 Bp) oder 2,0 %ige (Fragmente < 1000 Bp) Agarosegele in heißem Zustand gegossen. Mit einem Kamm wurden Ladetaschen geformt. Nach der Polymerisation des Gels wurde es mit 1x TAE-Lauf-Puffer überschichtet. Zur Beschwerung der Proben und zur Markierung der Lauffront wurden die Proben vor der Auftragung mit 0,2 Vol. Lade-Puffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer Feldstärke von 10-12 $V \times cm^{-1}$ über eine Distanz von ca. 7-12 cm in 45 bis 60 min. Abschließend wurde das Gel für ca. 30 min in Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml 1x TAE - Puffer) gefärbt. Nach Abwaschen des überschüssigen Ethidiumbromids konnte das Gel

mittels einer Geldokumentationsanlage GelPrint 2000i (MWG GmbH, Ebersberg) fotografiert und ausgewertet werden.

TAE-Stammlösung 50 ×, pH 7,5 (SAMBROOK et al., 2001)

TRIS	242,3 g	2 M
Essigsäure (96 %, v/v)	57,0 ml	1 M
Na-EDTA	18,6 g	50 mM
H_2O	ad 1000 ml	

Lade-Puffer

Na-EDTA	3,7 g	100 mM
Ficoll 400	15,0 g	15,0 % (w/v)
Bromphenolblau	0,1 g	0,1 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,1 g	0,1 % (w/v)
H_2O	ad 100 ml	

2.7.15.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente (60 Bp bis 400 Bp) wurde in einer Gelmatrix aus Acrylamid durchgeführt. Die dichtere Gelmatrix gewährleistete hierbei eine bessere Auftrennung, als in einem Agarosegel (SAMBROOK et al., 2001). Das Gel der Größe 11 × 7 × 0,1 cm, wurde hierbei in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer, Whatman Biometra GmbH i. L., Göttingen, gegossen. Mit einem Kamm wurden Ladetaschen geformt und das Gel wurde mit einem 1x TBE-Ladepuffer überschichtet. Zur Beschwerung der Proben und zur Markierung der Lauffront wurden die Proben vor der Auftragung mit 0,2 Vol. Lade-Puffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 60 bis 130 V über einen Zeitraum von 30-60 min. Anschließend wurde das Gel bis zu 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und nach dem Abwaschen des Ethidiumbromids in einer Fotodokumentationsanlage fotografiert.

Polyacrylamid-Gel, 8 %

Acrylamid 40 % (w/v)	4,4 ml
N,N'-Methylen-Bisacrylamid-Lösung (2 %, w/v)	3 ml
TBE-Puffer, 5 ×	4,5 ml
H_2O	10,6 ml
TEMED	11 µl
Ammoniumpersulfat (10 % w/v)	112 µl

TBE-Puffer 5 ×

TRIS	60,5 g	0,5 M
Borsäure	25,6 g	0,42 M
EDTA	1,86 g	5 mM
H_2O	ad 1000 ml	

2.7.16 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte, indem auf die Agarose-Gele neben den Spuren der Proben ein DNA-Größenstandard aufgetragen wurde. Als DNA-Größenstandard wurde der „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, eingesetzt. Dieser wurde durch vollständigen Restriktionsverdau von sieben unterschiedlichen Plasmiden mit bekannter Sequenz hergestellt und enthält 21 Fragmente unterschiedlicher Größe. Für einen Größenvergleich von sehr kleinen Fragmenten wurde der „GeneRuler™ 100 Bp Ladder“ der Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, eingesetzt.

2.7.17 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Falls bei einem PCR-Ansatz mehrere unspezifische Banden auftraten, die sich auch durch Verändern der PCR-Parameter nicht beseitigen ließen, wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit sehr guter Ausbeute mit dem „NucleoSpin Extract Kit" (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, HG, Düren) entsprechend den Herstellerempfehlungen isoliert.

2.7.18 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.7.18.1 Restriktionsspaltung von DNA

Spezifische Restriktionsendonukleasen der Klasse II hydrolysieren doppelsträngige DNA an definierten Erkennungssequenzen. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen für analytische und präparative Zwecke verwendet. Für die Reaktionen wurde den Ansätzen jeweils ein vom Hersteller bezogener Puffer zugegeben, um die optimale Aktivität des Enzyms zu erhalten. Bei Restriktionsansätzen mit verschiedenen Enzymen wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Enzyme in einem gemeinsamen Puffer optimale Aktivität hatten. Ansonsten wurde zuerst das Enzym mit Aktivität im Puffer geringerer Salzkonzentration mit der zu schneidenden DNA inkubiert und danach die einfach geschnittene DNA für die zweite Restriktion mit dem entsprechenden Enzym im Puffer mit höherer Salzkonzentration inkubiert. Um unspezifisches „Schneiden“ zu vermeiden wurde darauf geachtet, dass die Glycerin-Konzentration im Ansatz nicht über 5 % stieg. Bei einigen Restriktionsendonukleasen kann eine hohe Glycerin-Konzentration zu sogenannter „Stern-Aktivität“ führen, bei der sie auch ähnliche Erkennungsequenzen schneidet (NASRI und THOMAS, 1986). Die Restriktionsverdaus wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.7.15.1). Analytische Restriktionen von 1 µg DNA erfolgten bei 37 °C für 30-60 min in einem Volumen von 20 µl. Bei präparativen Restriktionen wurde eine größere Menge an DNA eingesetzt und das Gesamt-Ansatzvolumen auf 50 µl erhöht. Die Ansätze wurden bei 28 °C über Nacht inkubiert.

2.7.18.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten (SAMBROOK et al., 2001; mod.)

Um eine unerwünschte Ligation eines mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung an den 5'-Enden durch die SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase E.C.3.1.3.1.) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte durch Zugabe der SAP zu den Restriktionsansätzen oder in speziell dafür vom Hersteller bereitgestelltem Puffer. Für eine Dephosphorylierung von 1 mg Vektor-DNA wurden 10 U SAP eingesetzt und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die SAP bei 65 °C für 15 min denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz über Mikrokonzentratorsäulen gereinigt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.19 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase (WEISS et al., 1968)

Die Ligation von dephosphorylierten Vektoren und zu klonierenden Fragmenten („inserts“) wurde im molaren Verhältnis 1:2 bis 1:6 in einem 20-µl-Ansatz durchgeführt, wobei 2 µl des 10fachen T4-DNA-Ligasepuffers mit den DNA-Lösungen und Wasser auf 19 µl aufgefüllt wurden. Die Reaktion wurde mit 1 µl T4-DNA Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) gestartet. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 22 °C in einer PCR-Maschine. Nach der Ligation wurde die Ligase durch Erhitzen des Ansatzes für 15 min bei 65 °C deaktiviert. Dieser Schritt sollte die spätere Transformationseffizienz steigern (MICHELSEN, 1995).

2.7.20 Sequenzierung von DNA

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenzier-Methode basiert auf einem Kettenabbruch-Prinzip (SANGER et al., 1977). Hierbei werden für die Synthese eines Komplementärstranges der DNA-Polymerase neben dNTP`s auch geringe Mengen ddNTP`s (Didesoxynukleotide) angeboten, die am 3'-Ende keine OH-Gruppe besitzen, wodurch nach deren Einbau die Synthese nicht weitergeführt werden kann. Dadurch kommt es zu statistisch verteilten Unterbrechungen im Komplementärstrang. Die daraus resultierenden, verschieden langen DNA-Fragmente zeigen in einem Polyacrylamidgel ein größenabhängiges Laufverhalten. Durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der ddNTPs kann anschließend auf die Sequenz der DNA rückgeschlossen werden. Für Sequenzierungen von Plasmiden wurde 2 µg mit „GFX^{TM} Micro Plasmid Prep-Kit“ gereinigte Plasmid-DNA in 10 µl H_2O aufgenommen. Für die Sequenzierung notwendige Oligonukleotide wurden dem Ansatz in einer Konzentration von 20 pmol/µl zugegeben. Die Ansätze wurden zu der Firma AGOWA GmbH, Berlin, geschickt, welche die Sequenzierungen durchführte.

2.7.21 Analyse der Sequenzdaten

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm „Clone Manager 7“ (Sci Ed Software, Cary, USA) auf einem PC analysiert und ausgewertet. Die Internet-Datenbanken „Kegg“ (http://www.genome.jp/kegg/; Stand 02/05), „TrEMBL“, „SWISS-PROT“ und

„ExPACy“ (http://us.expasy.org/sprot/; Stand 02/05) sowie das National Center for Biotechnological Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov fanden für Sequenzabgleiche Verwendung. Für die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen wurde der Algorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; ALTSCHUL et al., 1997) verwendet.

2.7.22 Transformation

2.7.22.1 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation (DOWER et al., 1988)

Aus einer frischen, über Nacht gewachsenen 5-ml-*E. coli*-LB-Kultur wurden 250 ml LB-Medium mit 1 % (v/v) inokuliert. Nach einem Wachstum der Zellen bei 37 °C wurde bei einer OD_{600} von 0,6-0,9 geerntet. Die Zellen wurden 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4 °C zentrifugiert (5000 × g, 10 min). Um vorhandene Salze, welche die empfindliche Transformation stören, abzutrennen, wurden die Zellen zweimal mit 1 Vol. eiskaltem Wasser und anschließend mit 30 ml eiskaltem Glycerin (10 %, v/v H_2O) gewaschen und zentrifugiert (5000 × g, 4 °C, 5 min). Das Zellsediment wurde in 3-4 ml Glycerin (10 %, v/v H_2O) aufgenommen und in 50-µl-Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und maximal 2,5 µl der zu transformierenden DNA nach Mikrodialyse (2.7.10.4) zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend in eine Elektroporations-Küvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt und einem Stromimpuls der Spannung 2,5 kV bei einer Kondensatorkapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω ausgesetzt. Die daraus resultierenden Zeitkonstanten lagen im Idealfall bei ca. 4,5 bis 5,2 ms. Anschließend wurden die Zellen in 800 µl LB-Medium überführt und bei 37 °C 1 h inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase wurden die Zellen zentrifugiert (8000 × g, 30 s, RT), der Überstand abgenommen und 200 µl auf Agarplatten ausplattiert.

2.7.22.2 Transformation von *E. coli* durch kaltkompetente Zellen (INOUE et al., 1990; mod.)

Bei dieser Methode werden 250 ml SOB-Medium (2.5.1.6) mit einer über Nacht bei 37 °C gewachsenen 5-ml-*E. coli*-LB-Kultur inokuliert. Die SOB-Kultur wurde bei 18 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 unter leichtem Schütteln inkubiert. Dieser Wachstumsvorgang dauerte zwischen 36 und 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (3000 × g, 15 min, 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wurde zum Abwaschen von Medienresten in 80 ml eiskaltem PIPES-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3000 × g, 15 min, 4 °C) wurde das Sediment in 20 ml kaltem PIPES-Puffer aufgenommen und mit DMSO (7 %, v/v) versetzt. Nach leichtem Schwenken wurden die Zellen in 200-µl-Aliquots abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß weder zu hohe Salzkonzentrationen noch eine zu hohe Plasmidmenge die Transformationseffizienz beeinflußte. Bei einer Transformation wurden die Eppendorf-reaktionsgefäße mit den 200 µl kaltkompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurde das zu transformierende Plasmid oder der Ligationsansatz den Zellen zugegeben. Nach einer erneuten Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C (75 s) und eine Abkühlung auf Eis für 10 min. Den transformierten Zellen wurden 0,8 ml frisches LB Medium zugegeben und es erfolgte eine Regeneration für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (8000 × g, RT, 30 s), der Überstand verworfen und 200 µl auf entsprechender Antibiotika-Platte ausplattiert.

PIPES-Puffer

Komponente 1		
PIPES	756 mg	10 mM[1]
$CaCl_2$	420 mg	15 mM[1]
H_2O		ad 100 ml
pH 6,7		

Komponente 2		
KCl	4,66 g	250 mM[1]
$MnCl_2 \times H_2O$	1,72 g	55 mM[1]
H_2O		ad 100 ml

Beide Komponenten des Puffers wurden nach dem Autoklavieren zusammengegeben und mit sterilem H_2O auf 250 ml aufgefüllt.

([1] Die molaren Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration im Puffer nach Auffüllen auf 250 ml.)

2.7.22.3 Transformation von *E. coli* mit schnellkompetenten Zellen

Hierfür wurden je 2 ml einer 5-ml-LB-Übernacht-Kultur von *E. coli* auf zwei 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäße verteilt und zentrifugiert (10000 × g, 30 s, RT). Anschließend wurden der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml sterilem, eiskalten, bidestillierten Wasser aufgenommen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, um Medien und Salzreste zu entfernen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in eiskalter, steriler Glycerin-Lösung (10 % Glycerin (v/v)) aufgenommen und erneut zentrifugiert (10000 × g, 30 s, RT). Das gewaschene Zellsediment wurde jetzt in 100 µl eiskalter, steriler Glycerin-Lösung (10 % Glycerin (v/v)) aufgenommen und konnte direkt in eine Elektroporation eingesetzt werden.

2.7.22.4 Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation (MERMELSTEIN et al., 1992; mod.)

Ein anaerobes 5-ml-Hungate-Röhrchen mit 2 × YTG-Medium wurde mit einer Sporensuspension von *C. acetobutylicum* inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur diente als Inokulum für 50 ml CB-Medium (2.5.1.5). Bei einer Temperatur von 37 °C wurden die Zellen bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 inkubiert und anschließend in einer Anaerobenkammer eigener Bauart für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht. Dazu wurden die Kultur zentrifugiert (2200 × g, 10 min, 4 °C) und die Zellen mit 1 Vol. kaltem, sterilen ET-Puffer (komplettiert mit 10 mM $MgCl_2$) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2200 × g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 2 ml frischem ET-Puffer aufgenommen und

sofort jeweils 600-µl-Aliquots in gekühlte Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrodenabstand) überführt. Jetzt erfolgte die Zugabe der Plasmid-DNA (max. 2 µl, 0,1-1,5 µg). Die Zellen wurden anschließend bei 50 µF, 600 W und einer Feldstärke von 4,5 kV / cm^2 transformiert. Die Zeitkonstanten lagen bei 8-12 ms. Nach dem Stromimpuls wurden die Zellen in 1,4 ml 2×YTG-Medium überführt und regenerierten 4 h bei 37 °C. Anschliessend wurden je 200 µl auf Selektiv-Medienplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation von 2-7 Tagen bei 37 °C konnten die entstandenen Kolonien auf Flüssigmedien überimpft werden. Aufgrund einer Restriktionsendonuklease von *C. acetobutylicum* werden nicht methylierte Plasmide nach der Transformation sofort wieder abgebaut. Deshalb erfolgte vor der Transformation eine *in vivo*-Methylierung der Zielplasmide in einem *E. coli* Stamm, der eine Methyltransferase trug (MERMELSTEIN und PAPOUTSAKIS, 1993). Dieses Plasmid pANS1 (BÖHRINGER, 2002) besitzt keinen Replikationsursprung für Clostridien und musste somit nicht aus der zu transformierenden Plasmidpräparation entfernt werden. Nach einer Präparation der Plasmide mittels „GFX™ Micro Plasmid Prep-Kit“ (2.7.8) war es möglich, die gereinigten Plasmide in die Transformation einzusetzen.

ET-Puffer (pH 6.0)

Saccharose	92,42 g	270 mM
$Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$	0,71 g	4 mM
NaH_2PO_4	0,12 g	1 mM
Resazurin	0,5 mg	2 mM
H_2O		ad 1000 ml

2.7.22.5 Konjugation von *C. sporogenes* (PURDY et al., 2002)

Für Konjugationsexperimente wurde der *E. coli*-Donorstamm CA434 mit dem zu übertragenden Plasmid in LB-Medium aerob über Nacht angezogen. Ein 1-ml-Aliquot wurde 1 min bei 10000 × g zentrifugiert und das Zellsediment wurde in der Anaerobenkammer in 1 ml sterilem, anaeroben PBS-Puffer (1,5 mM KH_2PO_4; 4,2 mM Na_2HPO_4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) sehr vorsichtig suspendiert, um ein Abscheren der konjugativen Pili zu verhindern. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 200 µl einer über Nacht in MES-Medium gewachsenen *C. sporogenes*-Kultur aufgenommen. In der Anaerobenkammer wurde dieses Gemisch auf gut getrocknete 2 × YTG-Medium-Agarplatten in 10-µl-Tropfen verteilt und bei

37 °C für 7 h anaerob inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2- bis 3mal mit jeweils 0,5 ml sterilem PBS-Puffer von der Agarplatte abgewaschen. Das Konjugations-gemisch wurde auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert und anaerob bei 37 °C über 3 Tage inkubiert. Eine Selektion gegen den *E. coli*-Stamm erfolgte mit Spectinomycin (50 mg/ml, H_2O), das unwirksam gegen Clostridien ist, aber *E. coli* hemmt (BÖHRINGER, 2002).

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

Zur Selektion erfolgreich ligierter Plasmide konnte im Fall der pUC-Vektoren die X-Gal-Färbung verwendet werden. Durch eine Deletion (*laqI*qZDM15, VIEIRA und MESSING, 1982) war es den verwendeten *E. coli*-Stämmen XL1-Blue und SURE nicht möglich, eine funktionsfähige β-Galactosidase zu bilden. Dieser Defekt konnte durch einen Plasmid-kodierten Genort (*lacPOZ*') ausgeglichen werden. Diese räumliche Trennung war die Grundlage einer Selektion, die die Replikation des gesuchten Plasmids voraussetzt. Der Genort (*lacPOZ*') ist in den verwendeten Plasmiden in der MKS („Multiplen-Klonierungs-Stelle“) lokalisiert. Die Ligation eines DNA-Fragments in diese MKS konnte somit das Gen inaktivieren, dadurch konnte keine funktionierende β-Galactosidase mehr gebildet werden. Das Substratanalogon X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid) bildet im hydrolisierten Zustand in Verbindung mit Sauerstoff, katalysiert durch die β-Galactosidase, einen blauen Farbstoff aus. Dadurch konnten Kolonien, die weiß blieben, als diejenigen erkannt werden, welche keine funktionsfähige β-Galactosidase mehr hatten und somit Plasmide besaßen, die ein einkloniertes DNA-Fragment trugen. Eine ständige Derepression des *lacPOZ*' wurde durch den Induktor IPTG gewährleistet. Zur Ausführung des Tests wurden jeweils 1 h vor Verwendung, 40 µl X-Gal-Lösung (2.5.3) und 40 µl IPTG-Lösung (2.5.3) auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert und diese getrocknet. Die Anzucht auf Selektiv-Agarplatten, gewährleistete, dass alle Kolonien Plasmide trugen.

2.7.24 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (SAMBROOK et al., 2001)

Zur Herstellung von DNA-Sonden für Gelretardationsexperimente (2.8.13) wurden mit *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte radioaktiv markiert. Dabei wurden 50 ng dephosphoryliertes (2.7.18.2) PCR-Produkt mit 1x Klenow-Puffer, 2 U Klenow-Fragment (MBI-Fermentas GmbH; St.Leon-Roth), 2 µl [α-32P]dTTP [10 mCi/ml] und H_2O ad 30 µl versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75 °C für 10 min gestoppt und mit „MicroSpinTM G-25 Columns" (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg) aufgereinigt. Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurde die Radioaktivität vor und nach dem Beladen der Säulchen gemessen. Der Einbau lag bei dieser Methode zwischen 0,5 und 30 %.

2.8 Arbeiten mit Proteinen

2.8.1 Herstellung von zellfreien Extrakten

Um Proteine aus Zellen zu extrahieren, wurden verschiedene Methoden zum Aufschluß der Zellen verwendet.

2.8.1.1 French® Pressure Cell-Press

Durch die „French® Pressure Cell-Press“ (G. HEINEMANN Ultraschall- und Labortechnik; Schwäbisch Gmünd) werden die Bakterien mit einem Druck von 12,5 MPa durch eine Düse aus der gekühlten Druckzelle gepresst. Durch die folgende Entspannung platzen die Zellen und geben ihren Zellinhalt frei. Durch die Verwendung von anaerobisierten Hungate-Röhrchen war es möglich, in einem völlig anaeroben System zu arbeiten. *E. coli* benötigte hierbei zur fast vollständigen Zellöffnung (Kontrolle durch das Mikroskop) nur 1-2 Durchgänge durch die Presse, während bei *C. acetobutylicum* 10 und mehr Durchgänge nötig waren. Die entstandenen Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (30 min, 14000 × g, 4 °C) und der Überstand, der Protein-Rohextrakt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei nicht sofortigem Gebrauch mit 20 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert.

2.8.1.2 „Ribolyser™ Cell Disruptor“

Um kleine Volumina Zellsuspension quantitativ aufzuschließen, wurde der „Ribolyser™ Cell Disruptor“ (Hybaid GmbH, Heidelberg) verwendet. In diesem Gerät werden die Zellen durch geschüttelte Glaskugeln mechanisch zerstört. Nach der Zellernte wurden die Kulturen zentrifugiert (1 min, 10000 × g, 4 °C) und das Zellsediment in Aufschlusspuffer (20 mM KP-Puffer, pH 7,0) gelöst. Anschließend wurden 250 mg Glaspartikel (150-212 mm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) mit 600 ml Zellsuspension in das Schraubdeckelgefäß überführt und bei 6,5 m/s für 45 s im Gerät geschüttelt. Durch Reibungsenergie entstand Wärme in den Schraubdeckelgefäßen. Um ein Denaturieren der Proteine zu verhindern, wurden die Gefäße zwischen mehreren Schüttelvorgängen auf Eis gekühlt. Abhängig von einer mikroskopischen Kontrolle wurden die Schüttelvorgänge zwischen 3- und 7x wiederholt. Anschließend folgte eine Zentrifugation (30 min, 14000 × g, 4 °C), nach der der Überstand (Rohextrakt) abgenommen, mit 20 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert wurde.

2.8.1.3 Ultraschall

Für den aeroben Zellaufschluss von *C. acetobutylicum*-Zellen mittels Ultraschall wurden in der logarithmischen Phase des Wachstums 50 ml Kultur geerntet. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Zellsediment wurde in 50 ml Waschpuffer (TRIS-HCl, 50 mM, pH 7,6) gelöst und gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 5000 × g bei 4 °C) wurde das Sediment in 500 µl Aufschlusspuffer (TRIS-HCl, 50 mM, pH 7,6; Na-EDTA, 5 mM, PMSF, 1,4 mM) suspendiert und der ganze Ansatz in ein 2-ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Jetzt erfolgte der Zellaufschluss im Ultraschalldesintegrator (Sonifier W-250, Branson Sonic Power, Danbury USA) bei einer Pulsfrequenz von 20 % einer Leistung von 30 W (output2) für 10 min. Um ein Denaturieren der Proteine durch die entstandene Hitze zu verhindern, wurde das Gefäß die ganze Zeit über in einem Eisbad gekühlt. Die entstandenen Zelltrümmer wurden zentrifugiert (30 min, 14000 × g, 4 °C) und der Überstand, der Protein-Rohextrakt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei nicht sofortigem Gebrauch mit 20 % Glycerin (v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert.

2.8.2 Proteinbestimmungen an zellfreien Extrakten

2.8.2.1 Proteinbestimmung nach BRADFORD, 1976; mod.

Durch die Methode von BRADFORD (1976) ist es möglich, Proteinkonzentrationen mit einfachem, quantifizierbaren Farbnachweis im Photometer (Ultrospec® 3000, Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) bei 595 nm Wellenlänge zu bestimmen. Hierzu wurden die Proben bis in den linearen Bereich der mitgeführten Kalibrierung (RSA oder Ovalbumin) verdünnt und mit H_2O auf 800 µl aufgefüllt. Zum Starten der Reaktion wurden 200 µl Bradfordreagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) dazugegeben und der Ansatz 10 min bei RT unter zweimaligem Mischen inkubiert. Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte durch einen direkten Vergleich der erstellten Kalibriergeraden und den ermittelten Werten der Proben.

2.8.2.2 Proteinbestimmung mit Nanoquant™

Diese Methode basiert auf der Methode von BRADFORD (1976). Für jeden Ansatz wurde das Bradfordreagenz (5fach, Roti®-Nanoquant™, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) frisch 1:5 (v/v) verdünnt. Die Probe wurde in den linearen Bereich hinein verdünnt und auf 200 µl mit H_2O aufgefüllt. Zum Starten der Reaktion wurden 800 µl des verdünnten Bradfordreagenz zum Ansatz gegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Ansätze bei OD_{590} und bei OD_{450} gemessen. Der Quotient OD_{590}/OD_{450} wurde berechnet und in die Gleichung der Kalibriergeraden eingesetzt (ZOR und SELINGER, 1996). Durch diese Methode konnten die immer wieder auftretenden Schwankungen der Messung nach BRADFORD (1976) minimiert werden.

2.8.2.3 BCA-Proteinbestimmung

Bei dieser Methode enthält der Testansatz das Natriumsalz von „Bicinchoninic acid“ (BCA) und Kupfer-II-Ionen (SMITH et al., 1985). Bei der Biuret-Reaktion (LEVIN und BRAUER, 1951) reduzieren Proteine aus der Probe im alkalischen Milieu Kupfer-II-Ionen im Testansatz zu Kupfer-I-Ionen. Diese bilden mit BCA im Verhältnis 1:2 einen purpurnen Farbkomplex.

Beide vom Hersteller mitgelieferten Lösungen „Reagent A“ und „Reagent B“ wurden im Verhältnis 50:1 zum BCA-Arbeitsreagenz vermischt. Zu 0,1 ml Probe wurden 2 ml BCA-Arbeitsreagenz gegeben und 30 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen der Testansätze auf Raumtemperatur wurde die Extinktion jeder Probe bei 562 nm gegen eine Wasserreferenz gemessen. Die Kalibrierreihe wurde als Doppelbestimmung mit Verdünnungen einer Rinderserumalbumin-Stammlösung (2 mg/ml, Pierce, Weiskirchen) erstellt. Der lineare Messbereich lag zwischen 0-200 µg Protein/ml, die Nachweisgrenze bei 20 µg Protein/ml.

In einem anderen Ansatz wurden Mikrotiterplatten nach entsprechendem Protokoll des Herstellers verwendet, um größere Mengen Proben zu quantifizieren. Dazu wurden 25 µl der Probe und 200 µl BCA-Arbeitsreagenz zusammen in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Absorption der Proben im Mikrotiterplattenphotometer bei 562 nm detektiert. In Abhängigkeit der mit Hilfe von BCA-Standard-Lösungen erstellten Kalibriergerade konnte dann die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.8.3 Nachweis der Enzymaktivität von Cytochrom P450 CYP2BI mittels Resorufin (LUBET et al., 1985)

Cytochrom P450 2B1 aus der Rattenleber kann in Verbindung mit einer NADPH-P_{450}-Oxidoreduktase als Elektronendonor und einem Cytochrom b5 als Elektonenüberträger Monooxygenase-Reaktionen katalysieren. In diesem Testsystem wird 7-Pentoxyresorufin durch ein intaktes Cytochromsystem dealkyliert und das dabei entstandene Resorufin kann in einem Fluorimeter quantifiziert werden. Die Anregungswellelänge betrug hierbei 530 nm und die Emissions-Wellenlänge des Resorufins lag bei 585 nm. Auf einen ml Testansatz kamen hierbei 885 µl PROD-Puffer (Pentoxyresorufin-Dealkylierungs-Puffer), 100 µl Probe, 5 µl Pentoxyresorufin Lösung (1 mM in DMSO, dunkel bei 4 °C gelagert), 5 µl CB-Enzyme (humane P_{450}-Oxidoreduktase und Cytochrom b5; NatuTec GmbH, Frankfurt) und zum Start der Reaktion 5 µl NADPH-Lösung (100 mM, dunkel gelagert bei -20 °C). Nach Zusammengeben wurden die Testansätze 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend gemessen. Die Werte wurden in emittierten Photonen / Sekunde gemessen und an einem PC aufgezeichnet. Als Kontrolle wurden Ratten-Supersomen verwendet, diese enthalten CYP2B1, P_{450}-Oxidoreduktase und Cytochrom b5. Als Proben wurden Kulturüberstände,

Membranprotein-Fraktionen und Cytosolprotein-Fraktionen von rekombinanten Bakterienstämmen verwendet.

PROD-Puffer		
TRIS	1,211 g	50 mM
$MgCl_2 \times 7\ H_2O$	0,121 g	3 mM
H_2O	ad 200 ml	
pH 7,5; eingestellt mit HCl		

2.8.4 Bestimmung der Cytotoxizität des rekombinanten Enterotoxins (CPE) von *C. perfringens*

Um Kulturüberstände rekombinanter Clostridien-Stämme auf cytotoxische Komponenten zu untersuchen, wurde ein Zellkultur-Experiment durchgeführt. Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie CAPAN1 wurden in DMEM-Medium (Dulbecco modified Eagle medium; Gibco-BRL, Karlsruhe, Germany) mit 10 % FCS (fötales Kälber-Serum) bis zu einer Konfluenz von 80 % gezogen und anschließend bis zu 2 h bei 37 °C mit den zu testenden Proben inkubiert. Nach 2 h wurden die noch adhärenten Zellen mit einer Färbelösung fixiert und gefärbt (0,5 % Kristallviolett (w/v) gelöst in 20 % Methanol (v/v)). Anschließend wurden die Zellen 3 × gewaschen und dann getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Zellen in 500 µl 10 % Essigsäure (v/v) gelöst und die gefärbte Lösung wurde bei 495 nm im ELISA-Photometer (ELISA Lesegerät SLT Spectra, Salzburg) quantifiziert. Als Proben wurden unbehandelte Kulturüberstände und über Mikrokonzentrator-säulen (2.7.10.5) konzentrierte Überstände rekombinanter *C. acetobutylicum*-Stämme verwendet.

2.8.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Für verschiedene Methoden war es notwendig, die Konzentration von Proteinen in einer Lösung zu erhöhen. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet. Bei Nachweisreaktionen von geringen Mengen Protein (100 µg / ml – 5 mg / ml) war eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen und dafür wurde die TCA-Fällung verwendet. Für funktionale Analysen von Proteinen in Enzymtests wurden schonendere Methoden angewandt, die eine

Denaturierung der Enzyme verhindern sollten. Hierfür wurden Mikrokonzentratorsäulen und die Dialyse verwendet.

2.8.5.1 Mikrokonzentratorsäulen

Die Konzentration erfolgte je nach Volumen durch Verwendung von Centricon®- oder Microcon®-Säulen (Millipore GmbH, Schwalbach). Hierbei erlaubten die verschiedenen Porengrößen von 10- bis 100- kDa-Retentionsmassen eine grobe Trennung von Proteinfraktionen sowie deren Entsalzung und partielle Konzentrierung. Die Durchführung erfolgte nach Empfehlungen des Herstellers. Diese Methode wurde auch verwendet, um Proteine im Kulturüberstand von rekombinanten *C. acetobutylicum* Stämmen von Medienresten zu trennen. Hierfür wurden der Überstand mehrmals bei 4 °C über eine Säule konzentriert und dann mit sterilem Zellkultur-PBS verdünnt und dadurch quantitativ von Salzen und anderen Mediensubstanzen gereinigt.

10x Zellkultur-PBS (pH 7,4)

KCl	2 g	26,8 mM
KH_2PO_4	2 g	14,7 mM
NaCl	80 g	1,37 M
$Na_2HPO_4 \times 7\ H_2O$	21,6 g	80,5 mM
H_2O	ad 1000 ml	

2.8.5.2 Dialyse

Bei dieser Methode werden durch Diffusion über eine semipermeable Membran kleinere Moleküle ausgetauscht (DEUTSCHER, 1990). Die Dialyse diente in dieser Arbeit hauptsächlich der Entsalzung und dem Pufferwechsel. Hierbei wurden Volumina von 1-15 ml in Dialyse-Schläuche („Visking Dialysis Cellulose Tubing“, Serva GmbH & Co KG, Heidelberg) mit einer Ausschlussgröße von 12 kDa gefüllt und diese mit Dialyse-Klammern geschlossen. Die Dialyse erfolgte innerhalb von 16 h, unter ständigem Rühren bei 4 °C gegen einen in den weiteren Versuchen verwendeten Puffer mit einem 100-1000fachen Volumen der Probe. Um Proben zu konzentrieren, wurden diese in ein Bett aus PEG 20000 (Polyethylen-

Glycol) gelegt und bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration bei 4 °C inkubiert. Diese hygroskopische Substanz entzieht dem Dialyse-Schlauch das Wasser und sorgt somit für eine Konzentration der Proben.

2.8.5.3 TCA-Fällung

Um Proteine über Fällung zu konzentrieren, wurde zu einer Protein-Probe 10 %ige (v/v) TCA-Lösung (100 %ig, 500 g TCA in 227 ml H_2O) zugegeben und der Ansatz über Nacht auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 10000 × g, 4 °C) und so lange mit Ethanol-„Färber“ (95 % Ethanol (v/v), 5 % Na-Acetat (v/v, aus bei RT gesättigter Lösung), 1 Spatelspitze Phenolrot als Indikator) gewaschen (RT, 10000 × g, 10 min), bis die rote Farbe des pH-Indikators erhalten blieb. Um die Farbe danach zu entfernen, wurde mit 99 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 10000 × g, RT). Das Sediment wurde getrocknet und in einem geeigneten Probenpuffer aufgenommen.

2.8.6 Heterologe Überexpression plasmidkodierter Proteine in *E. coli*

Die heterologe Überexpression plasmidkodierter Proteine erfolgte mit Konstrukten ausgehend von den Expressionsvektoren pMM40 und unter Verwendung des pET31(+)-Vektors, der dem pET-Expressionssystem (Novagen R & D Systems, Wiesbaden) angehört, sowie dem Vektor pMalTM-p2. pMM40 und pMalTM-p2 zeichnen sich durch einen IPTG-induzierbaren P*tac*-Promoter aus, der in Abwesenheit des Induktors durch konstitutive Expression des ebenfalls auf den Plasmiden vorhandenen lacIq-Repressorgens effizient reprimiert wird. Das pET-System hat den Vorteil, dass es durch das Zusammenwirken von Expressionsstamm und -vektor nur zu einer geringen Hintergrundexpression kommt. Der hier verwendete pET31(+)-Vektor hat einen T7*lac*-Promoter, der unter der Kontrolle der T7 RNA-Polymerase steht. Das Gen für die T7 RNA-Polymerase liegt auf dem Chromosom von *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) und unterliegt dort der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters, welcher wiederum durch IPTG induziert werden kann. Zusätzlich zur Kopie auf dem Chromosom befindet sich auf dem Vektor stromabwärts vom T7*lac*-Promoter das Gen für den *lac*-Repressor, *lacI*, und die *lac*-Operator-Sequenz. In Abwesenheit von IPTG wird der *lac*-Repressor konstitutiv exprimiert und verhindert so die Bildung von T7 RNA-Polymerase. Des weiteren kann mit dem

pET31(+)-Vektor durch Einbringen des gewünschten Gens in der Multiplen Klonierungsstelle eine Fusion mit 6 Histidinen am C-Terminus erreicht werden. Zur Überexpression wurden 50-400 ml LB- oder TB-Medium mit 5 ml einer ÜN-Kultur des *E. coli*-Stamms mit dem gewünschten Plasmidkonstrukt beimpft und unter entsprechender Antibiotikaselektion bei 37 °C inkubiert. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und, im Falle einer Überexpression basierend auf pMM40 und pMalTM-p2, wurde die Kultur nach weiteren 3-4 h Inkubation geerntet (6000 x g, 15 min, 4 °C) und das Zellsediment bei -20 °C gelagert. Dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) und seinem auf pET31 basierenden Plasmid wurde zusätzlich 30 min nach Induktion mit IPTG Rifampicin in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt sollte schon genügend T7 RNA-Polymerase gebildet worden sein, 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 des Versuchs erfolgte eine Probennahme direkt vor der Induktion und dann in einstündigen Abständen. Hierzu wurde 1 ml Zellsuspension entnommen und kurz zentrifugiert (14000 x g, 30 s, RT). Die Sedimente wurden bis zum Gebrauch auf Eis oder bei -20 °C aufbewahrt. Zur Analyse wurden die Proben in einem SDS-Gel analysiert. Die Kultur wurde ebenfalls nach 3-4 h geerntet. Die Zellsedimente wurden mit 100 ml eiskaltem TE-Puffer gewaschen und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.8.7 Affinitätschromatographie an Nickel-NTA

Histidin besitzt eine hohe Affinität zu Nickel und man kann es deshalb verwenden, um spezifische rekombinante Proteine aufzureinigen. Hierfür werden $Nickel^{2+}$-Ionen mit 4 von ihren 6 Koordinationsstellen an Agarose immobilisiert und die zu reinigenden Proteine werden so verändert, dass sie am C-Terminus einen 6fachen Histidin-Rest besitzen. Durch dessen hohe Affinität zu Nickel können die frei zugänglichen Histidine 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).

Hierbei wurden 2 ml Gelmaterial Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure, Qiagen GmbH, Hilden) in 2,5-ml-Säulen (MoBiTec GmbH, Göttingen) gegossen und mit 5 ml H_2O gewaschen. Die Äquilibrierung des Gels erfolgte mit 10 Bettvolumen Kaliumphosphat-Puffer

(20 mM, pH 7,5). Etwa 100-200 mg Gesamtprotein wurden mittels French® Pressure Cell-Press (2.8.1.1) oder mittels Ribolyzer™ (2.8.1.2) gewonnen und in Lysispuffer (20 mM KH_2PO_4, pH 7,5; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) aufgenommen. Die Proteinlösung wurde nun in 250-µl-Fraktionen auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde der Durchlauf gestoppt und die Säule bei 4 °C inkubiert, damit der Rohextrakt an die Nickelkoordinationsstellen binden konnte. Nach 1 h wurde das nicht gebundene Protein durch Waschen der Säule mit 10 Bettvolumen KP-Puffer (20 mM KH_2PO_4, pH 7,5; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol) entfernt. Um zu ermitteln, bei welcher Imidazol-Konzentration das gesuchte Protein eluiert werden konnte, wurden in Vorversuchen ein Stufengradient von 50-300 mM Imidazol in jeweils 50-mM-Schritten über die Säule gegeben und die Fraktionen anschließend über SDS-PAGE (2.8.9) analysiert. So konnte die optimale Waschkonzentration ermittelt werden, bei der das Protein gerade noch nicht eluierte. Im Hauptversuch wurde dann wie oben das Protein aufgetragen und mit 5 Bettvolumen der ermittelten Konzentration gewaschen. Anschließend konnte mit ausreichend hohen Konzentrationen das Protein in hoher Reinheit mit 2-3 Bettvolumen von der Säule eluiert werden. Das Protein wurde entweder sofort weiterverwendet oder mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem N_2 bei -196 °C schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Die Säule konnte mit 10 Bettvolumen Essigsäure (0,2 M), 10 Bettvolumen Glycerin (10 %, v/v) und 10 Bettvolumen H_2O regeneriert werden. Eine Lagerung erfolgte bei 4 °C in Ethanol (30 %, v/v).

2.8.8 Phosphorylierung von Proteinen

Das Protein wurde durch Inkubation für 30 min bei RT mit 50 mM Acetylphosphat in entsprechendem Puffer phosphoryliert (BALDUS et. al., 1994) und sofort in weiterführenden Gelretardationsexperimenten (2.8.13) eingesetzt.

2.8.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (PAGE)

Proteinen wurden in polymerisierte Acrylamid-Gele entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Dazu wurden Plattengel-Apparaturen der Größen 11 × 7 × 0,1 cm (Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) verwendet. Die negativ geladenen Proteine wanderten im Spannungsfeld in Richtung Kathode. Die Spannung wurde über ein Netzgerät

(Gene Power Supply GPS 200/400, Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) eingestellt und kontrolliert.

2.8.10 Denaturierende diskontinuierliche SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekularmasse und zur Reinheitskontrolle von Proteinanreicherungen wurden Polyacrylamid-Gele hergestellt, die aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestanden. Das Trenngel und das Sammelgel unterschieden sich hierbei durch pH und Ionenstärke des verwendeten Puffers sowie in der Acrylamid-Konzentration. Bei den verwendeten pH-Werten lagert sich SDS mit seinem hydrophoben Ende mehrfach in die Proteine ein, und nach Dissoziation der Natrium-Ionen von den Dodecylsulfat-Molekülen maskiert deren negative Ladung die Eigenladung der Proteine. Dadurch ist gewährleistet, dass alle Proteine eine negative Ladung besitzen und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Auftrennung erfolgt dabei im Idealfall nur über das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine aufgrund ihrer Größe. Hierbei können kleinere Proteine leichter durch die Polyacrylamid-Matrix wandern und gelangen somit schneller zur Anode. Die verwendeten Glasplatten wurden vor der Herstellung der Gele mit Wasser und Ethanol gereinigt und mit Dichtungsgummis versehen. Anschließend wurden die Acrylamidlösung, die N,N'-Methylenbisacrylamidlösung und Wasser in den in Tabelle 9 angegebenen Konzentrationen und Mengen zugegeben und vermischt. Nach Zugabe von TEMED und SDS-Lösung erfolgte der Start der Polymerisation durch Zugabe einer stets frisch angesetzten APS (Ammoniumpersulfat)-Lösung. Die Lösung wurde nun zügig und luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Gelplatten bis ca. 2 cm unter die Oberkante der Ohrenplatte gegossen. Das Trenngel wurde dann mit 1-Butanol oder Wasser überschichtet, um eine plane Oberfläche zu gewährleisten. Nach ca. 1 h war das Gel polymerisiert, und nach Abgiessen des Überschichtungsmaterials wurde das Sammelgel darüber gegossen und zur Ausformung der Taschen (10-20 ml) ein Kamm in das noch nicht auspolymerisierte Sammelgel gesteckt. Nach 30 min Polymerisation wurde das Gel für die Elektrophorese verwendet. Die angegebenen Volumina sind ausreichend für Gele der Größe 11x7x0,1 cm.

Tabelle 9: SDS-PAGE Gel-Zusammensetzung

Acrylamid-Konzentration (w/v)		**10 %**	**12 %**	**15 %**	**Sammelgel (4 %)**
Acrylamid-Lösung (40 %, w/v)	[ml]	1,90	2,20	2,80	0,44
N,N'-Methylen-Bisacrylamid-Lösung (2 %, w/v)	[ml]	0,95	1,10	1,40	0,22
Sammelgel-Puffer	[ml]	-	-	-	0,50
Trenngel-Puffer	[ml]	1,50	1,50	1,50	-
H_2O	[ml]	3,05	2,60	1,70	3,75
TEMED	[µl]	10	10	10	10
SDS (10 %, w/v)	[µl]	75	75	75	50
APS-Lösung (10 %, w/v)	[µl]	50	50	50	50

Protein-Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. des 5fach Denaturierungspuffers bei 100 °C für 5 min gekocht und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proben direkt mit einer Pipette in die vorgeformten Taschen des mit SDS-Elektrophorese-Puffer überschichteten Gels pipettiert. Nach Auftragung wurde das Gel mit 80 V gestartet und sobald die Bromphenolblaubande die Trenngelfront erreicht hatte, wurde auf 150 V erhöht. Nach ca. 1-2 h hatte die Bromphenolblaufront die untere Gelkante des Trenngels erreicht (je nach Trennstrecke und Größe des Gels), und das Gel konnte entnommen werden.

Trenngel-Puffer

TRIS	68,8 g	2,17 M
H_2O	ad 250 ml	

pH 8,8 mit HCl eingestellt

Sammelgel-Puffer

TRIS	37,8 g	1,25 M
H_2O	ad 250 ml	

pH 6,8 mit HCl eingestellt

Denaturierungs-Puffer

Sammelgel-Puffer	5,0 ml
β-Mercaptoethanol	5,0 ml
Glycerin (87 %, v/v)	11,6 ml
SDS	2,0 g
Bromphenolblau	10 mg
H_2O	ad 50 ml

SDS-Elektrophorese-Puffer (10fach)

TRIS	30,3 g	0,25 M
Glycin	144,2 g	1,92 M
SDS	10,0 g	1 % (w/v)
H_2O	ad 1000 ml	

2.8.11 Western-Transfer: Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulose

Um Proteine von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose zu übertragen, wurde folgende Methode angewandt (modifiziert nach TOWBIN et al., 1979): Das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt, und es wurden zwei Filter aus „Whatman“ Papier (Whatman International Ltd., Maidstone; England) und eine Membran aus Nitrocellulose auf die genaue Größe des Gels zugeschnitten. Die beiden Filter und die Nitrocellulosemembran wurden in Transferpuffer gelegt und anschließend auf der „Fastblot“-Apparatur Typ B33 (Biometra, Biometra GmbH, Göttingen) angeordnet. Das ebenfalls in Transferpuffer getauchte Gel befand sich dabei auf der Nitrocellulosemembran und das ganze zwischen den beiden feuchten „Whatman“ Filtern. Die Kathode und Anode wurden ebenfalls mit dem Puffer befeuchtet. Für die Übertragung der Proteine wurde eine konstante Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 Gelfläche für zwei Stunden angelegt. Nach diesem Zeitraum waren auch große Proteine (>50 kDa) auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Transferleistung durch eine Coomassie-Färbung (2.8.12.1) des Polyacrylamidgels überprüft. Die Nitrocellulosemembran konnte sofort weiter behandelt werden.

„Semidry“-Transferpuffer

TRIS	5,8 g	48 mM
Glycin	2,8 g	37 mM
100 % Methanol	200 ml	20 % (v/v)
SDS	3,8 g	0,038 % (w/v)
H_2O	ad 1000 ml	

2.8.12 Immunofärbung von Proteinen

Nach der Übertragung der in der denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennten Proteine auf Nitrocellulose erfolgte die Immunofärbung. Hierbei wurde die Nitrocellulosemembran zuerst in einer Flüssigkeit mit hohem Proteinanteil („Blocking“-Reagenz) inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Die Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von 16 h bei Raumtemperatur unter stetigem Schütteln in einem geschlossenen Plastikgefäss. Als „Blocking“-Reagenz diente 0,1 % Schweine-Gelatine ((w/v), aufgekocht in PBS-Puffer mit 0,05% Tween 20). Es wurden jeweils 10 ml Wasch- und Reaktionslösungen für Nitrocellulosemembranen von 8,6 cm x 5,5 cm verwendet. Anschließend wurde die Membran 3 ×, für jeweils 5 min, bei RT mit frischem PBS-Tween-Puffer gewaschen, um überschüssiges „Blocking“-Reagenz zu entfernen. Jetzt erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers gegen das auf der Membran immobilisierte Protein. Die Antikörper wurden hierfür in 10 ml PBS-Tween Puffer verdünnt und der Ansatz zur Membran zugegeben. Nach einer Inkubation (1 h, RT unter Schütteln) wurde erneut 3 × gewaschen, um die nichtgebundenen Reste des Antikörpers zu entfernen. Anschließend wurde der zweite, Meerettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper gegen die Epitope des Erst-Antikörpers zugegeben und erneut inkubiert (1 h, RT, unter Schütteln). Jetzt erfolgten 5-7 Waschschritte der Nitrocellulosemembran für jeweils 5 Minuten auf dem Schüttler mit je 10 ml PBS-Tween-Puffer. Zur Detektion des Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers wurde das Chemo-lumineszens-„Kit“ NOWA (EnerGene, Regensburg) verwendet. Dazu wurde die Membran zwischen Kopierfolien gelegt und ein Röntgenfilm für 1-10 Minuten aufgelegt und anschließend entwickelt. Der verwendete NOWA „Kit“ enthält Luminol, das durch die Meerrettich-Peroxidase unter Lichtemission zu 3-Aminophthalat oxidiert wird.

Natriumphosphat-Tween Puffer pH 7,4 (PBS)

NaH_2PO_4	1,8 g	15 mM
NaCl	5,84 g	100 mM
Na_2HPO_4	12 g	85 mM
Tween 20	500 µl	0,05% (v/v)
H_2O	ad 1000 ml	

2.8.12.1 Coomassie-Färbung (WEBER und OSBORN, 1969; mod.)

Zu färbende Polyacrylamid-Gele wurden bei Raumtemperatur für 20-30 min unter leichtem Schwenken in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Dadurch wurde das gesamte Gel blau gefärbt. Der nicht an das Protein gebundene Farbstoff konnte durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbelösung über einen Zeitraum von 2-24 h entfernt werden. Diese Methode erlaubt eine Quantifizierung der Proteinmenge abhängig von der Bandenintensität. Die Nachweisgrenze für einzelne Proteine liegt bei 100 ng.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue G 250	2,4 g
Methanol	454 ml
Essigsäure (100 %)	92 ml
H_2O	ad 1000 ml

Vor Verwendung über einen Faltenfilter filtriert

Coomassie-Entfärbelösung

Methanol	330 ml
Essigsäure (100 %)	100 ml
H_2O	ad 1000 ml

2.8.12.2 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen (BLUM et al., 1987)

Aufgrund der der unteren Nachweisgrenze von 2-5 ng pro Bande wurde bei geringen Proteinmengen die Silberfärbemethode verwendet. Hierbei wurden die Gele im Anschluss an

die Elektrophorese bei Raumtemperatur für mindestens 30 min oder über Nacht in Fixierlösung inkubiert. Die Lösung wurde durch zweimaliges Waschen für 10 min mit Ethanol (50 %, (v/v)) entfernt und anschließend wurde das Gel 1 min in Thiosulfatlösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit H_2O für jeweils 30 s erfolgte eine 15minütige Inkubation in frisch angesetzter Silbernitratlösung. Die Reste der Lösung wurden durch zweimaliges Waschen des Gels für 30 s mit H_2O entfernt. Durch Zugabe der Entwicklerlösung erfolgte dann die Visualisierung der Banden. War die gewünschte Bandenintensität erreicht, wurde die Entwicklerlösung entfernt, das Gel kurz mit H_2O gespült und anschließend die „Stopp“-Lösung darüber gegeben. Die Gele konnten jetzt ausgewertet und in einer Videodokumentationsanlage fotografiert werden.

Fixierlösung

Methanol	500 ml	12,27 M
Eisessig	120 ml	2,1 M
Formaldehyd (37 % (v/v))	0,5 ml	0,05 % (v/v)
H_2O	ad 1000 ml	

Silbernitratlösung

$AgNO_3$	0,2 g	11,77 mM
Formaldehyd (37 % (v/v))	75 µl	0,0075 % (v/v)
H_2O	ad 100 ml	

Die Lösung wurde erst kurz vor Nutzung frisch angesetzt.

Thiosulfatlösung

$Na_2S_2O_3 \times 5\ H_2O$	0,2 g	0,81 mM
H_2O	ad 1000 ml	

Entwicklerlösung

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

„Stopp“-Lösung

EDTA	18,6g	50 mM
H_2O	ad 1000 ml	

2.8.13 Radioaktive Gelretardationsexperimente

Im radioaktiven Gelretardationsexperiment wurde 1-2 ng radioaktiv markierte DNA-Sonde (2.7.24) eingesetzt. Die Äquilibrierung der DNA-Sonden mit den Proteinen erfolgte in 20-µl-Ansätzen mit folgender Zusammensetzung:

2 µl	Bindungspuffer (10x)
2 µl	Glycerin
2 µl	DTT (10 mM)
2 µl	Poly-[d(I-C)] (1 mg/ml)
1,2 µl	DNA-Sonde (1-2 ng)
10,8 µl	Protein in 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4)

Bindungspuffer (10x):

TRIS	6,06 g	500 mM
KCl	3,73 g	500 mM
$MgCl_2$	1,62 g	50 mM
BSA	100 mg	0,1 % (w/v)
EDTA	0,29 g	10 mM
H_2O	ad 100 ml	

pH 7,4; Lagerung in Aliquots bei -20 °C

Die radioaktiv markierte Sonde wurde zuletzt zugegeben, die Proben vorsichtig gemischt und 15 min bei 30 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 2 µl 10x Ladepuffer versetzt und in einem Polyacrylamidgel in 1x TBE elektrophoretisch für 2 h bei 130 V aufgetrennt. Als Netzgerät diente ein Gene Power Supply GPS 200/400 (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg). Nach Beenden des Gellaufs wurde das Gel aus der Plattengelapparatur für Minigele der Größe 11 × 7 × 0,1 cm (Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) gelöst und vorsichtig auf ein Whatman-Papier (Whatman International Ltd., Maidstone; England)

gelegt und mit Haushaltsfolie bedeckt. Unter Vakuum wurde mit der "Vacu gene pump" (Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg) das Gel 30 min bei 55 °C getrocknet und in eine Exponierkassette gelegt. In Abhängigkeit von der Stärke des Signals wurde für 2-48 h an einer "BAS-MP Phosphor Imaging Platte" (Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf) autoradiographiert. Mit Hilfe des "Bio Imager Fujix BAS 1000" und dem Programm "Mac Bas 1000 Image Reader" wurde das Signal digitalisiert und mit dem "Mac Bas V 2.31"-Programm ausgewertet.

Ladepuffer (10x)

Bromphenolblau	25 mg	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	25 mg	0,05 % (w/v)
Glycerin	15 g	30 % (w/v)
H_2O		ad 50 ml

Polyacrylamidgel

TBE (5x)	4,5 ml
Acrylamid 40 % (w/v)	4,4 ml
N,N'-Methylen-Bisacrylamid-Lösung (2 %, w/v)	3 ml
H_2O	10,6 ml
TEMED	11,3 µl
APS 10 %	112,6 µl

2.8.14 Isolation bakterieller Cytosol- und Membranproteine (PENECKY und COON, 1996)

Zur Untersuchung membrangebundener und cytosolischer Proteine wurden diese getrennt. Nach der Zellernte wurden die Zellen mit Puffer A (20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 5 mM Na-EDTA; 50 mM KCl) gewaschen und anschliessend in 1 ml des Puffers aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte im Ribolyser™ (2.8.1.2). Nach einer anschliessenden Zentrifugation bei 4 °C, 15000 x g für 15 min. wurde der Überstand in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Die Probe wurde 1 h bei 4 °C und 45000 x g zentrifiugiert. Die im Überstand enthaltenen Cytosolproteine wurden vorsichtig abgenommen und mit 0,2 Volumen Glycerin gemischt und zur weiteren Verwendung bei -70 °C

eingefroren. Das Sediment wurde in 1,5 ml Puffer B (50 mM Trisacetatpuffer pH 7,4; 1 mM Na-EDTA; 0,8 M KCl) suspendiert und erneut bei 45000 x g für 1h, bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 100 µl Puffer C (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4; 1 mM Na-EDTA) aufgenommen. Diese Membranfraktion wurde mit 0,2 Volumen Glycerin versetzt und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.9 Rekombinante Clostridien-Sporen im Tierversuch

Die verwendeten „NMRI nu/nu“-Mäuse wurden unter sterilen Bedingungen gezüchtet. Zur Induktion des Tumorwachstums wurden den Mäusen 1 x 10^6 CAPAN1-Tumorzellen in die Flanke injiziert. Nach einem 3-4 wöchigen Tumorwachstum auf ca. 1 cm Tumordurchmesser wurden die Mäuse mit Ether betäubt und jeder Maus wurden ca. 2 x 10^7 rekombinante Sporen in 100 µl PBS-Zellkultur-Puffer entweder in die Schwanzvene oder direkt intratumoral injiziert. Der weitere Verlauf des Tumorwachstums wurde verfolgt und die Grösse des Tumors alle drei Tage vermessen. Nach ca. 2 Wochen wurden die Tiere in der Versuchstierdiagnostik Labor Dr. Maier der Universität Ulm getötet und die Leber, Milz und die Tumore auf Besiedelung mit den eingesetzten Clostridien untersucht.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Entwicklung rekombinanter *C. acetobutylicum* Sporen für die CDEPT (Clostridial Directed Enzyme Prodrug Therapy)

3.1.1 Stand der Forschung zu Beginn dieser Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits versucht, die cDNA des Cytochrom P_{450}2B1 (CYP2B1) aus *Rattus norvegicus* in *E. coli* und *C. acetobutylicum* zu exprimieren (BÖHRINGER, 2002 und BARTH, 2001). Die dabei entstandenen Vektoren wurden freundlicher-weise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Von M. Böhringer wurde der *E. coli – Clostridium acetobutylicum* Schaukel-Vektor pCYP10 bereitgestellt, welcher den Promoter des *ptb-Operons* (Transbutyrylase) aus C. *acetobutylicum* trägt. In der Arbeit von (BARTH, 2001), ist eine Anzahl von *E. coli*-Vektoren auf der Basis des IPTG induzierbaren Expressionsvektors pMM40 entstanden. Um eine bessere Expression von *cyp2b1* zu gewährleisten, wurde in dem Vektor pMM41 die Sequenz der Ribosomenbindestelle AGGA der Shine-Dalgarno-Sequenz UAAGGAGGU angepasst (SHINE und DALGARNO, 1974). In die Vektoren pMM40-K und pMM41-K wurde jeweils das *cyp2b1*-Gen mit gekürztem 5`-Bereich ligiert. Hierbei wurde der Genbereich, der für die Aminosäuren 3-20 codiert, die als Membrananker und Signalpeptid dienen, abgeschnitten. In die Vektoren pMM40-V und pMM41-V wurde das *cyp2b1*-Gen mit verändertem 5`-Bereich eingebracht. Um eine Erhöhung der Translation zu erreichen, wurde der A/T-Gehalt der ersten 5 Aminosäure-Codons erhöht und das zweite Codon komplett ausgetauscht (BARTH, 2001). Trotz wiederholter Versuche war es bis zu diesem Zeitpunkt aber nicht gelungen, eine Expression des Cytochroms P_{450} im Western-Transfer nachzuweisen, obwohl in RT-PCR- Versuchen ein eindeutiges mRNA-Transkript zu detektieren war.

3.1.2 Untersuchung des Genoms von *C. acetobutylicum* auf Cytochrom P_{450}-Homologe

Durch die Veröffentlichung des Genoms von *Clostridium acetobutylicum* (NÖLLING et al., 2001) war es möglich in diesem Stamm nach Cytochrom P_{450}-Genen zu suchen. Ein Vorhandensein dieser Gene würde die bislang noch nicht bewiesene Existenz einer Häm-

Synthese in *C. acetobutylicum* untermauern. Im Genom wurden Gene verschiedener Vorstufen der Häm-Synthese, die δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase und Uroporphyrinogen III entdeckt. Diese Gene weisen Homologie zu den entsprechenden Genen aus *Bacillus subtilis* auf. Uroporphyrinogen III ist ein zentrales Intermediat der Porphyrinbiosynthese. An dieser Stelle trennen sich die Stoffwechselwege, die entweder zu einer Bildung von Häm und Bakteriochlorophyllen oder zur Bildung von Sirohäm und Corrinoiden führen, auf. Um eine erfolgreiche Synthese und Funktionalität von CYP2B1 in *C. acetobutylicum* zu gewährleisten, muss Häm zum Einbau in das fertige Enzym in ausreichender Menge vorhanden sein. Für die Existenz einer funktionierenden Häm-Synthese spricht das Genprodukt des *C. acetobutylicum* Gens *cac*3330, welches eine Ähnlichkeit von 76 % und eine Identität von 59 % zu einem Cytochrom P_{450} (CypC) aus *B. subtilis* aufweist (Abbildung 3). Das Enzym CypC hat hier die Funktion einer Peroxygenase.

```
3   LKENTAKDKGIDSTLDLLKEGYLFIKNRADHYQSDLFETRLMGQRIICMTGEEAARIFYD 62
    + E    DK +D++L LLKEGYLFIKNR + Y SDLF+ RL+G+  ICMTG EAA++FYD
1   MNEQIPHDKSLDNSLTLLKEGYLFIKNRTERYNSDLFQARLLGKNFICMTGAEAAKVFYD 60

63  SDKFKRQGAAPKRVQETLLGENAIQTLDGESHLHRKKLFMLLTNQVQQKRLAELTTEKWE 122
    +D+F+RQ A PKRVQ++L G NAIQ +DG +H+HRK LF+ L     QKRLAEL TE+W+
61  TDRFQRQNALPKRVQKSLFGVNAIQGMDGSAHIHRKMLFLSLMTPPHQKRLAELMTEEWK 120

123 ASASKWH-TKSIVLFNEANEILCQVACHWAGVPLMESDIKNRAEDFSSMIDSFGAVGPRH 181
    A+ ++W     +VLF EA EILC+VAC+WAGVPL E+++K RA+DF  M+D+FGAVGPRH
121 AAVTRWEKADEVVLFEEAKEILCRVACYWAGVPLKETEVKERADDFIDMVDAFGAVGPRH 180

182 WKGKKARNTIEAWIKEIIENVRSGRIRAEEGSPLHEIAFYIDVNGQQMPAEMAAIELINI 241
    WKG++AR   E WI+ +IE+ R+G ++   G+ LHE+AF+   +G Q+ + MAAIELIN+
181 WKGRRARPRAEEWIEVMIEDARAGLLKTTSGTALHEMAFHTQEDGSQLDSRMAAIELINV 240

242 LRPIVAISTFITFSALALYEHSEYREKLQSKDIRYLEMFTQEVRRYYPFAPFVGARVRKD 301
    LRPIVAIS F+ FSALAL+EH +Y+E L+S + R  EMF QEVRRYYPF PF+GA V+KD
241 LRPIVAISYFLVFSALALHEHPKYKEWLRSGNSREREMFVQEVRRYYPFGPFLGALVKKD 300

302 FLWNNCEFKKEMLVLLDIYGTNHDSRIWQKPYEFIPDRFRSYKGNLFDFIPQGGGDPSST 361
    F+WNNCEFKK   VLLD+YGTNHD R+W  P EF P+RF   + NLFD IPQGGG
301 FVWNNCEFKKGTSVLLDLYGTNHDPRLWDHPDEFRPERFAEREENLFDMIPQGGGHAEKG 360

362 HRCPGEGITLEIMKTSLDFLSTKIDFTVPDQDLSYSLSKIPTLPKSGFIIDNINLK 417
    HRCPGEGIT+E+MK SLDFL  +I++ VP+Q L YSL+++P+LP+SGF++  I  K
361 HRCPGEGITIEVMKASLDFLVHQIEYDVPEQSLHYSLARMPSLPESGFVMSGIRRK 416
```

Abbildung 3: Sequenzvergleich des Genprodukts von *cac*3330 aus *Clostridium acetobutylicum* mit CypC aus *Bacillus subtilis.*

RT-PCR-Versuche mit isolierter RNA aus der Säure- und der stationären Phase des Wachstums von *C. acetobutylicum* DSM 792 ergaben keinen Nachweis einer Aktivität dieses Gens. Als Oligonukleotidstarter für die RT-PCR wurde das Paar „cypRT-f“ und „cypRT-r“

verwendet. Als Produkt konnte mit chromosomaler DNA ein Fragment von 570 Bp erhalten werden, aber mit RNA verliefen die Versuche ergebnislos.

3.1.3 Expression von CYP2B1 aus *R. norvegicus* in *E. coli*

Zur Untersuchung einer Expression der rekombinanten CYP2B1-Enzyme wurden die verschiedenen hergestellten *E. coli*-Stämme in 100 ml LB-Medium angezogen (BARTH, 2001). Um eine Induktion der Proteinexpression zu erreichen, wurde in der logarithmischen Wachstumsphase 50 µl IPTG (1 M Stammlösung) zugegeben. Diese Zugabe hatte keinen messbaren Effekt auf das Wachstumsverhalten der Kulturen. Die Ernte der Proteinrohextrakte erfolgte in der stationären Phase der Kultur, nach einem Wachstum von 16 h bei 37 °C und 160 Upm, durch einen Aufschluss im Ribolyser^{TM}. Anschließend wurden die Rohextrakte in einer Ultrazentrifugation in eine Cytoplasma- und eine Membran-Fraktion aufgetrennt. In Western-Transfer-Experimenten mit polyklonalen Antikörpern gegen CYP2B1 aus *R. norvegicus* konnte eine Bildung von CYP2B1 durch die *E. coli*-Stämme mit den Vektoren pMM41-V und pMM40-V nachgewiesen werden. Das rekombinante Protein lokalisierte hierbei stets in der isolierten Membranfraktion. In Mengenabschätzungen über die Bandenintensität bei verschiedenen Western-Transfer-Versuchen zeigte der *E. coli*-Stamm mit dem Vektor pMM41-V das deutlichste Signal bei gleicher eingesetzter Proteinmenge. Weiterführende Untersuchungen wurden jetzt mit diesem Stamm durchgeführt. Der Expressionsvektor pMM41-V trägt eine der Shine-Dalgarno-Sequenz angepasste Ribosomen-bindestelle und eine Veränderung im 5'-Bereich des *cyp2b1*-Gens, welche in einem veränderten N-terminalen Bereich des CYP2B1-Proteins resultiert (Abbildung 4).

cDNA von *cyp2b1*	ATG	GAG	CCC	AGT	ATC	TTG	CTC	CTC
CYP2B1 Aminosäuresequenz	Met	Glu	Pro	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu
cDNA von *cyp2b1* in pMM41-V	ATG	**GCT**	CC**T**	**TCA**	AT**T**	TTG	CTC	CTC
CYP2B1 Aminosäuresequenz	Met	**Ala**	Pro	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu

Abbildung 4: Unveränderter und modifizierter 5´-Bereich der cDNA von *cyp2b1* und *cyp2b1* in pMM41-V, sowie codierter N-terminaler Bereich des unveränderten CYP2B1 und des veränderten CYP2B1 in pMM41-V.

In einem erneuten Ansatz wurde der Einfluss von δ-Aminolävulinsäure und niedrigerer Temperatur auf die Proteinexpression untersucht. δ-Aminolävulinsäure ist ein Vorläufermolekül der Häm-Gruppe in Cytochrom P_{450}-Molekülen und konnte in anderen Studien (PERNECKY und COON, 1996) eine Erhöhung der Cytochrom P_{450}-Expression in *E. coli* bewirken. Zu 100 ml Kulturansatz wurden hierbei 250 µl δ-Aminolävulinsäure (1 M Stammlösung in H_2O) gegeben. Die Reduktion der Wachstums-Temperatur der Kultur von 37 °C auf 28 °C sollte eine verbesserte Faltung des Proteins bewirken (BARNES, 1996; GUENGERICH et al., 1997). Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 5 dargestellt..

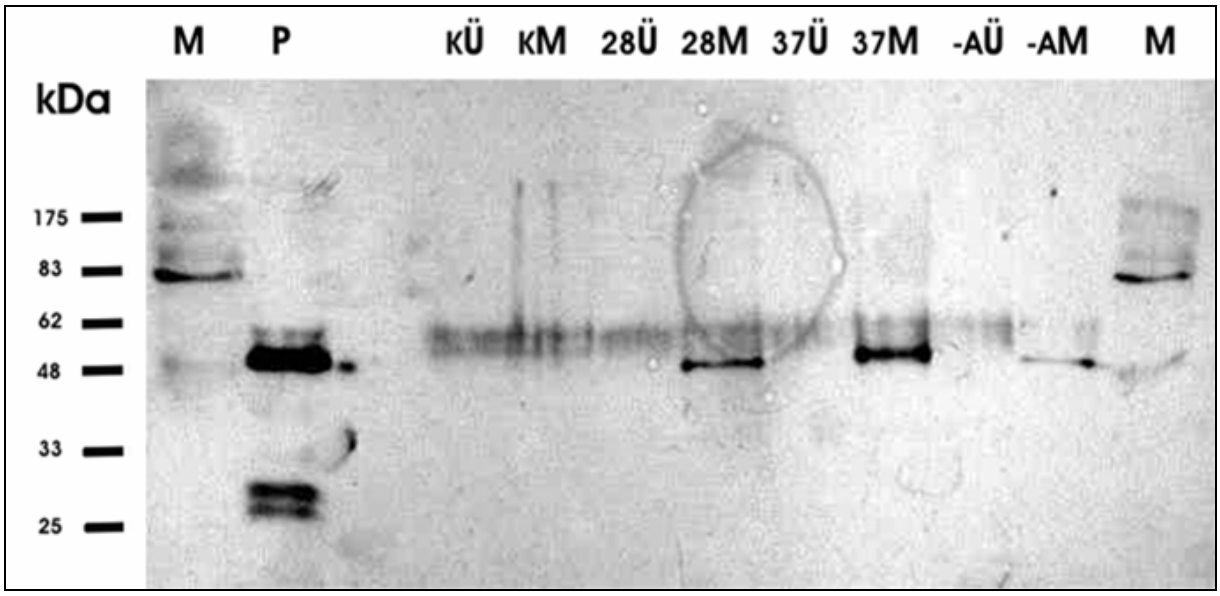


Abbildung 5: Western-Transfer zur Untersuchung der CYP2B1-Expression durch *E. coli* pMM41-V. M=Grössenstandard; P= Positiv-Kontrolle (CYP2B1 Mikrosomen aus der Rattenleber); k= Negativ-Kontrolle (Leervektor pMM41 in *E. coli*); 28= pMM41-V bei 28 °C; 37= pMM41-V bei 37 °C; -A= pMM41-V bei 28 °C ohne δ-Aminolävulinsäure; Ü= lösliche Proteinfraktion; M= Membranprotein-Fraktion. Antikörper: Ziege anti-Ratte CYP2B1; 2,5 µg Protein in jeder Spur.

Die höchste Proteinausbeute ergab sich bei einem Wachstum in LB-Medium mit δ-Aminolävulinsäure bei 37 °C.

3.1.4 Expression von CYP2B1 aus *R. norvegicus* in *C. acetobutylicum*

Es galt nun zu klären, ob das Gen *cyp2bI* aus *R. norvegicus* auch in *C. acetobutylicum* exprimiert und das Enzym auch hier nachweisbar sein würde. Hierfür musste das Gen in einem ersten Schritt in einen *E. coli - C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor kloniert werden. Das veränderte Gen *cyp2bI-V* und die veränderte Ribosomenbindestelle wurden mit den Oligonukleotidstartern „41vRBS-f“ und „41Salstop“ amplifiziert. Als Matrize wurde der *E. coli* Expressionsvektor pMM41-V verwendet. Das PCR-Produkt wurde über die *Sal*I Restriktionsschnittstelle in den *E. coli - C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor pCYP10 stromabwärts des Promoters des *C. acetobutylicum ptb*-Operons kloniert. Der dabei entstandene Vektor trug das Gen in umgekehrter Orientierung und wurde erneut mit *Sal*I verdaut und religiert. In folgenden Experimenten mit Restriktionsenzymen und durch Sequenzanalysen wurde der Aufbau des Vektors pCYP102B1 (Abbildung 6) verifiziert. Der Stamm *C. acetobutylicum* ATCC 824 besitzt das Restriktionsenzym *CAC824*I mit der Erkennungssequenz 5'-GCNGC-3'. Eine Methylierung von Fremd-Plasmiden durch die Methyltransferase Φ3T des *B. subtilis* Phagen Φ verhindert den Abbau der Plasmide nach der Transformation in *C. acetobutylicum* (MERMELSTEIN und PAPOUTSAKIS, 1993). Sie methyliert spezifisch das interne Cytosin der Basenfolgen 5'-GGCC-3' und 5'-GCNGC-3' an der 5'-Position der Base (NOYER-WEIDNER et al., 1985). Da der verwendete Vektor pCYP102B1 mehrere dieser Schnittstellen trug, erfolgte eine in vivo Methylierung. Der Vektor pCYP102B1 wurde in einen *E. coli* Stamm SURE kloniert, der bereits die Methyltransferase Φ3T auf dem Vektor pANS1 trug. Der Stamm *E. coli* SURE ist ein K12-Derivat und besitzt kein Restriktionssystem, welches DNA, in der das Cytosin in der Basenfolge 5'-CG-3' methyliert ist, hydrolysiert (RALEIGH und WILSON, 1986). Die transformierten Zellen wurden auf Antibiotika-Platten selektiert und in Flüssigkultur unter Selektionsdruck angezogen. Nach der Ernte erfolgten eine Plasmidisolation und die Untersuchung des Methylierungszustands. Durch das Ausbleiben der Hydrolyse bei einer Restriktion mit *Sat*I, einem Isoschizomer des Restriktionsenzymes *Fnu*4HI, konnte eine erfolgreiche Methylierung kontrolliert werden. Das isolierte Plasmidgemisch aus pCYP102B1 und pANS1 wurde in *C. acetobutylicum* DSM 792 transformiert. Das Plasmid pANS1 trägt keinen Replikationsursprung für *C. acetobutylicum*, daher kann es in diesem Organismus nicht replizieren. Nach einer Antibiotika-Selektion mithilfe der Resistenzgene des Plasmids pCYP102B1 wurde der Erfolg der Transformation mittels PCR und spezifischen Oligonukleotidstartern für das *cyp2b1*-Gen untersucht. Weitere Experimente wurden mit dem

hierbei erhaltenen Stamm *C. acetobutylicum* DSM 792 pCYP102B1 durchgeführt (Abbildung 6). In einem zweiten Ansatz wurde ein Plasmidkonstrukt von M. Böhringer mit einem unveränderten *cyp2b1*-Gen im Vektor pCYP10 methyliert und in den Stamm *C. acetobutylicum* DSM 792 transformiert. Die Vektoren pCYP102B1 und pCYP102B1MB wurden dann parallel in Western-Transfer-Experimenten untersucht. Alle hierbei durchgeführten Versuche ergaben auch Kreuzreaktionen der verwendeten polyklonalen Antikörper gegen CYP2B1 mit Rohextrakten des Wildtypstamms *C. acetobutylicum* DSM 792 auf der erwarteten Höhe.

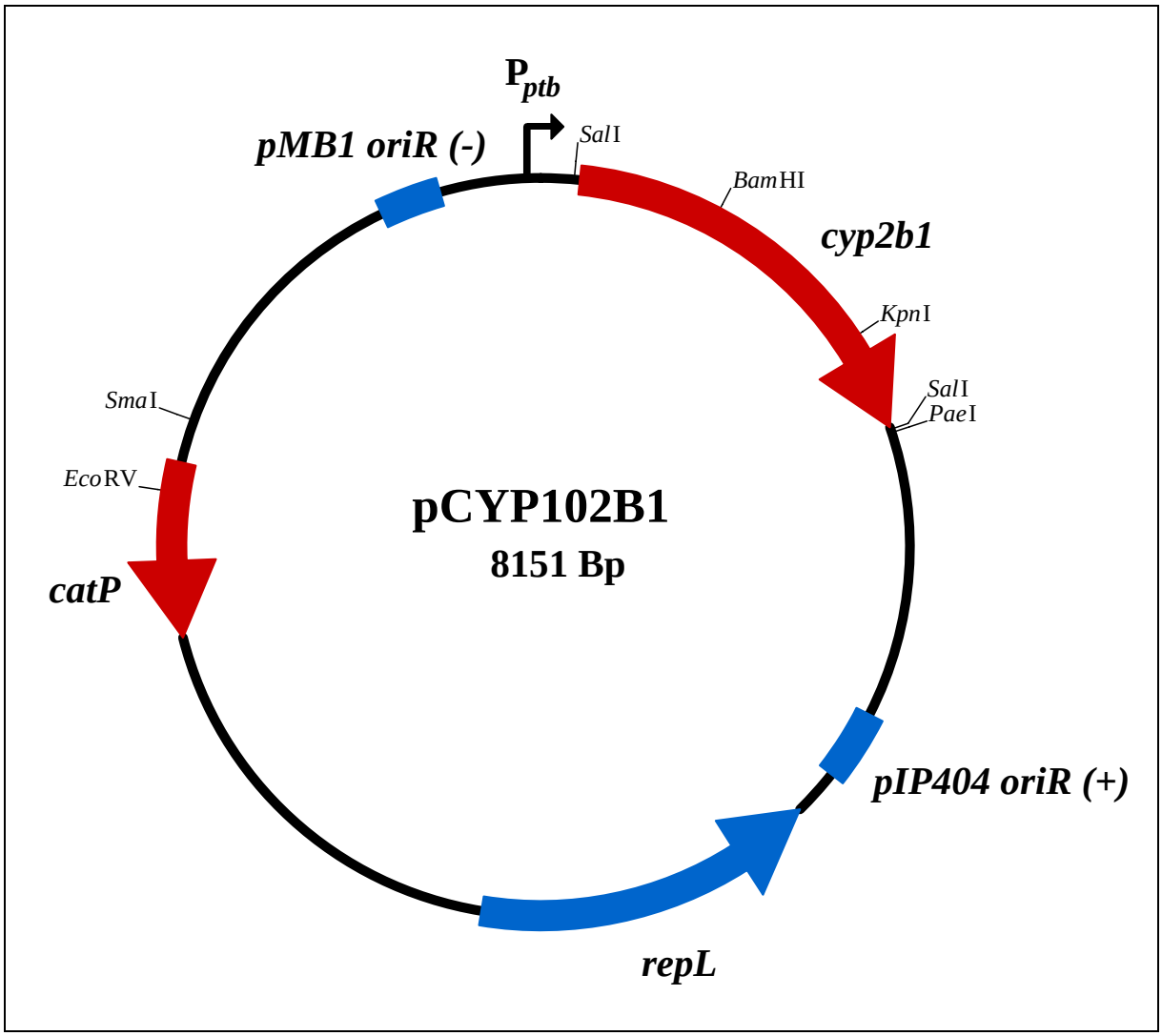


Abbildung 6: Karte des *E. coli – C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektors pCYP102B1. *repL*: pIM13-Replikationsprotein; *pIP404 oriR (+)*: Replikationsursprung für Gram$^+$ Bakterien aus pIP404; *catP:* Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen aus *C. perfringens*; *pMB1 oriR (-)*: Replikationsursprung für Gram$^-$-Bakterien aus pIP404; *cyp2B1*: promoterlose cDNA von Cytochrom 2B1 aus *R. norvegicus*; P_{ptb}: Promoter des Phosphotransbutyrylase-Operons aus *C. acetobutylicum.*

3.1.5 Untersuchungen zur Funktionalität des rekombinanten CYP2B1

Um die Funktionalität der im Western-Transfer nachgewiesenen Enzyme zu überprüfen, wurden die Protein-Rohextrakte von *E. coli* pMM40-Leervektor und *E. coli* pMM41-V in einen Pentoxyresorufin-Enzymtest eingesetzt (2.8.3). Hierbei kann intaktes CYP2B1 7-Pentoxyresorufin spalten und die Menge an gebildetem Resorufin kann in einem Fluorimeter bestimmt werden. Das Wachstum der Stämme erfolgte unter Schütteln mit 160 Upm in 100 ml LB Medien, mit 250 µl δ-Aminolävulinsäure (1 M Stammlösung in H_2O), 100 µl Ampicillin (100 mg/ml Stammlösung) und 50 µl IPTG (1 M Stammlösung). Nach 16 h Wachstum wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der Zellen wurde im Ribolyser^{TM} und der andere im Ultraschallbad aufgeschlossen. Als Positiv-Kontrolle dienten Ratten-Supersomen aus der Rattenleber, diese enthielten CYP2B1, P_{450}- Oxidoreduktase und Cytochrom b5. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 7 aufgeführt.

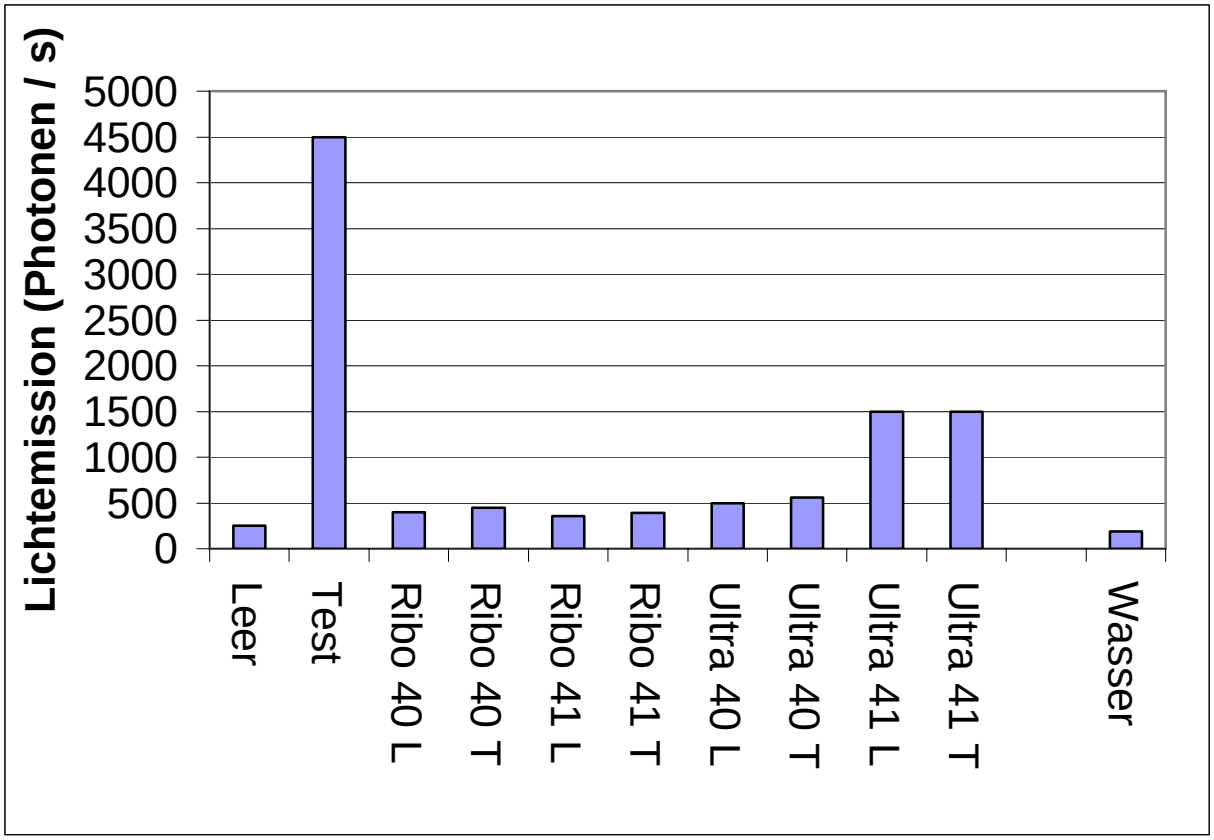


Abbildung 7: Pentoxyresorufin-Enzymtest mit Rohextrakt aus *E. coli* pMM40-Leervektor und *E. coli* pMM41-V. Messung der mit 585 nm emittierten Photonen / s bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm. Leer = Ratten-Supersomen ohne Reaktionsstart durch NADPH; Test = Positivkontrolle mit Ratten-Supersomen und NADPH; Ribo = Aufschluss der Proben im Ribolyser^{TM}; Ultra = Aufschluss der Zellen im Ultraschallbad; L = Testansatz ohne Substrat; T = Testansatz mit Pentoxyresorufin als Substrat; Wasser = Ermittlung des Systemhintergrunds.

Die isolierten Protein-Rohextrakte der rekombinanten *E. coli* Stämme wiesen in den mehrfach durchgeführten Versuchen keine positiven Reaktionen auf. Auch nach einer Zugabe der aufgereinigten Co-Enzyme P_{450}-Oxidoreduktase und Cytochrom b5 konnte keine messbare Aktivität der im Western- Transfer detektierten Enzyme nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen der Protein-Rohextrakte der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme, mit den Schaukel-Vektoren pCYP102B1 und pCYP102B1MB, trat ebenso keine messbare Aktivität der Enzyme auf.

3.2 Entwicklung rekombinanter *C. acetobutylicum* Sporen für eine CPE-Therapie

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Gress der Abteilung Innere Medizin I der Universität Ulm konnte in Experimenten zeigen, dass das Enterotoxin von *Clostridium perfringens* (CPE) an Rezeptoren (Claudin-4) von Pankreaskarzinom-Zelllinien binden kann (MICHL et al., 2001). Die Bindung mehrerer Toxinmoleküle, und die damit verbundene Porenbildung in der eukaryotischen Zellwand, führen bei hohen Toxinkonzentrationen zu einem Destabilisieren der Zelle. Bei geringen Konzentrationen kommt es bedingt durch einen Ca^{2+}-Ionen-Einstrom zur Aktivierung einer Apoptose-Kaskade (CHAKRABARTI und MCLANE, 2005). In beiden Fällen resultiert die Wirkung von CPE in einem Absterben der Zellen und letztendlich einer Zellyse und stellt somit einen guten Angriffspunkt für die Bekämpfung des Pankreaskarzinoms dar. Diese Rezeptoren sind in den bisher untersuchten Tumorzelllinien aus bisher ungeklärten Gründen um bis zu 1000-fach überexprimiert, was einen gezielten Angriff durch CPE ermöglicht. Für die Entwicklung einer gezielten Therapieform muss das Toxin an den Wirkungsort innerhalb des Tumors gebracht werden. Als Ansatz sollte hier die Möglichkeit entwickelt werden, genetisch modifizierte clostridielle Sporen als Transporter für das Toxin zu verwenden. Die dabei entstandenen rekombinanten Sporen können im hypoxischen Bereich von Tumoren auskeimen und wachsen (MOESE et al., 1959), sie bieten sich also als gezielte Transportmöglichkeit für Wirkstoffe an. *C. perfringens* bildet das Enterotoxin während der Sporulationsphase, und erst bei einem Auflösen der Mutterzelle wird es in die Umgebung freigesetzt. Diese Tatsache und der Umstand, dass *C. perfringens* neben diesem noch 14 weitere bekannte Toxine besitzt, verbietet die Nutzung dieses human-pathogenen Organismus für diese Therapieform. Aus diesem Grund sollte das *cpe*-Gen in einen anderen, als nicht pathogen geltenden, *Clostridium*-Stamm eingebracht werden. Durch genetische Modifikation sollte eine gleichmäßige Abgabe des Toxins in die Umgebung der vegetativen Bakterienzelle während des gesamten Wachstums gewährleistet werden. Das Toxin-Gen sollte mit DNA-Sequenzen für Signalpeptide versehen und unter die Kontrolle eines konstitutiven Promoters gestellt werden. Das gesamte Vektor-Konstrukt sollte anschließend methyliert und in *C. acetobutylicum* transformiert werden.

3.2.1 Genetische Organisation des *cpe*-Gens in *C. perfringens*

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *C. perfringens* Typ A DSM 11784 trägt das *cpe*-Gen auf einem transponierbaren Element von 6,3 kBp Größe im Chromosom (BRYNESTAD et al., 1997). Stromaufwärts des Gens liegen die Insertionselemente IS 1470 und IS 1469 und unterhalb des Gens wurde ein weiteres Insertionselement IS 1470 entdeckt. Das Transposon inserierte bei allen bisher untersuchten *C. perfringens*-Stämmen des Typs a zwischen den Genen *uapC* und *nadC* (Abbildung 8). Das *cpe*-Gen steht unter der Kontrolle von drei Promotoren (MELVILLE et al.., 1994) und wird zu Beginn der Sporulation von *C. perfringens* gebildet. Untersuchungen haben gezeigt, dass es erst bei der Lyse der Mutterzelle zusammen mit der Endospore freigesetzt wird.

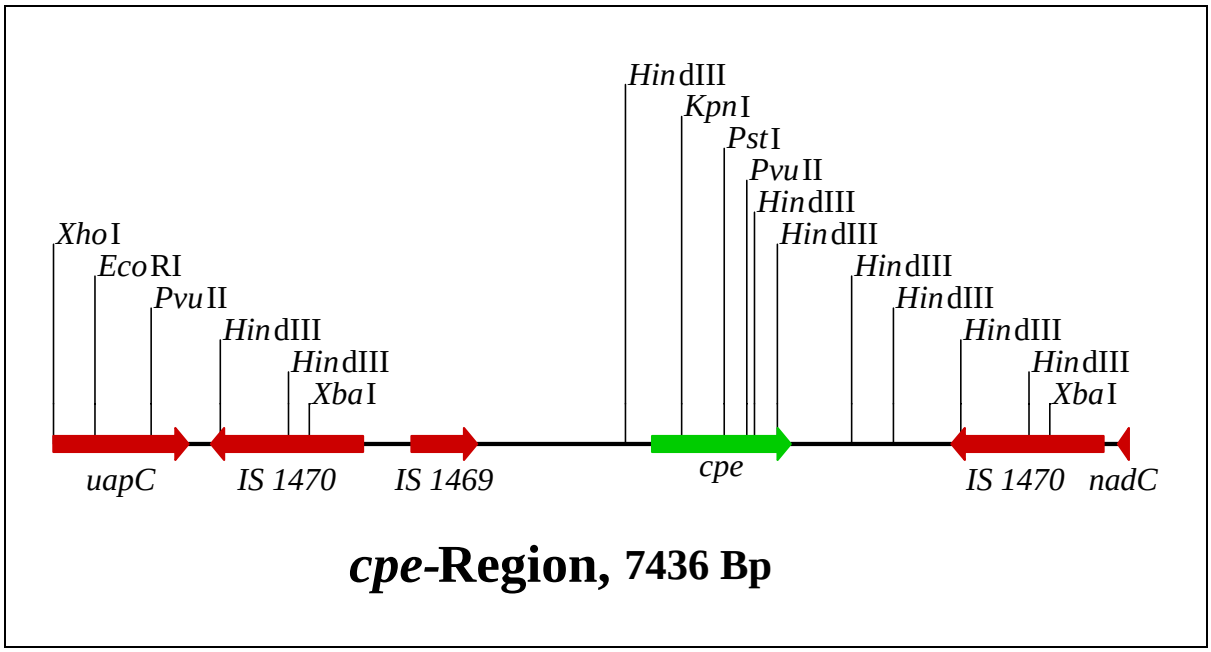


Abbildung 8: Schematische Darstellung der genetischen Organisation des *cpe*-Gens in *C. perfringens* Typ Stamm A. Die farbigen Pfeile zeigen offene Leseraster. *UapC*: Purin-Permease-Gen; *nadC*: Chinolinat-Phosphorylribosyltransferase-Gen; *cpe*: Enterotoxin-Gen; IS 1470 und IS 1469: Insertionselemente.

CPE ist ein lösliches Protein, das im Cytosol der Mutterzelle akkumuliert. Die Sequenz beinhaltet 319 Aminosäuren(Abbildung 9).

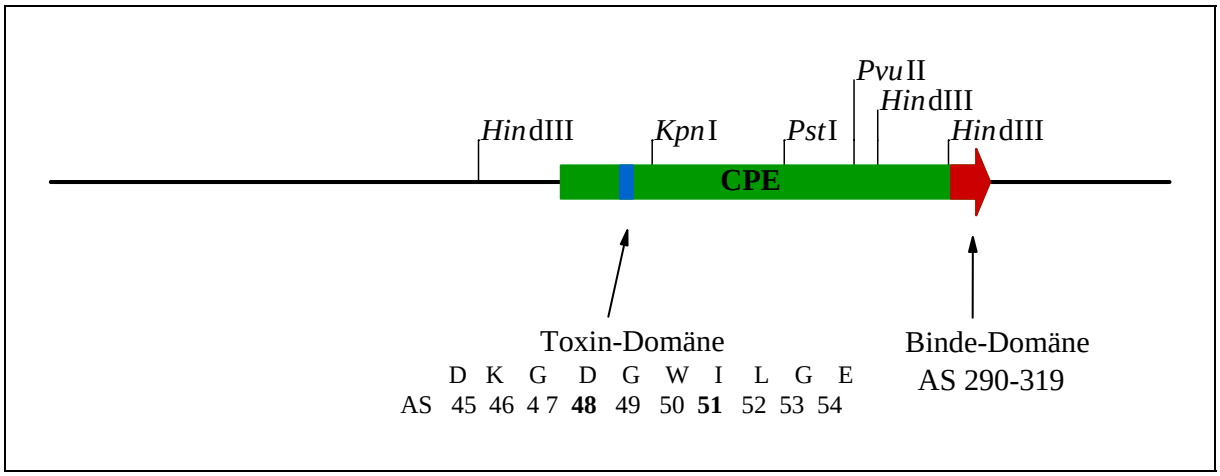


Abbildung 9: Domänenstruktur des *C. perfringens*-Enterotoxins (CPE).

Bei der Untersuchung der Struktur des Proteins wurden zwei für eine toxische Wirkung essentielle Domänen ermittelt. Am C-Terminus des Proteins sitzt eine Binde-Domäne aus 29 Aminosäuren, welche eine Verankerung des Proteins an die Rezeptoren der Zielzellen ermöglicht. Die Aminosäuren 45-54 ermöglichen die Ausbildung von grossen Komplexen zwischen mehreren Toxinmolekülen an der Plasmamembran von Zielzellen, welche für die toxische Wirkung des Proteins verantwortlich sind (SMEDLEY III und MCLANE, 2004).

3.2.2 Herstellung von Schaukel-Vektoren mit DNA-Sequenzen für Signalpeptide

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl der Promoter des *bdhA*-Gens als auch der Promoter des *ptb*-Operons aus *C. acetobutylicum* während der exponentiellen Wachstumsphase von *C. acetobutylicum* DSM 792 aktiv sind (FEUSTEL, 2004). Hierbei wurde mit Reportergenkonstrukten nachgewiesen, dass der *bdhA*-Promoter ein geringeres Expressionsniveau besitzt als der *ptb*-Promoter. In einem ersten Schritt wurden aus dem *E. coli – C. acetobutylicum* Schaukel-Vektor pJIR750 (BANNAM und ROOD, 1993) zwei Expressionsvektoren hergestellt. Für die Klonierung des Vektors pJIR750-ptb wurde die Promoterregion des *ptb*-Operons mit den Oligonukleotidstartern „Ptb-pro-f-hind“ und „Ptb-pro-rev-sal“ amplifiziert. Das Produkt der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erhielt dabei durch die verwendeten Oligonukleotidstarter Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sal*I und *Hin*dIII. Nach einem Restriktionsverdau des Vektors pJIR750 und des PCR-Produkts mit *Hin*dIII und *Sal*I konnte die Promoterregion erfolgreich in den Vektor ligiert und in kaltkompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert werden. Für die Amplifikation der Promoterregion des *bdhA*-Gens wurde das Oligonukleotidstarterpaar „BdhA-pro-f-hind“ und „BdhA-pro-rev-sal“ verwendet. Dieses PCR-Produkt wurde ebenfalls mit der oben beschrieben Methode in den Vektor pJIR750 kloniert. In Abbildung 10 ist exemplarisch eine Karte des entstandenen Vektors pJIR750-bdhA abgebildet. In weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, dass eine Klonierung des *cpe*-Gens aus *C. perfringens* in den Expressionsvektor pJIR750-ptb in den verwendeten *E. coli*-Stämmen nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche der *E. coli – C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor pJIR750-bdhA verwendet.

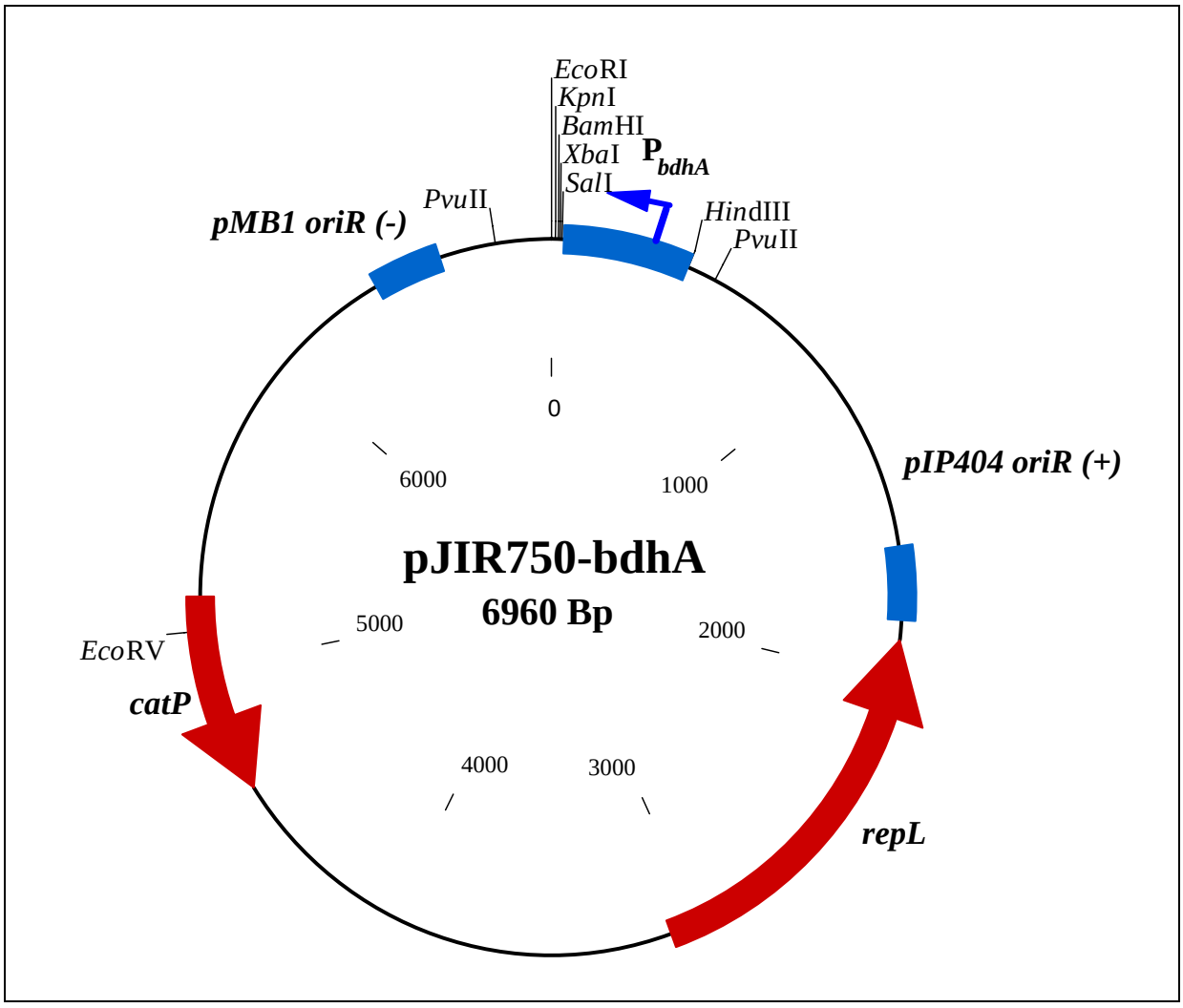


Abbildung 10: Karte des *E. coli – Clostridium acetobutylicum* Schaukel- Vektors pJIR750-bdhA. *repL*: codiert für das pIM13-Replikationsprotein; *pIP404 oriR(+)*: Replikationsursprung für Gram$^+$ Bakterien aus pIP404; *catP:* Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen aus *C. perfringens*; *pMB1 oriR(-)*: Replikationsursprung für Gram$^-$-Bakterien aus pIP404; P_{bdhA}: Promoter des Butanol-Dehydrogenase-A-Gens aus *C. acetobutylicum.*

Um eine Sekretion des rekombinant hergestellten CPE zu erreichen, wurden in den Schaukel-Vektor pJIR750-bdhA die DNA-Sequenzen bekannter Signalpeptide aus *C. acetobutylicum* kloniert. Alle vier ausgewählten Proteine werden in ihrer ursprünglichen Form über das in *C. acetobutylicum* vorherrschende „Sec“-System ausgeschleust und durch die SPase I geschnitten (DESVAUX et al., 2005). Die Klonierung der Sequenzen erfolgte hinter den Promoterbereich des *bdhA*-Gens. Die hergestellten Vektoren p7BIG1 bis p7BIG4 sind in Abbildung 11 dargestellt.

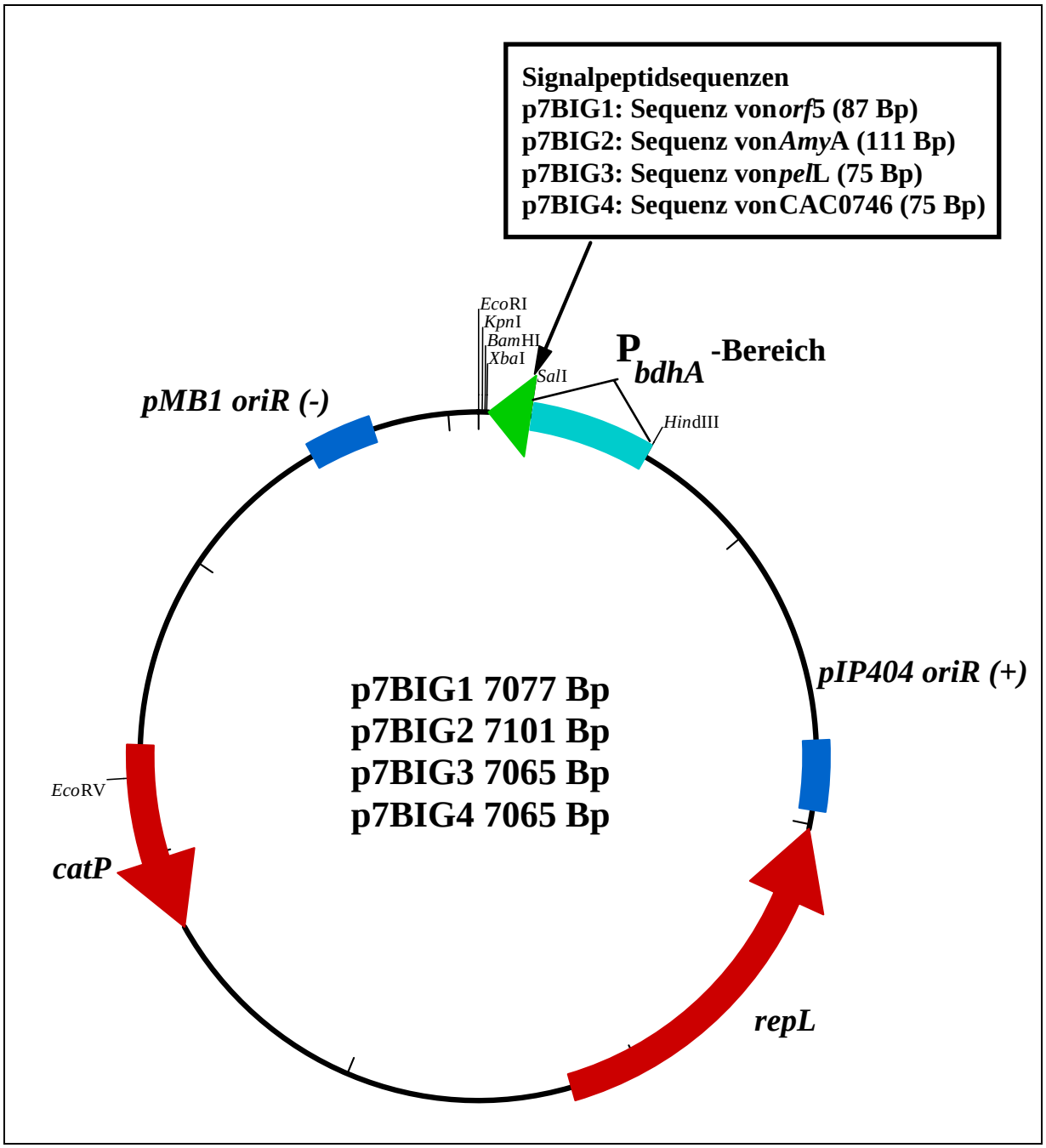


Abbildung 11: Karte der *E. coli – C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektoren p7BIG1 bis p7BIG4. *repL*: codiert für das pIM13-Replikationsprotein; *pIP404 oriR(+)*: Replikationsursprung für Gram$^+$ Bakterien aus pIP404; *catP:* Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen aus *C. perfringens*; *pMB1 oriR(-)*: Replikationsursprung für Gram$^-$-Bakterien aus pIP404; P_{bdhA}: Promoter des Butanol-Dehydrogenase-A-Gens aus *C. acetobutylicum.*

Für die Klonierung von p7BIG1 wurde der Vektor pJIR750-bdhA und das PCR-Produkt der Oligonukleotidstarter „Orf5sig-f“ und „Orf5sig-rsal“ mit chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *XbaI* verdaut. Die Schnittstellen für diese Restriktionsenzyme wurden über die verwendeten Oligonukleotidstarter in das PCR-Produkt eingefügt. Nach einer erfolgreichen Ligation wurde der entstandene Vektor in kaltkompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue transformiert und anschließend sequenziert. Für den Vektor p7BIG1 wurde das Gen *orf5* (*cap*0161, NCBI-GI-NR.: 15004864) eines sezernierten, TPR-Wiederholungen tragenden Proteins aus dem Megaplasmids pSOL1 von *C. acetobutylicum* verwendet.

Die DNA-Sequenz welche für das Signalpeptid des *amyP*-Gens (*cap*0168, NCBI-GI-NR.: 15004871) aus *C. acetobutylicum* codiert, wurde mit den Oligonukleotidstartern „Sig2-rev-xba-bam” und „Sig2-for-sal” amplifiziert. Durch die verwendeten Oligonukleotidstarter wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sal*I, *Xba*I und *Bam*HI in das PCR-Produkt eingefügt. Nach einem Verdau des Vektors pJIR750-bdhA und des PCR-Produkts mit den Restriktionsenzymen *Sal*I und *Bam*HI erfolgte die Ligation und eine anschließende Transformation des ligierten Vektors p7BIG2 in kaltkompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue.

Für die Konstruktion der Vektoren p7BIG3 und p7BIG4 wurden die DNA-Sequenzen einer sezernierten Pektat-Lyase PelL (*cap*0056, NCBI-GI-NR.: 15004760) und einer sezernierten metallabhängigen Protease (*cac*0746, NCBI-GI-NR.: 15894033) kloniert. Die Sequenzen der beiden verwendeten Signalpeptide wurden ebenfalls mit chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* amplifiziert. Als Oligonukleotidstarter dienten hierbei die Paare „Pell-sal-for” und “Pell-xba-bam-rev” sowie “Prot-sal-for” und “Prot-xba-bam-rev”. Durch die verwendeten Oligonukleotidstarter wurden Restriktionsenzym-Schnittstellen für *Sal*I und *Xba*I sowie *Bam*HI eingefügt. Nach einem Restriktionsverdau der PCR-Produkte und des Vektors pJIR750-bdhA mit *Sal*I und *Bam*HI erfolgte die Ligation und anschließende Transformation in kaltkompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue. Der Erfolg aller Ligationen wurde über vergleichende Restriktionsenzym-Analysen und Sequenzierungen überprüft.

3.2.3 Konstruktion von Vektoren zur Expression von Signalpeptid-CPE Fusionen

Das *cpe*-Gen sollte in ersten Versuchen direkt in die *C. acetobutylicum – E. coli*-Schaukel-Vektoren p7BIG1 bis p7BIG4 kloniert werden. Hierfür wurde das Gen mit den Oligonukleotidstartern „Cpe-xba-f-5-3“ und „Cpe-xba-r-5-3” mittels eines PCR-Ansatzes aus chromosomaler DNA des Stammes *C. perfringens* DSM 11784 amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotidstarter fügten hierbei am 5'- und am 3'- Ende des PCR-Produkts eine *XbaI*-Schnittstelle ein. Durch eine ungerichtete Klonierung über die Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Xba*I sollte das Gen ohne Aminosäurecodon-Rasterschub hinter die Sequenz für das jeweilige Signalpeptid kloniert werden. Diese Methode war nicht erfolgreich, und somit wurde eine neue Strategie entwickelt. Da das Hauptproblem darin bestand, positive Klone von immer wieder auftretenden Religanten des Empfänger-Vektors zu unterscheiden, wurde eine zusätzliche Selektionsmöglichkeit in Form einer Antibiotikumresistenz-Kassette eingefügt. Das *cpe*-Gen wurde bei diesem Ansatz mit dem Oligonukleotidstarter-Paar „Cpe-xba-f-5-3“ und „Cpe-xho-xba-rev2“ amplifiziert. Durch diese PCR wurde dem Gen am 3'-Ende zusätzlich zur eingebrachten *Xba*I-Schnittstelle eine weitere Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xho*I eingefügt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit *Xba*I geschnitten und in einen ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *Xba*I verdauten pUC18-Vektor ligiert. Der fertige Vektor pUC18-cpe wurde in kaltkompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Über eine Blau-Weiß-Selektion (2.7.23) wurden positive Klone identifiziert und über Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor pETSPO wurde mit den Oligonukleotidstartern „Ermc-xho-f“ und „Ermc-xho-rev2“ das *MLS*^{r}-Gen (Macrolid-Lincosamid-Streptogramin B-Resistenz) amplifiziert, welches eine Antibiotikumresistenz gegen Erythromycin vermittelt. Schnittstellen für das Restriktionsenzym *XhoI* wurden hierbei am 5'- und 3'- Ende eingefügt. Das PCR-Produkt und der Vektor pUC18-cpe wurden mit *XhoI* geschnitten und anschließend ligiert. Der dabei entstandene Vektor pUC18-cpe-ermC2 wurde in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert und der Erfolg der Transformation über eine Selektion auf LB-Ampicillin- und Erythromycin-Platten untersucht. Nur *E. coli* XL1-Blue-Kolonien, die beide Resistenz-Gene trugen, konnten auf diesem Medium wachsen und wurden kontrolliert und sequenziert. In einem weiteren Schritt wurde das *cpe*-Gen zusammen mit dem *MLS*^{r}-Gen aus dem Vektor pUC18-cpe-ermC2 herausgeschnitten. Hierfür wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *Xba*I und einem weiteren Restriktionsenzym, welches den Rest des pUC18 Vektors zerschneidet, verdaut und

der gesamte Ansatz mit jeweils einem der *Xba*I-geschnittenen Vektoren p7BIG1 bis p7BIG4 ligiert. Die Orientierung der eingebrachten Gene wurde mittels einer Restriktionsanalyse überprüft. Die dabei entstandenen Vektoren p7BIG1TOX bis p7BIG4TOX wurden in kaltkompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue transformiert. Der Verlauf der gesamten Klonierung ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

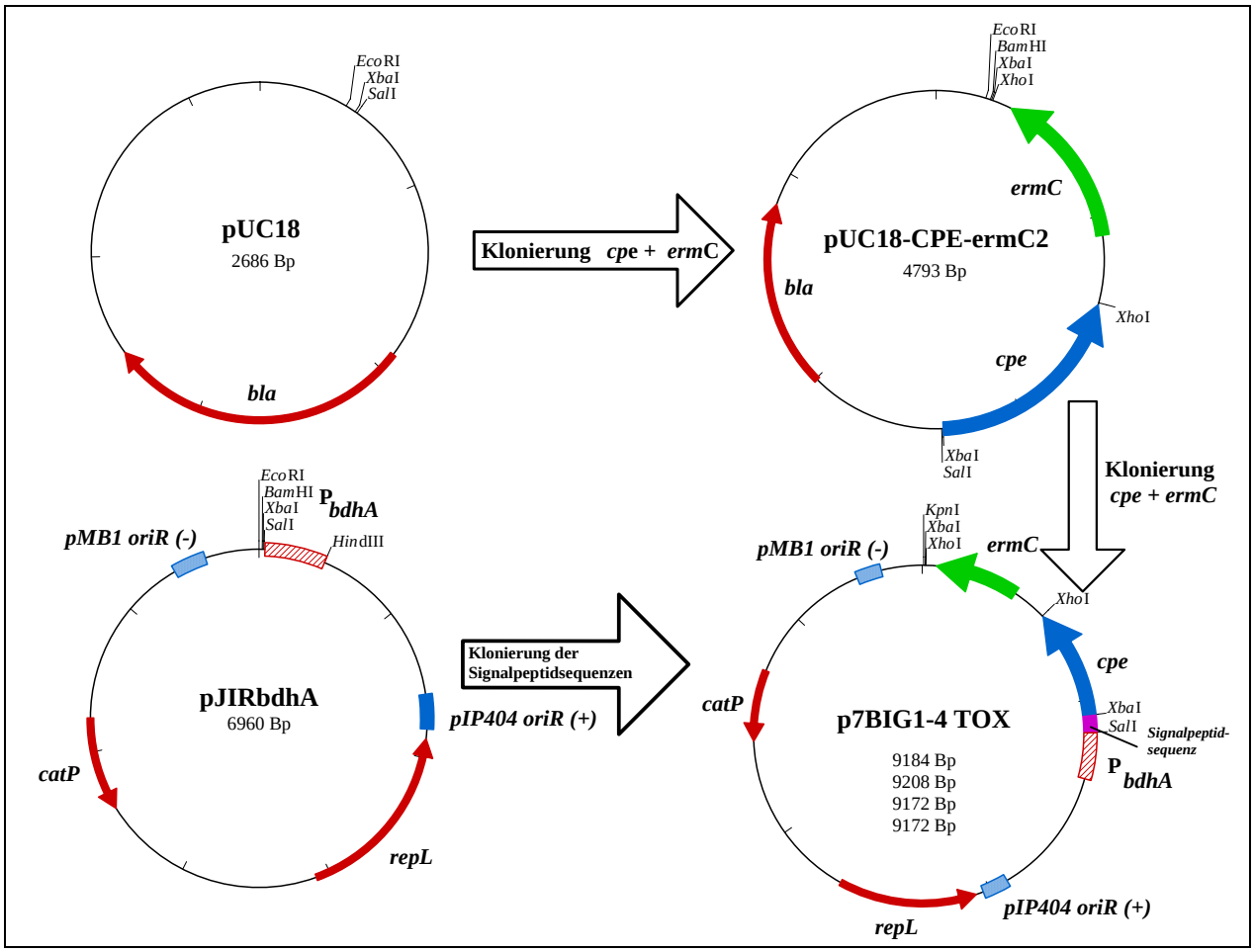


Abbildung 12: Klonierung des *cpe*-Gens in die verschiedenen Expressions-Schaukel-Vektoren p7BIG1 bis p7BIG4. *repL*: codiert für das pIM13-Replikations-protein; *pIP404 oriR (+)*: Replikationsursprung für Gram^{+}-Bakterien aus pIP404; *catP:* Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen aus *C. perfringens*; *pMB1 oriR (-)*: Replikationsursprung für Gram^{-} Bakterien aus pIP404; P_{bdhA}: Promoter-Bereich des Butanol-Dehydrogenase-A-Gens aus *C. acetobutylicum*. *bla*: β-Lactamase-Gen; *ermC*: 23S rRNA-Methylase.

Durch die Klonierung des *cpe*-Gens hinter die signalpeptidcodierende Sequenz in p7BIG1 bis p7BIG4 sollten Fusionsproteine entstehen. Diese neuen Proteine sollten bereits während des Wachstums der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme in die Umgebung sezerniert werden und nicht mehr unter der Kontrolle der Sporulation stehen. Eine theoretische

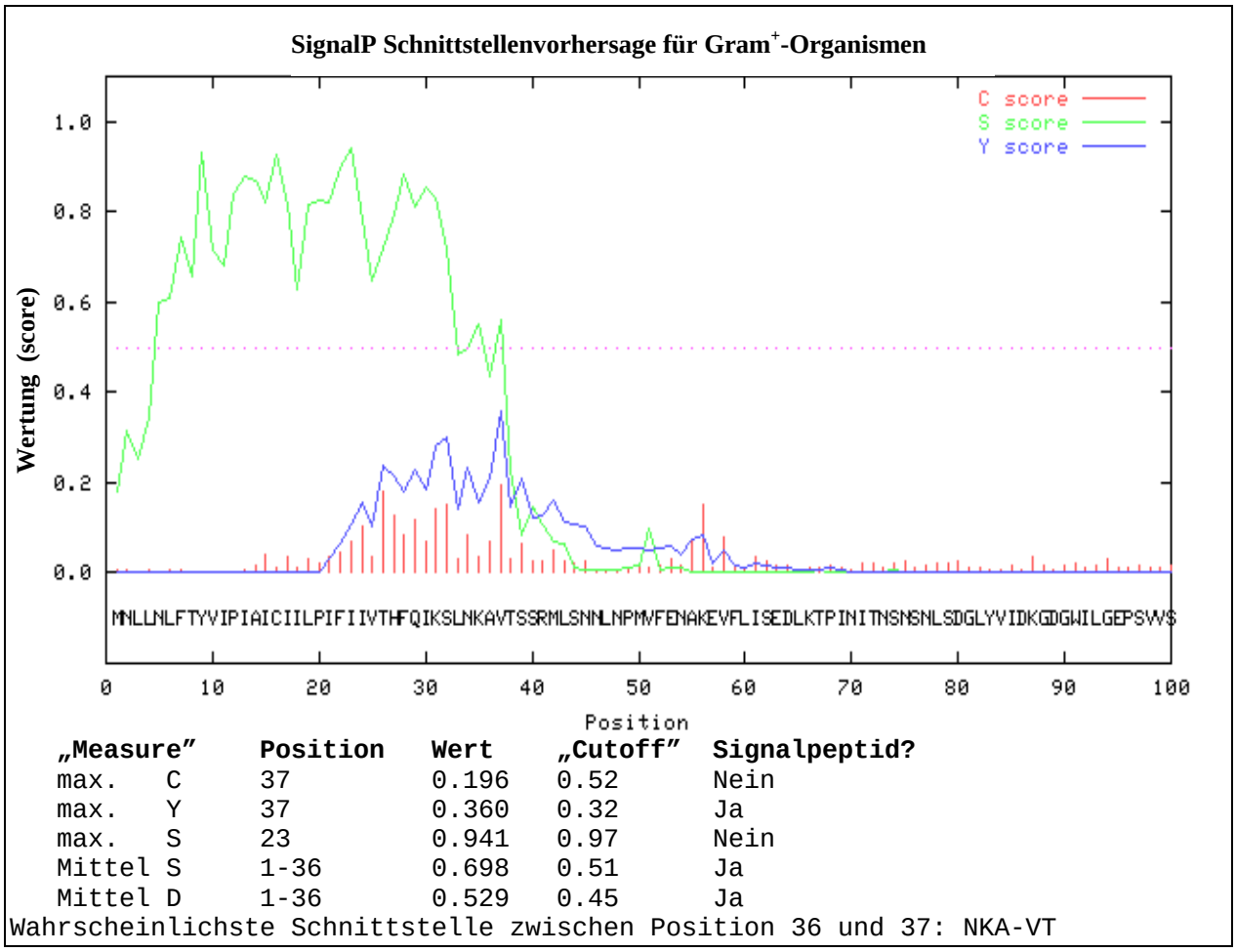
Funktionalität der dabei entstehenden Fusionsproteine wurde mit SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) mit dem Algorithmus für Gram$^+$-Organismen überprüft (NIELSEN et al., 1997 und BENDTSEN et al., 2004). Die Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine und die Ergebnisse der SignalP-Untersuchungen sind in den Abbildungen 13-20 dargestellt. Die „C-score“ steht hierbei für die Schnittstellenwahrscheinlichkeit an einer bestimmten Stelle, die „S-score“ für eine Wahrscheinlichkeit, dass eine Aminosäuresequenz ein Signalpeptid darstellt und die „Y-score“ für einen Kombinationswert der beiden anderen Parameter. Der D-Wert wird durch das Mittel der „S-score“ und dem höchsten „Y-score“-Wert errechnet. Betrachtet man diese Werte können Vorhersagen getroffen werden, ob eine bestimmte Sequenz einen Signalpeptidcharakter besitzt, und an welcher Stelle vermutlich die Signalpeptidase-Schnittstelle liegt. Der „cut off“-Wert beschreibt hierbei einen Schwellen-Wert, der überschritten werden muss um eine positive Aussage für einen Signalpeptid-Charakter einer untersuchten Sequenz zu ergeben.

In dem *C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor p7BIG1TOX wurde die codierende DNA-Sequenz für das Signalpeptid von Orf5 über eine Ligation an der *Xba*I-Schnittstelle mit der Gensequenz für CPE fusioniert. Diese neue Gensequenz codiert für das Orf5-CPE-Fusionsprotein (Abbildung 13).

MNLLNLFTYVIPIAICIILPIFIIVTHFQIKSLNKAVTSsr*MLSNNLNPMVFENAKEVFLISED*
LKTPINITNSNSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTFSQSLTKSKEVSINVNF
SVGFTSEFIQASVEYGFGITIGEQNTIERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISD
DGSIYKLTGIWLSKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVLTVPSTDIEKEILDLAAATERLNLTDAL
NSNPAGNLYDWRSSNSYPWTQKLNLHLTITATGQKYRILASKIVDFNIYSNNFNNLVKLEQS
LGDGVKDHYVDISLDAGQYVLVMKANSSYSGNYPYSILFQKF

Abbildung 13: Sequenz des Fusionsproteins aus CPE und dem Signalpeptid von *Clostridium acetobutylicum* Orf5. Normal = Signalpeptid, Klein = Aminosäuren der Schnittstelle *Xba*I, Kursiv = CPE.

Eine SignalP-Analyse der ersten 100 Aminosäuren dieses neuen Fusionsproteins ergab eine Vorhersage für eine Schnittselle nach der Aminosäure 36 (Abbildung 14).



„Measure"		Position	Wert	„Cutoff"	Signalpeptid?
max.	C	37	0.196	0.52	Nein
max.	Y	37	0.360	0.32	Ja
max.	S	23	0.941	0.97	Nein
Mittel	S	1-36	0.698	0.51	Ja
Mittel	D	1-36	0.529	0.45	Ja

Wahrscheinlichste Schnittstelle zwischen Position 36 und 37: NKA-VT

Abbildung 14: Errechnete Signalpeptidase-Schnittstelle für das CPE-Orf5 Fusionsprotein.

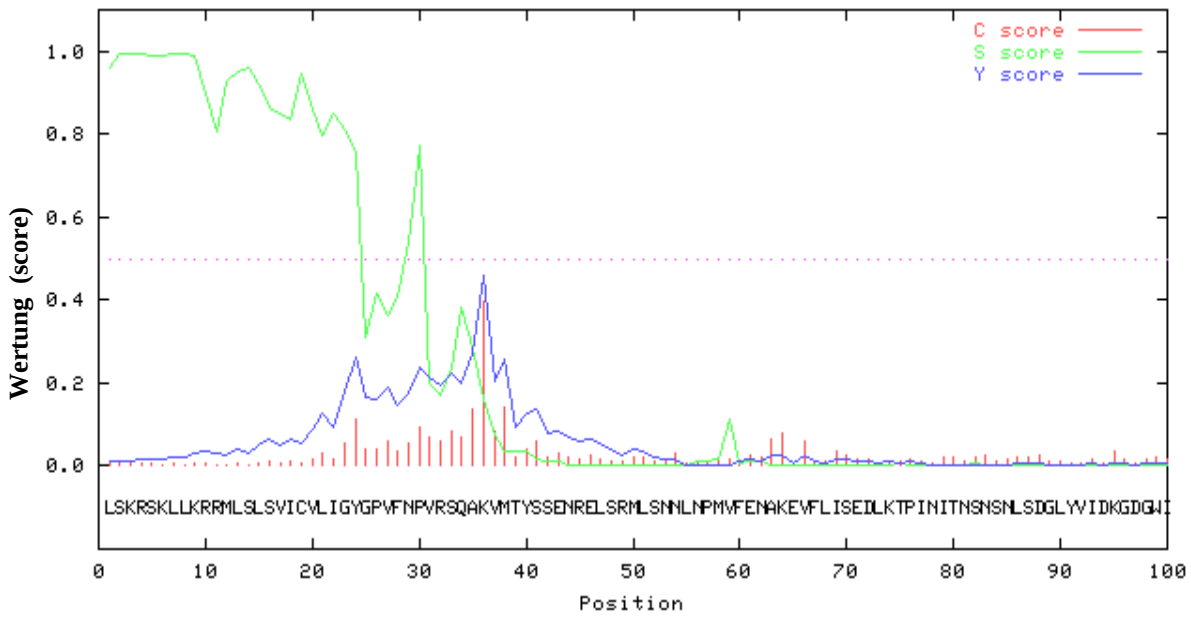
Der *C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor p7BIG2TOX beinhaltet die codierende DNA-Sequenz des Signalpeptids der AmyP aus *C. acetobutylicum*. Die Sequenz des *cpe*-Gens wurde über eine Ligation an der eingefügten *Xba*I-Schnittstelle an die signalpeptidcodierende Sequenz fusioniert. Diese neue Gensequenz codiert für das AmyP-CPE-Fusionsprotein (Abbildung 15).

LSKRSKLLKRRMLSLSVICVLIGYGPVFNPVRSQAKVMTYSSENRELsr*MLSNNLNPMV*
FENAKEVFLISEDLKTPINITNSNSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTFSQ
SLTKSKEVSINVNFSVGFTSEFIQASVEYGFGITIGEQNTIERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYR
KYQAIRISHGNISDDGSIYKLTGIWLSKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVLTVPSTDIEKEILD
LAAATERLNLTDALNSNPAGNLYDWRSSNSYPWTQKLNLHLTITATGQKYRILASKIVDFNIY
SNNFNNLVKLEQSLGDGVKDHYVDISLDAGQYVLVMKANSSYSGNYPYSILFQKF

Abbildung 15: Sequenz des Fusionsproteins aus CPE und dem Signalpeptid von *C. acetobutylicum* AmyP. Normal = Signalpeptid, Klein = Aminosäuren der Schnittstelle *Xba*I, Kursiv = CPE.

Die Analyse der ersten 100 Aminosäuren dieses neuen Fusionsproteins mit dem SignalP Algorithmus für Gram$^+$-Organismen ergab eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Signalpeptidase-Schnittstelle nach Position 35 des Proteins (Abbildung 16).

SignalP Schnittstellenvorhersage für Gram$^+$-Organismen



„Measure"		Position	Wert	„Cutoff"	Signalpeptid?
max.	C	36	0.398	0.52	Nein
max.	Y	36	0.459	0.32	Ja
max.	S	8	0.996	0.97	Ja
Mittel	S	1-35	0.743	0.51	Ja
Mittel	D	1-35	0.601	0.45	Ja

Wahrscheinlichste Schnittstelle zwischen Position 35 und 36: SQA-KV

Abbildung 16: Errechnete Signalpeptidase-Schnittstelle für das CPE-AmyP Fusionsprotein.

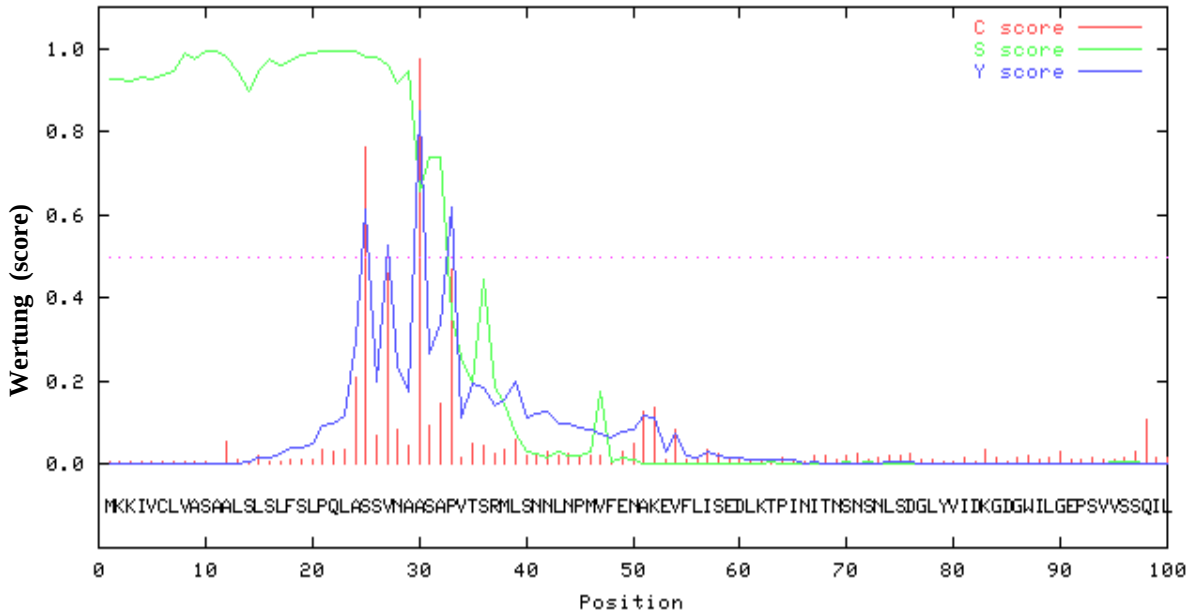
In dem *C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor p7BIG3TOX wurde die codierende DNA-Sequenz für das Signalpeptid einer sezernierten Pektat-Lyase PelL über eine Ligation an der *Xba*I-Schnittstelle mit dem *cpe*-Gen fusioniert. Dieses neue Gen codiert für das PelL-CPE-Fusionsprotein (Abbildung 17).

MKKIVCLVASAALSLSLFSLPQLASSVNAASAPVTsr*MLSNNLNPMVFENAKEVFLISED LKTPINITNSNSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTFSQSLTKSKEVSINVNF SVGFTSEFIQASVEYGFGITIGEQNTIERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISD DGSIYKLTGIWLSKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVLTVPSTDIEKEILDLAAATERLNLTDAL NSNPAGNLYDWRSSNSYPWTQKLNLHLTITATGQKYRILASKIVDFNIYSNNFNNLVKLEQS LGDGVKDHYVDISLDAGQYVLVMKANSSYSGNYPYSILFQKF*

Abbildung 17: Sequenz des Fusionsproteins aus CPE und dem Signalpeptid von *C. acetobutylicum* PelL. Normal = Signalpeptid, Klein = Aminosäuren der Schnittstelle *Xba*I, Kursiv = CPE.

Eine SignalP-Analyse der ersten 100 Aminosäuren dieses neuen Fusionsproteins ergab eine Vorhersage für eine Schnittselle nach der Aminosäure 29 (Abbildung 18).

SignalP Schnittstellenvorhersage für Gram$^+$-Organismen



„Measure"		Position	Wert	„Cutoff"	Signalpeptid?
max.	C	30	0.975	0.52	Ja
max.	Y	30	0.848	0.32	Ja
max.	S	24	0.996	0.97	Ja
Mittel	S	1-29	0.961	0.51	Ja
Mittel	D	1-29	0.904	0.45	Ja

Wahrscheinlichste Schnittstelle zwischen Position 29 und 30: VNA-AS

Abbildung 18: Errechnete Signalpeptidase-Schnittstelle für das CPE-PelL-Fusionsprotein.

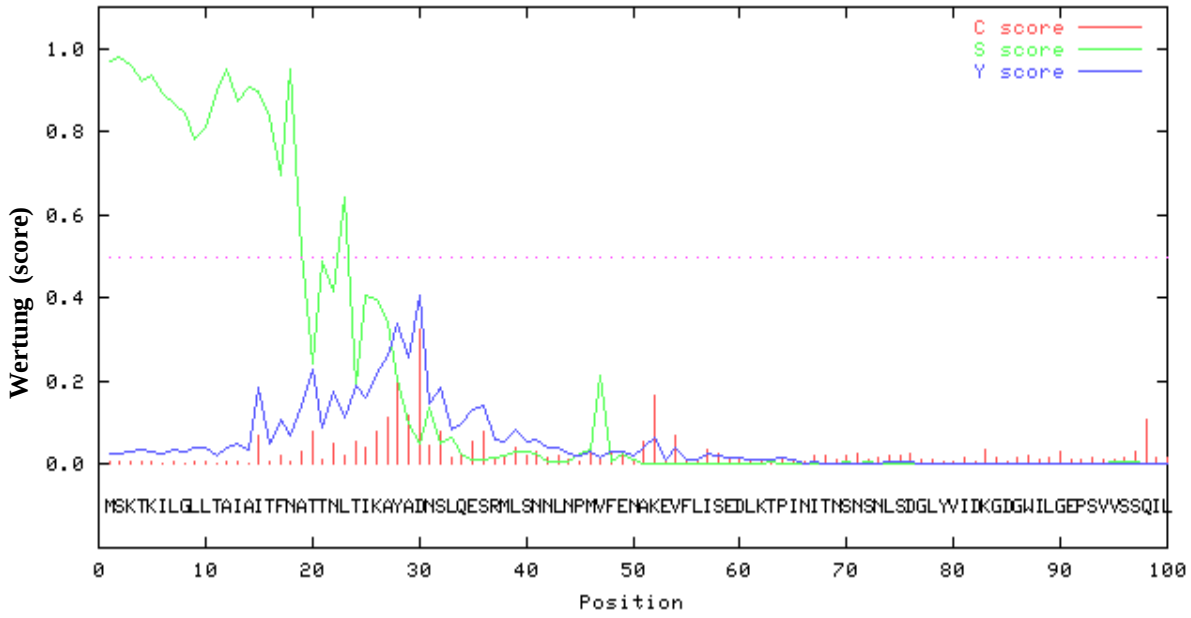
Der *C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor p7BIG4TOX sollte die codierende DNA-Sequenz des Signalpeptids der Protease CAC0746 aus *C. acetobutylicum* beinhalten. Die Sequenz des *cpe*-Gens sollte über eine Ligation an der eingefügten *Xba*I-Schnittstelle, an die signalpeptidcodierende Sequenz fusioniert werden. Dabei sollte eine neue Gensequenz entstehen, welche für das Protease-CPE-Fusionsprotein (Abbildung 19) codiert hätte. Es gelang aber, nicht diesen Vektor in *E. coli* zu konstruieren.

MSKTKILGLLTAIAITFNATTNLTIKAYADNSLQEsr*MLSNNLNPMVFENAKEVFLISEDL KTPINITNSNSNLSDGLYVIDKGDGWILGEPSVVSSQILNPNETGTFSQSLTKSKEVSINVNFS VGFTSEFIQASVEYGFGITIGEQNTIERSVSTTAGPNEYVYYKVYATYRKYQAIRISHGNISDD GSIYKLTGIWLSKTSADSLGNIDQGSLIETGERCVLTVPSTDIEKEILDLAAATERLNLTDALN SNPAGNLYDWRSSNSYPWTQKLNLHLTITATGQKYRILASKIVDFNIYSNNFNNLVKLEQSL GDGVKDHYVDISLDAGQYVLVMKANSSYSGNYPYSILFQKF*

Abbildung 19: Sequenz des Fusionsproteins aus CPE und dem Signalpeptid der *C. acetobutylicum* Protease CAC0746. Normal = Signalpeptid, Klein = Aminosäuren der Schnittstelle *Xba*I, Kursiv = CPE.

Eine SignalP-Analyse der ersten 100 Aminosäuren dieses neuen Fusionsproteins, ergab eine Vorhersage für eine Signalpeptidase-Schnittstelle nach der Aminosäure 29 (Abbildung 20).

SignalP Schnittstellenvorhersage für Gram$^+$-Organismen



„Measure"		Position	Wert	„Cutoff"	Signalpeptid?
max.	C	30	0.324	0.52	Nein
max.	Y	30	0.409	0.32	Ja
max.	S	2	0.978	0.97	Ja
Mittel	S	1-29	0.687	0.51	Ja
Mittel	D	1-29	0.548	0.45	Ja

Wahrscheinlichste Schnittstelle zwischen Position 29 und 30: AYA-DN

Abbildung 20: Errechnete Signalpeptidase-Schnittstelle für das CPE-CAC0746 Fusionsprotein.

3.2.4 Untersuchung der rekombinanten *C. acetobutylicum* Stämme

Die *C. acetobutylicum – E. coli*-Schaukel-Vektoren p7BIG1TOX, p7BIG2TOX und p7BIG3TOX wurden erfolgreich in *C. acetobutylicum* transformiert. Ein Abbau der eingebrachten Plasmide durch das clostridielle Restriktionsenzym *CAC824*I wurde durch eine in vivo-Methylierung in *E. coli* SURE pANS1 (siehe auch 3.1.4) verhindert. Der Erfolg der Transformation wurde mittels GFX^{TM}-Präparation (2.7.8) der Plasmide und anschließender PCR (2.7.12) überprüft. Die Expression der Fusionsproteine durch die rekombinanten *Clostridium*-Stämme wurde in unterschiedlichen Western-Transfer-Experimenten untersucht. Hierfür wurden die Stämme in MES-gepuffertem Medium (2.5.1.4) bei 37 °C inkubiert. Natürliches CPE denaturiert bei pH-Werten unter 5, daher wurden die Überstände und Zellen in allen folgenden Experimenten stets bei einem pH-Wert von ca. 6 abgenommen und geerntet. Für die Detektion des Toxins wurden polyklonale Antikörper aus der Ziege gegen das *C. perfringens*-Enterotoxin CPE (Acris Antibodies GmbH; Hiddenhausen; Bestellnummer: BP1014), die keine Kreuzreaktionen mit Protein-Rohextrakten von *C. acetobutylicum* zeigten, verwendet. Zum Nachweis der CPE-Antikörper in den Transfer-Experimenten wurden polyklonale Anti-Ziege-Antikörper aus dem Hasen verwendet (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Bestellnummer: P-0449) an die HRP (Horse Radish Peroxidase) gekoppelt war. Bei diesem Experiment sollte überprüft werden, ob die Fusionsproteine im Kulturüberstand logarithmisch wachsender Kulturen nachzuweisen sind. Erste Versuche mit den rekombinanten Stämmen *C. acetobutylicum* p7BIG1TOX (Klon p7M) und *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX (Klon C6) ergaben einen deutlichen Nachweis des Proteins im Kulturüberstand von Klon C6 (Abbildung 21). Die Western-Transfer-Experimente mit einem Klon des *Clostridium* Stammes, welcher das Plasmid p7BIG3TOX trug, zeigten keine nachweisbare Produktion des Fusionsproteins. Die Positiv-Kontrolle mit rekombinantem CPE aus *E. coli*, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gress aus der Inneren Medizin I der Universität Ulm zur Verfügung gestellt.

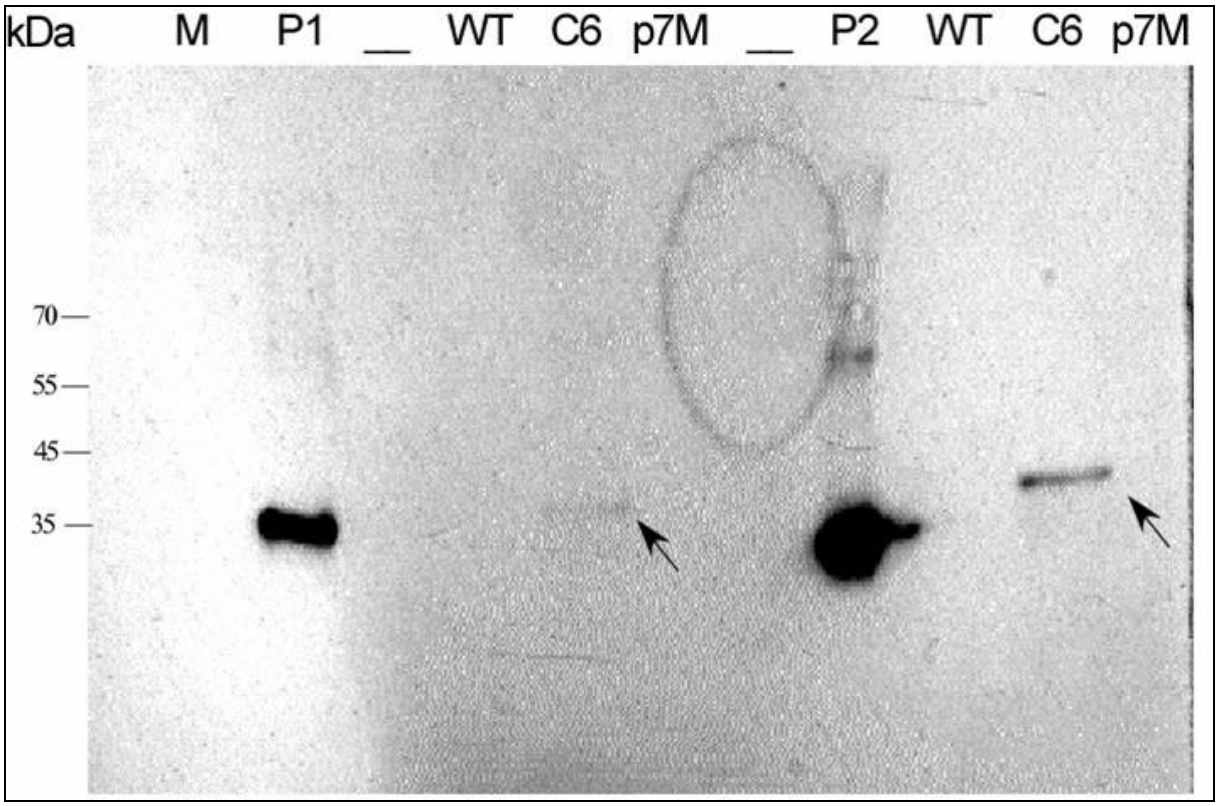


Abbildung 21: Western-Transfer-Nachweis mit je 20 µl Kulturüberständen der rekombinanten *C. acetobutylicum* Stämme p7BIG2TOX und p7BIG1TOX, mit polyklonalen Antikörpern gegen CPE aus *C. perfringens*. M= Grössenstandard; P1, P2 = Positiv-Kontrolle (rekombinantes CPE aus *E. coli*) mit 10 ng bzw. 15 ng; WT = Negativ-Kontrolle (Wildtypstamm *C. acetobutylicum* DSM 792); C6 = p7BIG2TOX-Stamm ; P7 = p7BIG1TOX-Stamm. Antikörper: Ziege Anti-*C. perfringens*-Enterotoxin A (CPE).

In weiteren Experimenten sollte die Lokalisation des Toxins in den verschiedenen rekombinanten Stämmen untersucht werden. Hierfür wurden Zellen logarithmisch bei 37 °C in MES-Medium wachsender Kulturen bei einem pH-Wert von 6 geerntet. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend wurden die Proteine in eine cytosolische und eine membrangebundene Fraktion aufgetrennt (2.8.14) und in Western-Transfer-Experimenten untersucht. In den Abbildungen 22 und 23 ist zu sehen, dass der Stamm mit dem Plasmid p7BIG3TOX auch hier keinerlei Reaktion mit den verwendeten Antikörpern zeigte. Der Stamm mit dem Plasmid p7BIG1TOX zeigt, im Gegensatz zu den vorhergegangenen Experimenten mit den Überständen der Kulturen, eine deutliche Reaktion der Antikörper mit einem Protein aus der Membranfraktion des Stammes. Die Größe dieses Proteins erscheint hierbei ein wenig größer als die des nativen CPE. Der Stamm mit dem Plasmid p7BIG2TOX

weist mehrere Signale sowohl in der Membran- als auch in der Cytosol-Fraktion auf. Auffällig ist ein deutliches Signal bei 70 kDA, was eventuell für eine Dimerisierung des Proteins sprechen könnte. Wiederum konnte keine Reaktion mit Proteinfraktionen des Wildtypstammes *C. acetobutylicum* DSM 792 nachgewiesen werden.

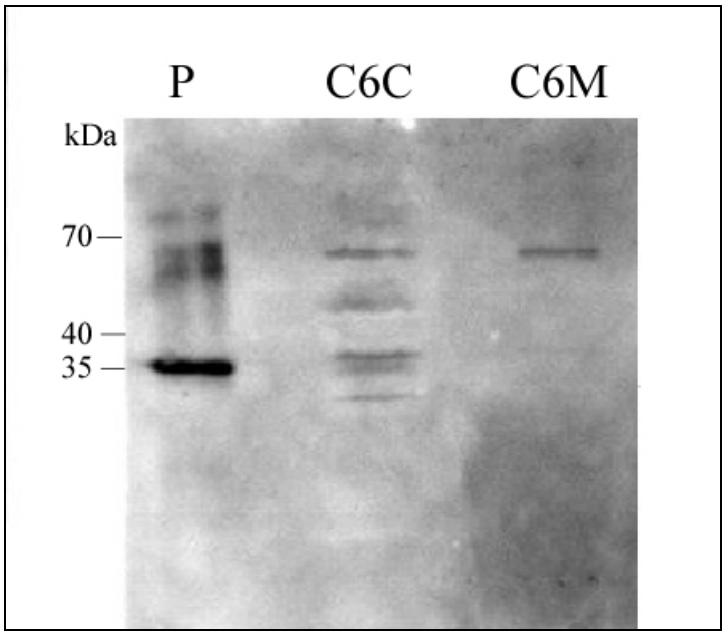


Abbildung 22: Western-Transfer-Nachweis von CPE in der Membran- und Cytosol-Fraktion des rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stamms p7BIG2TOX, P = Positiv-Kontrolle (25 ng rekombinantes CPE aus *E. coli*); C6C = 20 µl Cytosol-Fraktion; C6M = 20 µl Membran-Fraktion; Antikörper: Ziege Anti-*C. perfringens*-Enterotoxin A (CPE).

Deutlich ist eine Veränderung der Positiv-Kontrolle im Vergleich zu den ersten Western-Transfer-Experimenten zu erkennen. Zusätzliche Banden oberhalb des normalen Laufverhaltens des rekombinanten CPE traten vermehrt auf. Die einzelnen Experimente lagen Monate auseinander und die Kontrolle wurde bei -70 °C gelagert.

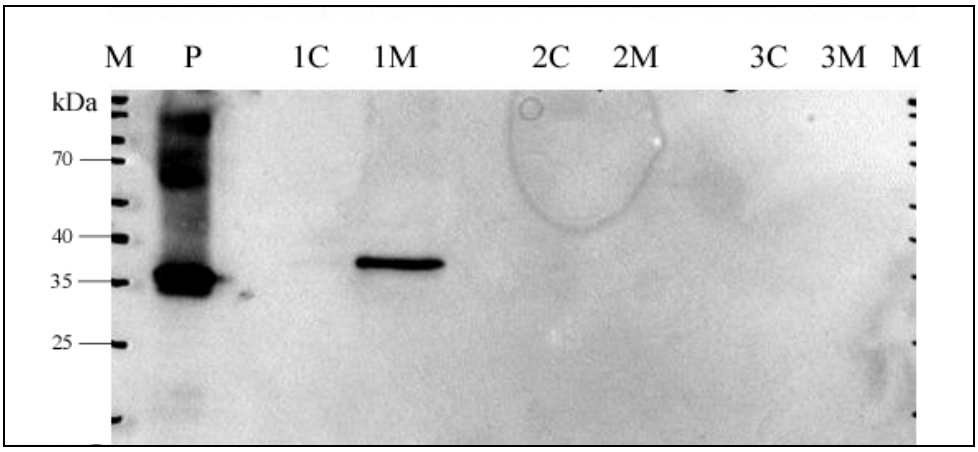


Abbildung 23: Western-Transfer-Nachweis von CPE in der Membran- und Cytosol-Fraktion des Wildtpystamms DSM 792 und der rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stämme p7BIG1TOX und p7BIG3TOX. M = Grössenstandard; P = Positiv-Kontrolle (25 ng rekombinantes CPE aus *E. coli*); 1C und 1M, je 20 µl Cytosol- und Membranfraktion p7BIG1TOX; 2C und 2M, je 20 µl Cytosol- und Membranfraktion p7BIG3TOX; 3C und 3M, Negativ-Kontrolle mit je 20 µl Cytosol und Membranfraktion des Wildtypstamms DSM 792, Antikörper: Ziege Anti-*C. perfringens*-Enterotoxin A (CPE).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Experimente mit dem rekombinanten Stamm *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 durchgeführt (Abbildung 24).

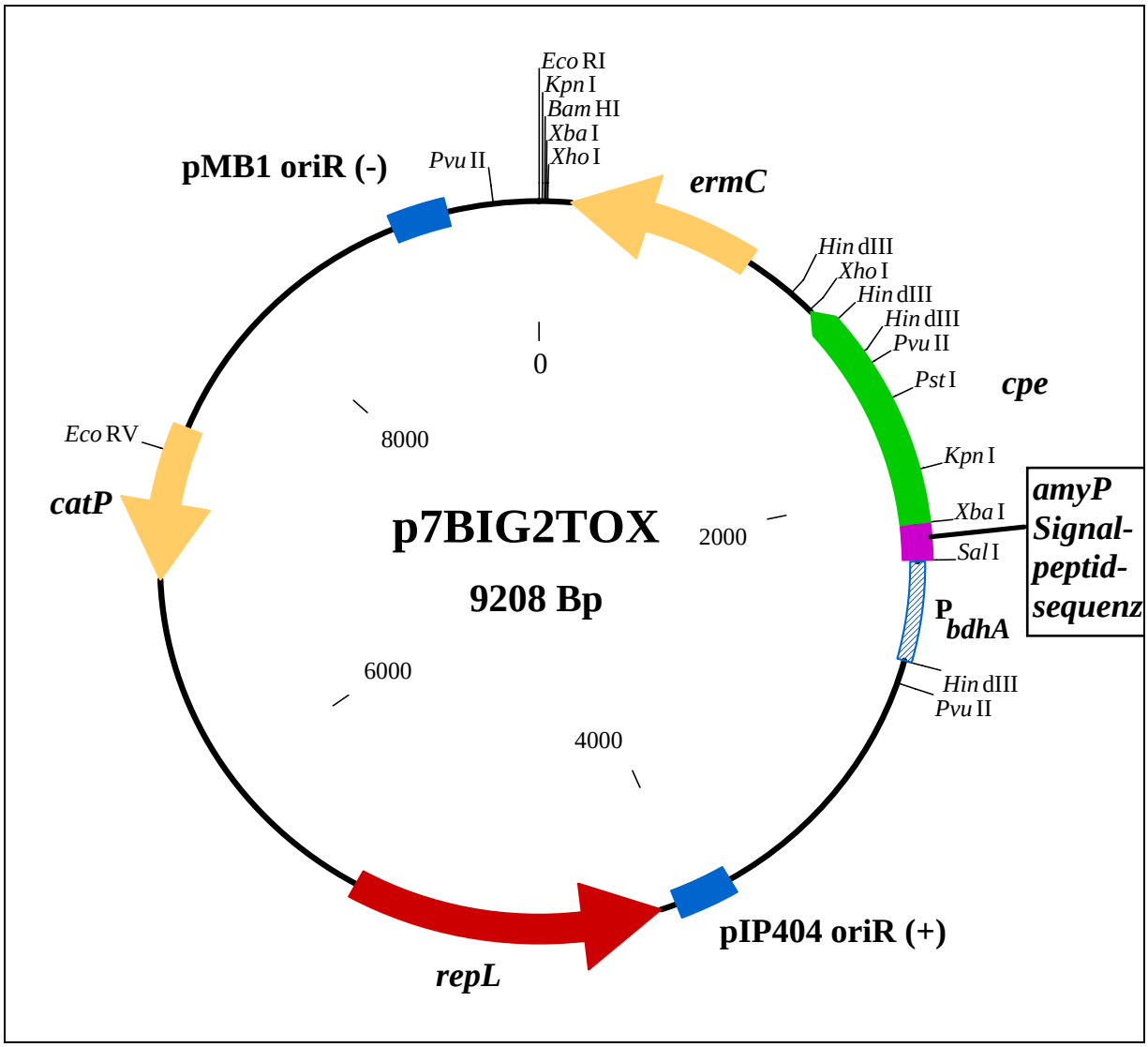


Abbildung 24: Karte des Expressions-Schaukel-Vektors p7BIG2TOX. *repL*: codiert für das pIM13-Replikationsprotein; *pIP404 oriR (+)*: Replikationsursprung für Gram$^+$ Bakterien aus pIP404; *catP:* Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen aus *C. perfringens*; *pMB1 oriR (-)*: Replikationsursprung für Gram$^-$ Bakterien aus pIP404; P_{bdhA}: Promoter des Butanol-Dehydrogenase-A-Gens aus *C. acetobutylicum; amyP*: Gen-sequenz des Signalpeptids des *C. acetobutylicum* AmyP-Proteins; *cpe*: *C. perfringens* Enterotoxin-Gen; *ermC*: 23S rRNA-Methylase.

In einem Wachstumsversuch in MES-gepuffertem Medium (2.5.1.4) mit Thiamphenicol und Clarythromyicin (2.5.3) sollte untersucht werden, ob das Wachstum des rekombinanten Stammes *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 gegenüber dem Wildtypstamm DSM 792 in MES-gepuffertem Medium ohne Antibiotikum Unterschiede aufweist. Das Wachstum wurde bei 37 °C durchgeführt und der pH-Wert und die optische Dichte OD_{600} wurden in

regelmäßigen Abständen gemessen (Abbildung 25). An 6 Zeitpunkten wurden Proben entnommen, um die Toxinkonzentration im Überstand zu ermitteln und mRNA zu isolieren.

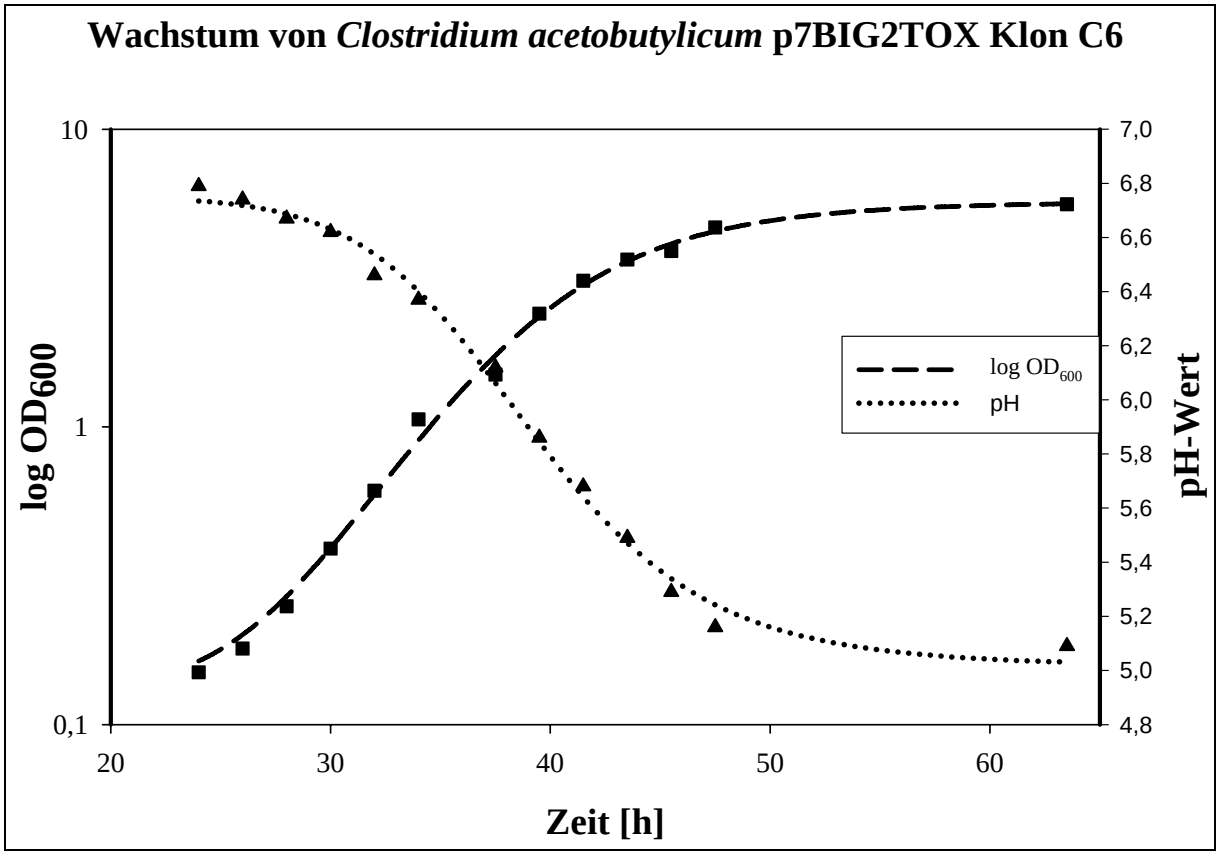


Abbildung 25: Wachstumskurve des rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stammes p7BIG2TOX Klon C6 in phosphatlimitiertem Minimalmedium, MES-gepuffert (2.5.1.4). ■ = OD600-Messung; ▲ = Messung des pH-Wertes.

Die Probennahmen erfolgten nach 26 h, 30 h, 34 h, 37,5 h sowie 39,5 h und 45,5 h. Nach 46 h war die Kultur in die stationäre Phase eingetreten, und die Probennahme wurde beendet. Im Vergleich zu einem parallel durchgeführten Wachstum des Wildtypstammes *C. acetobutylicum* DSM 792 (nicht dargestellt) konnten keine Unterschiede im Wachstumsverhalten ermittelt werden.

Die einzelnen Proben wurden 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert und je 20 µl des Überstands wurden in ein Western-Transfer-Experiment eingesetzt (Abbildung 26).

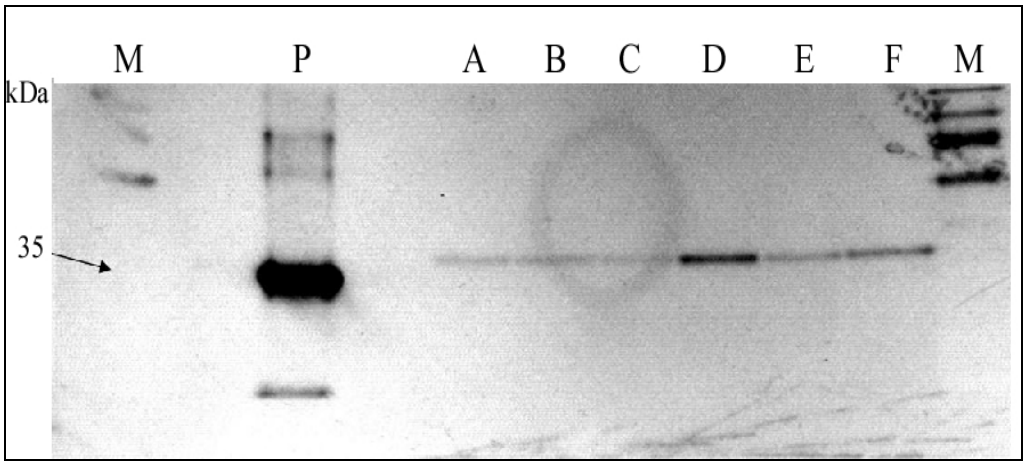


Abbildung 26: Western-Transfer-Nachweis von CPE-Konzentrationen in 20 µl Kulturüberstand während des Wachstums des rekombinanten *C. acetobutylicum* Stammes p7BIG2TOX. M = Grössenstandard; P = Positiv-Kontrolle (25 ng rekombinantes CPE aus *E. coli*); A-F Zeitpunkt der Probenahme (Vergleiche Abbildung 22) : A = 26 h, B = 30 h, C = 34 h, D = 37,5 h, E = 39,5 h, F= 45,5 h. Antikörper: Ziege Anti-*C. perfringens*-Enterotoxin A (CPE).

Aus dem Experiment ist abzulesen, dass die Expression des Toxins während des gesamten logarithmischen Wachstums erfolgt. Messpunkt D nach 37,5 h zeigt die höchste Konzentration an Toxin bei einer OD_{600} von 1,5 und einem pH-Wert von 6,12. RT-PCR Experimente mit mRNA des rekombinanten Stammes und den Oligonukleotidstartern „Sig2-for-sal“ und „Cpe-sig-seq-rev“ ergaben dasselbe Ergebnis. Bei allen Probezeitpunkten konnte ein mRNA- Transkript des Fusionsgens nachgewiesen werden.

3.2.5 Konzentration des rekombinanten CPE-Toxins

Für verschiedene Cytotoxizitätstests und Aufreinigungsschritte war es notwendig, die Toxinkonzentration in wässriger Lösung zu erhöhen und andere störende Medienrückstände zu entfernen. Für diese Methode wurden die Proben des Kulturüberstands von *C. acetobutylicum* DSM 792 und des rekombinanten Stammes *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX KlonC6 mit Centricon®-Säulen (2.8.5.1) aufgereinigt. Je 1,5 ml der Proben wurden auf die Säulen aufgetragen und bei 4 °C für 30 min bei 5000 x g zentrifugiert. Nach diesem ersten Schritt wurden das Eluat entweder auf eine neue Säule mit kleinerem Porendurchmesser

aufgebracht oder bei -70 °C eingefroren. Zur Verdünnung der Medienrückstände wurden die Säulen mit PBS-Zellkultur-Puffer gespült, bevor die Proteine eluiert wurden. In den Versuchen wurde mit Centricon®-Säulen mit den Ausschlussgrössen 30 kDA, 50 kDa und 100 kDa gearbeitet. In einer Versuchsreihe wurde ermittelt, dass bereits ein Konzentrieren und anschließendes Waschen der Proben auf einer Centricon®-50-Säule ein gutes Ergebnis liefert. Allerdings sind auch im Eluat noch deutliche Reste von CPE nachweisbar. Die besten Resultate wurden erzielt bei einem Abtrennen der hochmolekularen Proteinfraktion über eine Centricon®-100-Säule mit anschließendem Waschschritt und ein Abtrennen der niedermolekularen Proteine über eine Centricon®-30-Säule. Das Retentat der Centricon®-30-Säule zeigte wie in Abbildung 27 zu sehen die höchste Konzentration an CPE.

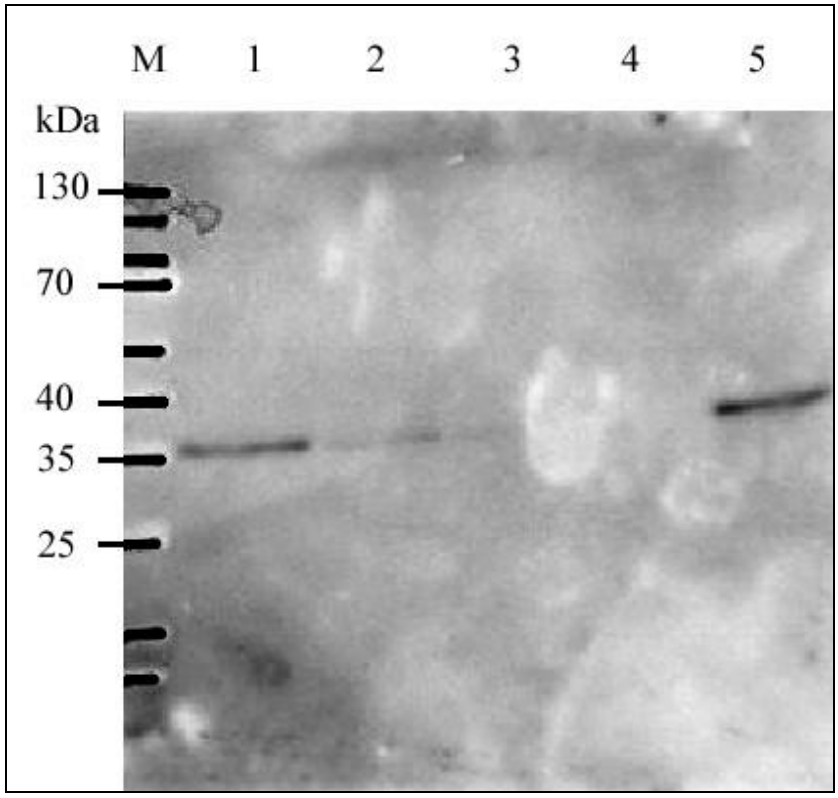


Abbildung 27: Western-Transfer-Nachweis von CPE in je 20 µl Kulturüberstand des rekombinanten *C. acetobutylicum* Stammes p7BIG2TOX, nach einer Konzentration durch Centricon® (Cent) Mikrokonzentratorsäulen (2.8.5.1). M = Grössenstandard; 1 = Retentat Cent50; 2 = Eluat Cent50; 3 = Eluat Cent100; 4 = Eluat Cent100/ Eluat Cent30; 5 = Eluat Cent100/ Retentat Cent30. Antikörper: Ziege Anti-*C. perfringens*-Enterotoxin A (CPE).

Aus Mengenabschätzungen über die Bandenintensität der Proben und der Positivkontrollen bei verschiedenen Western-Transfer-Versuchen ergab sich eine Größenordnung der CPE-Konzentration von ca. 400-500 ng je ml Kulturüberstand.

3.2.6 Cytotoxizitätstests mit rekombinantem CPE-Toxin

Alle diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gress in der Inneren Medizin I durchgeführt.

Die bei verschiedenen Wachstumsversuchen gewonnenen Kulturüberstände wurden in Cytotoxizitätstests mit Zellen der humanen Pankreas-Karzinom Zellinie CAPAN1 eingesetzt (2.8.4). Hierbei wurde in einer ersten Reihe der Kulturüberstand des Wildtypstammes *C. acetobutylicum* DSM 792 und der rekombinante Stamm p7BIG2TOX Klon C6 eingesetzt. Die Überstände wurden in beiden Fällen bei einem pH-Wert von 6 abgenommen. Als Kontrolle wurde eine Probe nur mit PBS-Zellkultur-Puffer behandelt. Die Zellkulturen wurden 2 h inkubiert und anschließend wurde der Anteil abgelöster und damit abgestorbener Zellen ermittelt (Abbildung 28).

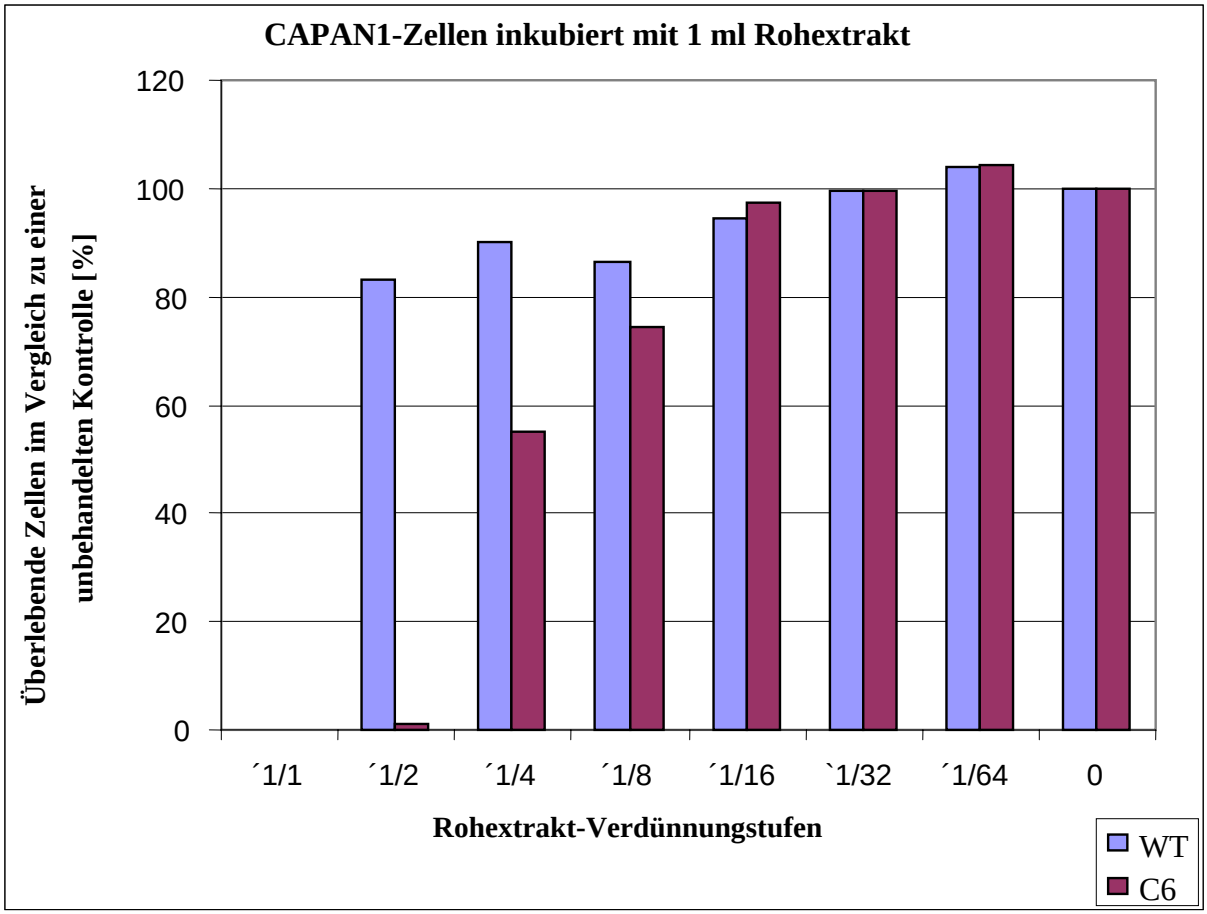


Abbildung 28: Cytotoxizitätstest mit humanen Pankreas-Karzinom-Zellen der Zellinie CAPAN1. Im Vergleich Kulturüberstände des Wildtypstammes *C. acetobutylicum* DSM 792 und des rekombinanten Stammes *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6. Verdünnung der Proben mit PBS-Puffer (2.8.5.1).

Anhand der Ergebnisse ist abzulesen, dass ein unverdünntes Einsetzen von Kulturüberständen der Clostridien in beiden Fällen zu einem deutlichen Absterben der empfindlichen Zellkulturen führte. Erst in den Verdünnungen wurde ein deutlicher Effekt des CPE festgestellt. Die Menge an Toxin, die in einer 50 %-igen Lösung Kulturüberstand von *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 enthalten ist, reichte aus, um ein Absterben aller Zellen in dem Experiment zu verursachen. In weiteren Verdünnungsstufen nahm die Wirkung des Toxins wie erwartet ab. Um die Menge an wirksamem Toxin in den Überständen zu ermitteln, wurden parallel in der Inneren Medizin I von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gress Versuche mit aufgereinigtem, rekombinantem CPE aus *E. coli* durchgeführt. In diesem Versuch wurden mit PBS-Zellkultur-Puffer verdünnte Toxinproben eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 29 dargestellt.

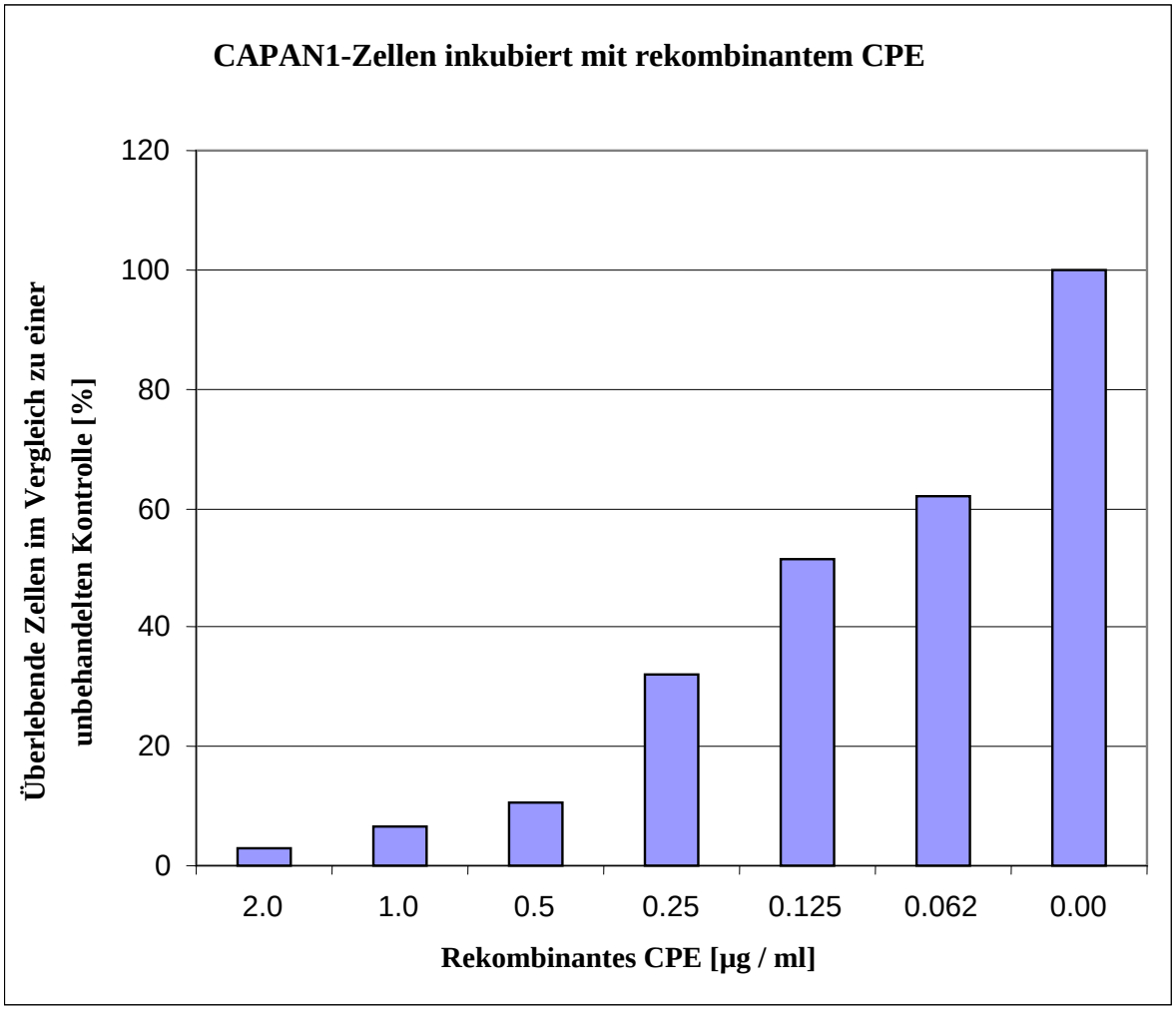


Abbildung 29: Cytotoxizitätstest mit humanen Pankreas-Karzinom-Zellen der Zellinie CAPAN1, mit steigender Menge an rekombinantem CPE aus *E. coli.*

Ab einer Konzentration von 62 ng/ml ist ein deutlicher Effekt des Toxins zu messen. Ab einer Konzentration von 500 ng/ml sind annähernd alle Zellen geschädigt oder abgetötet. Im Vergleich mit der Wirkung der Kulturüberstände des Stammes *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 lässt sich eine ungefähre Konzentration des Toxins von 500 ng/ml im Überstand ermitteln. Die Wirkung einer 1:4 verdünnten Probe in Abbildung 28 zeigt nahezu denselben Effekt wie 125 ng/ml in Abbildung 29. Dieser Ergebnisse decken sich mit den Mengenabschätzungen über die Bandenintensität bei den Western-Transfer-Ergebnissen.

In einem weiteren Experiment sollten die Erfolge der Konzentration über die Mikrokonzentratorsäulen überprüft werden. Die konzentrierten Proben (3.2.5), die in Abbildung 27 beschrieben sind, wurden in einem weiteren Cytotoxizitätstest eingesetzt. Hierbei sollte ermittelt werden, ob eine solche Behandlung der Proben zu einem Wirkungsverlust der Proben führt und ob die Toxinmenge in einer Probe erhöht werden kann.

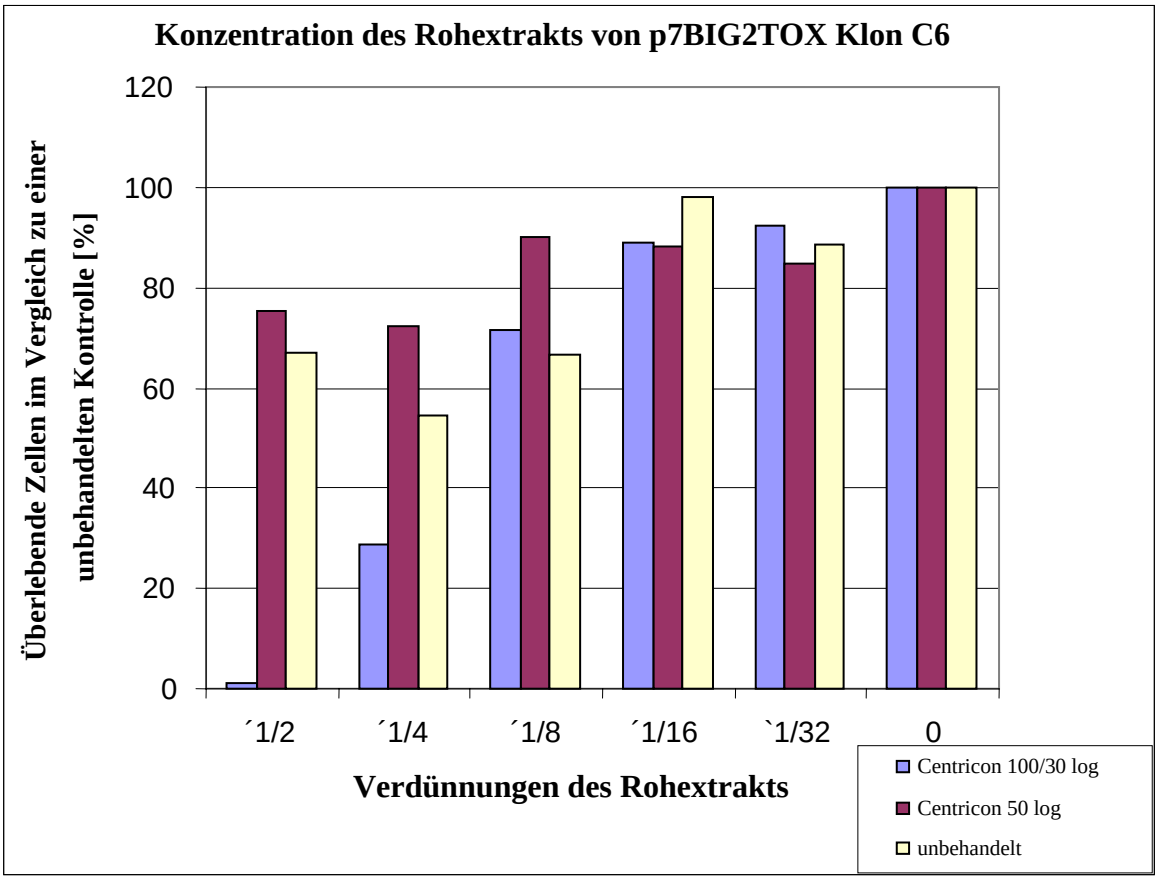


Abbildung 30: Cytotoxizitätstest mit humanen Pankreas-Karzinom-Zellen der Zellinie CAPAN1. Im Vergleich mit Mikrokonzentratorsäulen (2.8.5.1) konzentrierte und unbehandelte Kulturüberstände des Stammes *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX.

Anhand der Ergebnisse lässt sich ablesen, dass eine Konzentration des Toxins nur durch das doppelte Verfahren erreicht werden konnte. Nur wenn die Proben erst über eine Centricon 100-Säule gelaufen waren und das Eluat anschließend auf einer Centricon 30-Säule von den niedermolekularen Proteinen getrennt wurde, ist eine Steigerung der Wirksamkeit zu erkennen. In dem Retentat der Centricon 30-Säule befindet sich eine ungefähre Menge von 1 µg/ml CPE. Die Behandlung mit den Centricon 50-Säulen ist scheinbar nicht geeignet, um das Toxin zu konzentrieren.

3.2.7 Tierversuche mit rekombinanten *C. acetobutylicum*-Sporen

Um herauszufinden, ob die Menge an gebildetem Toxin auch in einem Mausmodell einen deutlichen Effekt auf das Tumorwachstum von Pankreas-Karzinomen zeigt, wurden Tierversuche durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden Sporensuspensionen des rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stammes p7BIG2TOX Klon C6 und des Wildtypstamms DSM 792 hergestellt. Hierfür wurden die Zellen auf 2x YTG-Agar-Platten (2.5.1.1) ausgebracht und 5-7 Tage bei 37 °C anaerob inkubiert. Die Sporen wurden anschließend mit sterilem PBS-Zellkultur-Puffer abgeschwemmt und in ein steriles anaerobes Hungate-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 4500 x g wurden der Überstand abgezogen und die sedimentierten Sporen erneut in sterilem PBS-Zellkultur-Puffer gelöst. Diese Lösung wurde 15 min bei 80 °C im Wasserbad pasteurisiert. Um eine möglichst genaue Anzahl der CFUs (Kolonie bildende Einheiten) in diesen Suspensionen zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen ausplattiert und ausgewertet.

Die unter sterilen Bedingungen gezüchteten „NMRI nu/nu“-Mäuse wurden mit einem CAPAN1-Tumor beimpft und nach einem Wachstum des Tumors auf eine Größe von etwa 1 cm Durchmesser mit den Sporen behandelt (2.9). Je 4 Mäuse wurden mit Wildtypsporen DSM 792 und mit Sporen von Klon C6 behandelt. Einer weiteren Kontrollgruppe von 4 Mäusen wurde nur PBS-Zellkultur-Puffer in die Schwanzvene injiziert. Bei allen so behandelten Mäusen konnten im gesamten Versuchsverlauf keine Unterschiede im Wachstumsverhalten der Tumore zwischen der Kontrollgruppe und den sporenbehandelten Mäusen festgestellt werden. Nach zwei Wochen wurden alle Mäuse in der Versuchstierdiagnostik Labor Dr. Maier der Universität Ulm getötet und die sporenbehandelten Tiere wurden auf eine Besiedelung durch Clostridien untersucht. Es konnte keine Besiedelung der Tumore nachgewiesen werden. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob zwei Tage nach der Injektion der Sporensuspensionen noch lebensfähige Clostridien nachzuweisen waren. Hierbei wurden Sporen der Clostridien im Gewebe der Leber und der Milz gefunden und konnten auch wieder zum Auskeimen angeregt werden. Eine dichte Besiedelung der Tumore konnte aber auch hier nicht gezeigt werden.

3.3 Untersuchungen der Abhängigkeit der *cpe*-Gen-Expression von Spo0A

C. perfringens Typ A produziert CPE in Zusammenhang mit der Sporulation und setzt es bei der Lyse der Mutterzelle frei (DUNCAN et al., 1972). In neuen Studien konnte gezeigt werden, dass die Produktion des Toxins unmittelbar vom Vorhandensein des Sporulationsregulators Spo0A abhängig ist (HUANG et al., 2004). In einem genetisch veränderten *C. perfringens* Stamm wurde das *spo0A*-Gen ausgeschaltet, und dieser Stamm konnte wie erwartet keine Sporen mehr bilden. Auch die Produktion des Toxins wurde völlig unterbunden. Spo0A bindet in seiner aktiven, phosphorylierten Form (Spo0A-P) im Modellorganismus *B. subtilis* an bestimmte Gensequenzen, TGNCGAA (BURBULYS et al., 1991), im 5´-regulatorischen Bereich von beeinflussten Genen. In einer Analyse des regulatorischen Bereichs vor dem *cpe*-Gen wurden mehrere mögliche Spo0A-Bindestellen identifiziert. Es sollte nun mittels Gelretardationsexperimenten untersucht werden, ob Spo0A-P an diese Stellen binden kann.

3.3.1 Genetische Organisation des 5'-regulatorischen Bereichs des *cpe*-Gens

Im 5'-regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens konnten bislang 3 aktive Promotorstrukturen identifiziert werden (MELVILLE et al., 1994). Die Induktion dieser Promotoren ist sporulationsabhängig (ZHAO und MELVILLE, 1998). Bei Analysen dieses Genbereichs wurden mehrere potentielle Spo0A-Bindestellen identifiziert (Tabelle 10).

Position	**Sequenz**
+ 36 bis +30	gtTCGAA
- 462 bis - 456	TGCCaAA
- 165 bis - 171	TGCtGAA
- 144 bis - 138	TGTaGAA

Tabelle 10: Positionen der ermittelten, potentiellen Spo0A-Bindestellen im 5'-regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens von *C. perfringens*. Groß geschriebene Nukleotide entsprechen der *B. subtilis* Konsensussequenz TGNCGAA.

Die ermittelten Transkriptionsstartpunkte für das *cpe*-Gen liegen auf den Positionen -58, -75 und -143. Der Promotorbereich des dritten Transkriptionsstarts liegt im Bereich von zwei potentiellen Spo0A-Bindestellen. Abbildung 32 zeigt eine schematische Darstellung des Genbereichs.

3.3.2 Gelretardationsexperimente mit rekombinantem Spo0A aus *C. acetobutylicum*

Eine Bindung von Spo0A-P an den 5'-regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens wäre ein indirekter Hinweis für einen Einfluss auf die Expression des Toxins. In einem Gelretardationsexperiment (2.8.13) sollte untersucht werden, ob in *E. coli* überexprimiertes *C. acetobutylicum*-Spo0A (HOLLERGSCHWANDER, 2003) in seiner phosphorylierten Form an den 5'-regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens aus *C. perfringens* binden kann. Als DNA-Sonde wurde ein PCR-Produkt der Oligonukleotidstarter „CPE-int-BS-for“ und “Cpe-int-r-pst1” verwendet. Die 280-Bp-lange DNA-Sonde wurde anschließend radioaktiv markiert. Spo0A wurde in vitro phosphoryliert und zusammen mit der markierten DNA-Sonde in den Experimenten eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente eine DNA-Sonde aus dem geninternen Bereich des *adc*-Gens von *C. acetobutylicum*, die keine Spo0A-Bindestellen aufweist. Als weitere Kontrolle wurde der 5'-regulatorische Bereich des *adcR*-Gens aus *C. acetobutylicum* in den Experimenten eingesetzt, der in unserer Arbeitsgruppe im Zusammenhang mit anderen Experimenten untersucht wird. Die Proben wurden mit unterschiedlicher Menge an phosphoryliertem Spo0A inkubiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Auswertung der Gele erfolgte in einem Phosphoimager (FUJIX BAS 1000). Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 31 dargestellt.

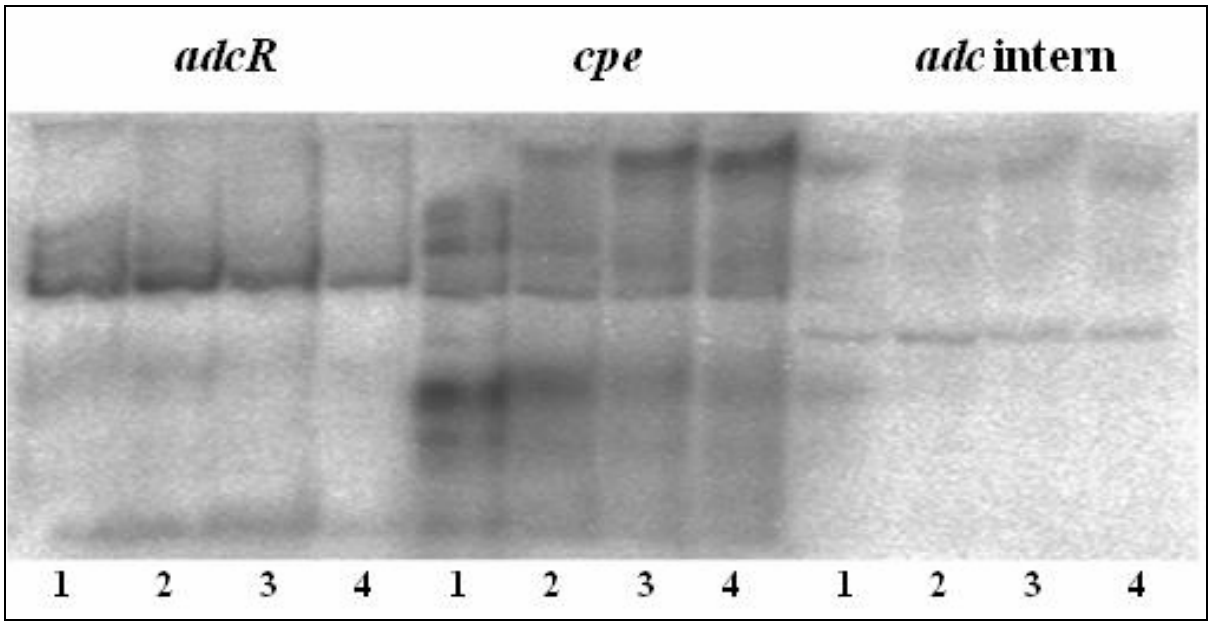


Abbildung 31: Gelretardationsexperiment (2.8.13) mit rekombinantem Spo0A-P aus *E. coli*. a*dcR*: DNA-Sonde mit der Spo0A-Bindestelle des *adcR*-Gens aus *C. acetobutylicum*; *cpe*: DNA-Sonde mit dem DNA-Bereich BS IV (Abbildung 33) aus dem 5´-regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens aus C. *perfringens*-Typ-Stamm A; *adc*intern: DNA-Sonde ohne Spo0A-Bindestelle aus dem *adcR*-Gen von *C. acetobutylicum*; Spuren 1-4: aufsteigende Konzentration von Spo0A-P: 1 = 0 µg, 2 = 0,4 µg, 3 = 0,8 µg, 4 = 1,2 µg.

Die Ergebnisse der Gelretardationsexperimente zeigen eine deutliche Bindung des rekombinanten phosphorylierten *C. acetobutylicum*-Spo0A an die DNA-Sonde *cpe*. Mit der DNA-Sonde *adcR* ist eine leichte Abnahme der Bandenintensität messbar die eine Interaktion vermuten lässt, aber keine eindeutige Verschiebung.

Mit dieser ersten *cpe*-Sonde wurde der Genbereich - 240 bis + 40 des *cpe*-Gens erfasst. In diesem Bereich liegen 3 der ermittelten potentiellen Bindestellen (BS IV in Abbildung 32) . Um in einem weiteren Experiment eine genauere Identifizierung der verwendeten Bindestelle von Spo0A-P zu ermitteln, wurden erneut DNA-Sonden hergestellt (Abbildung 33). Für die Sonde BS I wurden die Oligonukleotidstarter „CPE-BSII-for“ und „Cpe-Int-BSII-rev“ verwendet. Das PCR-Produkt umfasst 372 Bp. Die Oligonukleotidstarter-Paare „CPE-int-BS-for“ und „CPEI-rev1“ wurden für das 240-Bp-große PCR-Produkt BSII verwendet und das Paar „CpeI-for2“ und „Cpe-sig-seq-rev“ für das 201-Bp-große PCR-Produkt BSIII.

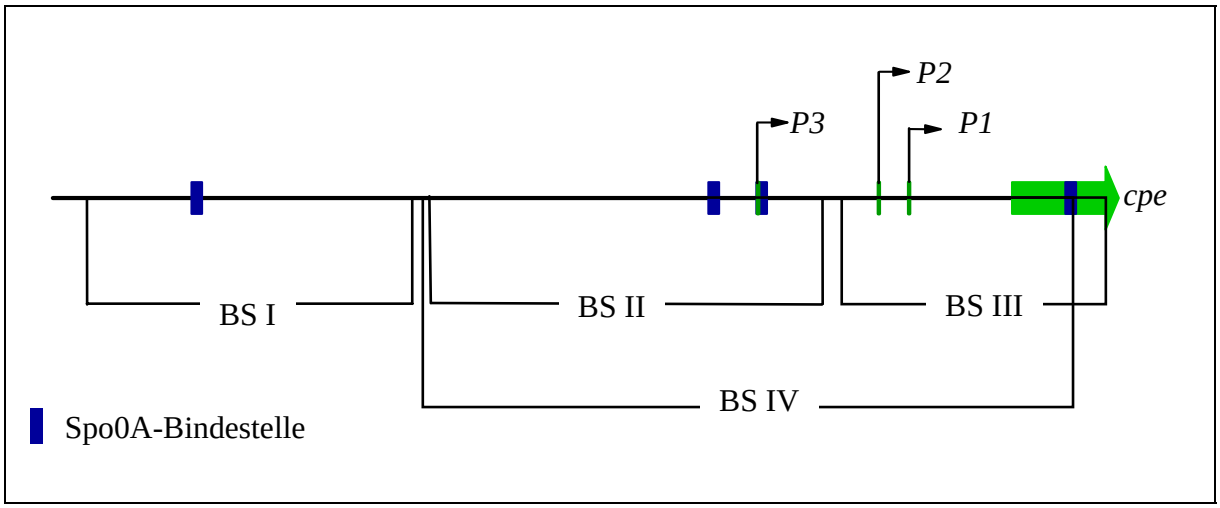


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Lage der potentiellen Spo0A-Bindestellen vor dem *cpe*-Gen in *C. perfringens*-Typ-Stamm A. P1- P3 = Transkriptionsstartpunkte; BS I – BS IV: Lage der verwendeten DNA-Sonden für die durchgeführten Gelretardationsexperimente (2.8.13).

In allen weiteren Versuchen konnte die tatsächlich verwendete Spo0A-P-Bindestelle nicht ermittelt werden. Durchgeführte Gelretardationsexperimente mit den verschiedenen DNA-Sonden ergaben keine eindeutigen Ergebnisse.

3.4 Untersuchung der Genregion *cac*0338 und *cac*0339

In der Freiburger Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie Abteilung I wurden bei Homologievergleichen mit dem veröffentlichten *C. acetobutylicum*-Genom (NÖLLING et al., 2001) zwei Gene entdeckt, die Ähnlichkeit zu toxincodierenden Genen der Clostridien-Gruppe aufweisen.

3.4.1 Homologien der untersuchten Gene zu Toxin-Genen aus *C. botulinum*

Das Gen *cac*0338 codiert für ein Protein mit 388 Aminosäuren und trägt eine clostridielle Binär-Toxin A-Domäne im C-terminalen Bereich (Abbildung 33). Es weist Homologien zu einem mono-ADP-Ribosyltransferase C3-Vorläufer aus der CF-7 Familie auf. BLASTp

(Basic Local Alignment Search Tool; ALTSCHUL et al., 1997)-Vergleiche des Proteins ergaben eine Ähnlichkeit zur Komponente 1 des C2-Toxins von *C. botulinum*, zum Vorläufer der Komponente 1A des Iota-Toxins von *C. perfringens* und zu anderen ADP-Ribosyltransferasen. Das benachbarte Gen *cac*0339 weist hohe Ähnlichkeiten zu dem Gen einer ADP-Ribosylglykohydrolase auf und das codierte Protein weist bei einer SSDB (Sequence Similarity Database http://www.genome.jp/kegg/ssdb/)-Motiv-Suche eine entsprechende ADP-Ribosylglykohydrolase-Domäne auf (Abbildung 34). Eine ähnliche Anordnung beider Gene im Genom ist bei den Genen *lmo*0066 und *lmo*0067 in *Listeria monocytogenes*, dem Erreger der Listeriose, zu finden. Auch hier codieren die Gene für eine ADP-Ribosyltransferase und eine ADP-Ribosylglykohydrolase.

SSDB-Motiv-Suche

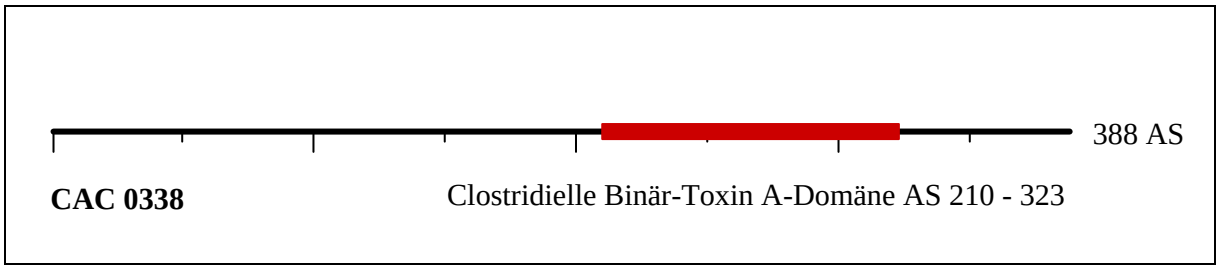


Abbildung 33: Schematische Darstellung des *C. acetobutylicum*-Proteins CAC0338. Es handelt sich vermutlich um eine Mono-ADP-Ribosyltransferase.

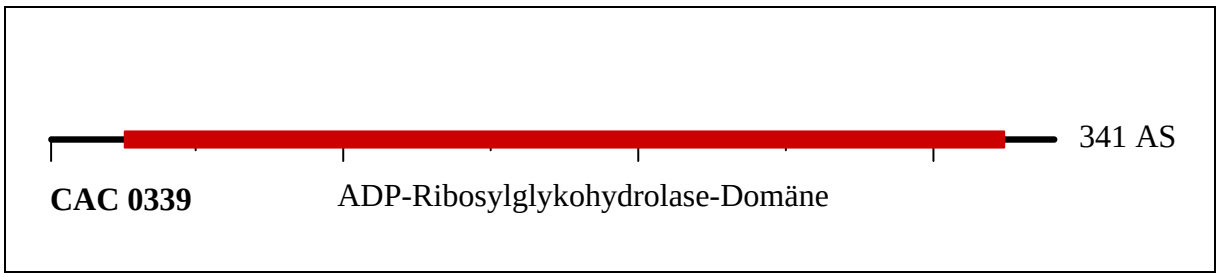


Abbildung 34: Schematische Darstellung des *C. acetobutylicum*-Proteins CAC0339. Es handelt sich vermutlich um eine ADP-Ribosylglykohydrolase.

3.4.2 Überexpression und Suppression der Gene cac*0338* und cac*0339*

Um nähere Kenntnisse über die Aufgaben dieser Gene in *C. acetobutylicum* DSM792 zu erhalten, sollten verschiedene Vektoren hergestellt werden. Mit diesen Vektoren sollte zum einen eine Überexpression und zum anderen eine Suppression der Gene über „Antisense"-mRNA erreicht werden. In weiteren Versuchen sollte ermittelt werden, ob mRNA dieser Gene in verschiedenen Wachstumsphasen nachzuweisen ist und ob die Gene mono- oder polycistronisch abgelesen werden. Die Genregion *cac*0334 bis *cac*0347 beinhaltet neben den beiden untersuchten Genen keine Gene, denen bislang eine Funktion zugewiesen werden konnte (Abbildung 35).

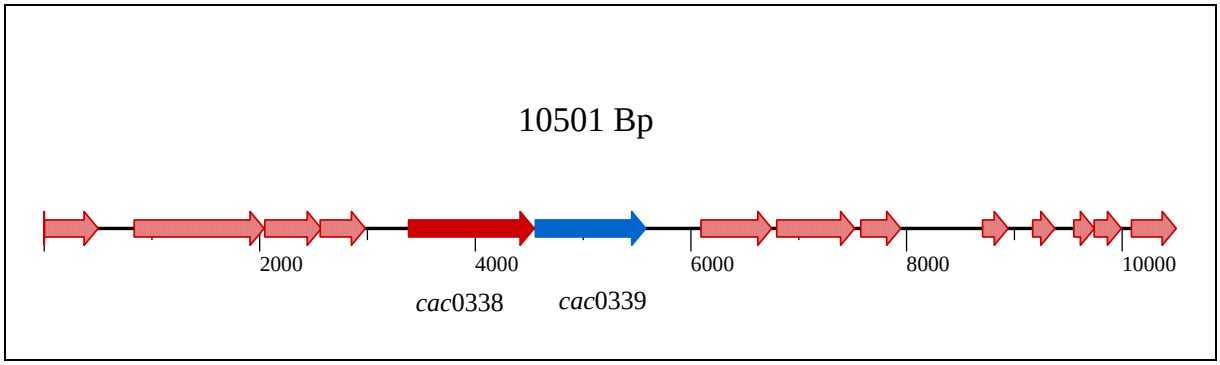


Abbildung 35: Schematische Darstellung der *C. acetobutylicum*-Genregion *cac*0334 bis *cac*0347 des Chromosoms. Bis auf *cac*0338 und *cac*0339 ist die Funktion der weiteren Gene völlig unklar.

Die Gene wurden mit den Oligonukleotidstarter-Paaren „Primer-ADP-for2" und „ADP1-rev" für *cac*0338 sowie „Adp2-for" und „ADP-2-rev-pstpae" für *cac*0339 aus chromosomaler DNA von *C. acetobutylicum* amplifiziert. Der Vektor pUC18 und das erste PCR-Produkt wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Bsp*TI geschnitten und ligiert. Der dabei entstandene Vektor PUC18-ADP1 wurde in kaltkompetente Zellen des Stamms *E. coli* XL1-Blue transformiert. In einem zweiten Schritt wurde der Vektor pUC18-ADP1 mit den Restriktionsenzymen *Bsp*TI und *Pst*I geschnitten und das zweite ebenfalls geschnittene PCR-Produkt ligiert. Nach der Ligation erfolgte ebenfalls eine Transformation des Vektors pUC18-ADP in *E. coli* XL1-Blue. Der Erfolg der Klonierungen wurde mittels Sequenzierung und Restriktionsanalysen verifiziert. Alle weiteren Amplifikationen der beiden Gene wurden mit diesem Vektor als DNA-Matrize durchgeführt.

Um in *C. acetobutylicum* eine Überexpression der Gene zu erreichen, sollten sie in den Vektor pJIR750-ptb (3.2.2) ligiert werden. Das Gen *cac*0338 wurde mit den Oligonukleotidstartern „ADP1-SalI-for“ und „ADP1-SalI-rev“ amplifiziert. Der Vektor pJIR750-ptb und das PCR-Produkt wurden mit dem Restriktionsenzym *Sal*I geschnitten und anschließend wurde das PCR-Produkt ungerichtet in den Vektor ligiert. Der dabei entstandene Vektor pJIR-ptb-ADP1 sollte dann in kaltkompetente Zellen des Stamms *E. coli* XL1-Blue transformiert werden. Die Selektion erfolgte ausschließlich auf das Resistenzgen *cat*P des Empfängervektors. Je nach Orientierung des PCR-Produktes nach der Ligation sollte durch diese Methode sowohl eine Überexpression des Gens als auch eine Repression über gegenläufige mRNA („Antisense“-mRNA) erreicht werden. Alle durchgeführten Experimente ergaben keine *E. coli*-Kulturen die einen wie gewünscht veränderten Vektor trugen. Es gelang weder einen Vektor für eine Überexpression, noch einen Vektor für eine Repression des Gens *cac*0338 zu erzeugen.
Das Gen *cac*0339 wurde mit den Oligonukleotidstartern „ADP2-SalI-for“ und „ADP2-SalI-rev“ amplifiziert und es wurden ebenfalls Versuche unternommen, dieses Gen in den Vektor pJIR750-ptb zu ligieren. Dabei entstanden die Vektoren pJIR-ptb-ADP2-Anti und pJIR-ptb-ADP2, welche beide das Gen in unterschiedlicher Orientierung tragen. In weiterführenden Schritten sollten diese beiden Vektoren für eine anschließende Transformation in *C. acetobutylicum*, in vivo methyliert werden. Hierfür wurden die Vektoren in elektrokompetente Zellen des Stamms *E. coli* SURE pANS1 transformiert und ein Erfolg der Methylierung über Restriktionsschnitte mit dem Enzym *Sat*I kontrolliert. Eine Transformation beider methylierter Vektoren in kompetente Zellen des Stamms *C. acetobutylicum* DSM 792 war nicht erfolgreich.

In einem anderen Experiment sollten beide Proteine mit einem C-terminalen Histidinrest versehen, und in den induzierbaren *E. coli* Expressionsvektoren pET29a und pET28a überproduziert werden. Die Gene wurden mit den Oligonukleotidstarter-Paaren „ADP1-his-for-NdeI” und „ADP1-his-rev-XhoI“ sowie „ADP2-his-for-mut NocI“ und „ADP2-his-rev-XhoI“ amplifiziert. Das Gen *cac*0338 sollte hierbei aufgrund im Gen vorkommender Schnittstellen für das Enzym *Nco*I in den Vektor pET29a ligiert werden. Um eine Überexpression des Gens zu gewährleisten, wurde das PCR-Produkt des promoterlosen Gens (ADP1) mit den Restriktionsschnittenzymen *Nde*I und *Xho*I geschnitten und in einen ebenfalls geschnittenen pET29a-Vektor ligiert. Das promoterlose PCR-Produkt des Gens *cac*0339 (ADP2) wurde mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Xho*I geschnitten und in den Vektor

pET28a ligiert. Da in dem PCR-Produkt eine *Nde*I-Schnittstelle vorhanden war, musste für dieses Gen der Vektor pET28a verwendet werden. Ein Erfolg der Ligationen und Tranformationen in kaltkompetente Zellen des Stamms *E. coli* XL1-Blue wurde über Restriktionsschnitt-Experimente und Sequenzierungen überprüft. Es gelang nicht, den Vektor pET29a mit dem PCR-Produkt *cac*0338 zu ligieren. Der Vektor pET28a-ADP2 mit dem promoterlosen Gen *cac*0339 wurde erfolgreich ligiert und nach einer Transformation in *E. coli* XL1-Blue bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C als Glycerinkultur abgelegt.

Um weiteren Aufschluss über die Funktion und die genetische Organisation der beiden Gene zu erhalten, wurden Experimente mit Gesamt-RNA aus *C. acetobutylicum* durchgeführt. In RT-PCR-Versuchen sollte untersucht werden, ob und wann mRNA der Gene nachweisbar ist und ob die Gene mono- oder polycistronisch organisiert sind. Gesamt-RNA wurde aus Proben verschiedener Wachstumsphasen isoliert und anschließend in RT-PCR-Experimenten eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden die Oligonukleotidstarter „GyrA-RT-for", "GyrA-RT-rev" und „GyrA-RT-rev-nest" verwendet, wobei der Oligonukleotidstarter „GyrA-RT-rev-nest" für die Reaktion der reversen Transskriptase eingesetzt wurde und die anderen beiden für eine anschließende Amplifikation des untersuchten Genfragments der GyraseA von *C. acetobutylicum*. Es wurde davon ausgegangen, dass mRNA des *gyr*A-Gens während des gesamten Wachstums von *C. acetobutylicum* gebildet werden würde. Mit den Oligonukleotidstartern „ADP1-RT-FOR", „ ADP1-RT-REV" und „Adp1-rt-rev-nest" sollte gebildete mRNA des Gens *cac*0338 nachgewiesen werden und mit den drei Oligonukleotidstartern „ADP2-RT-FOR", „ADP2-RT-REV" und „Adp2-rt-rev-nest" eine Bildung von mRNA des Gens *cac*0339. Durch eine Verwendung der Oligonukleotidstarter „ADP1-RT-FOR", „ADP2-RT-REV„ und „Adp2-rt-rev-nest" sollten erste Hinweise auf eine eventuelle polycistronische Organisation der beiden Gene erhalten werden. Als Negativ-Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen wurden dieselben Reaktionen ohne oder mit deaktivierter Reverser Transkriptase angesetzt. Die Positionen der verwendeten Oligonukleotidstarter sind in der Abbildung 36 dargestellt.

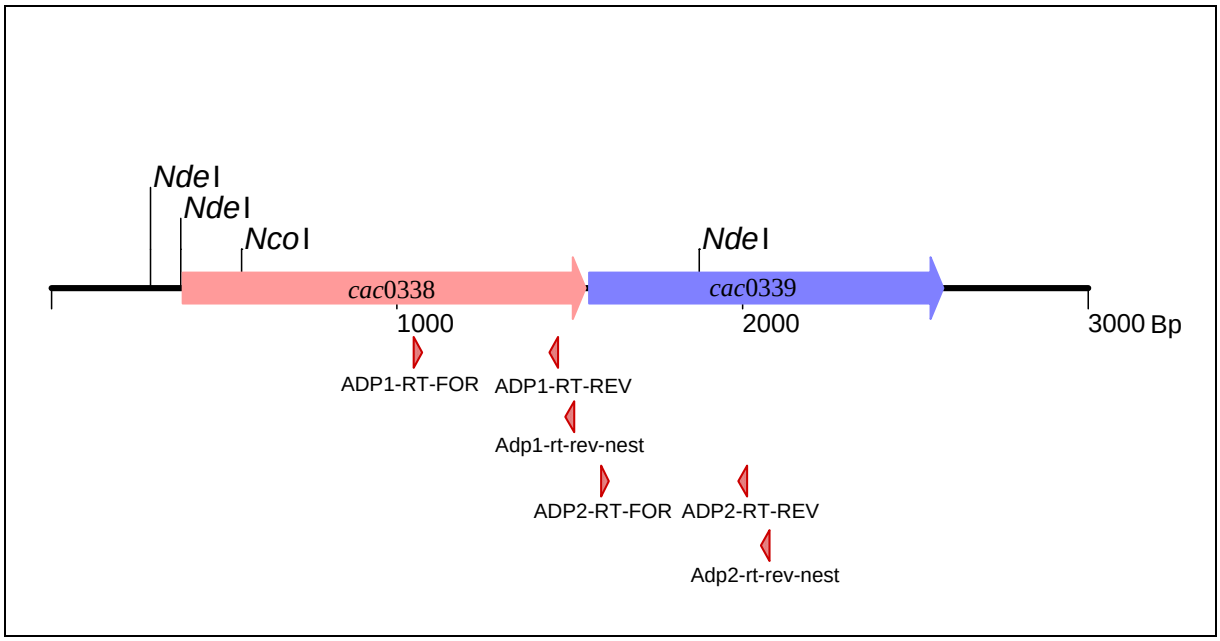


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Genregion *cac*0338 bis *cac*0339 mit allen für die RT-PCR-Experimente verwendeten Oligonukleotidstartern.

Die Verwendung eines dritten Oligonukleotidstarters für die Reaktion der Reversen Transkriptase wurde eingeführt, da eine direkte Amplifikation der cDNA häufig ohne Ergebnis blieb.

In den durchgeführten Experimenten konnte mit mRNA aus der logarithmischen Wachstumsphase, der Anlaufphase und der beginnenden stationären Phase kein Nachweis für mRNA der beiden untersuchten Gene erbracht werden. Die Positiv-Kontrollen fielen wie erwartet aus, und bei den Negativ-Kontrollen waren bei allen berücksichtigten Experimenten keine DNA-Verunreinigungen nachweisbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von Northern-Transfer-Experimenten abgesehen.

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkungen zur Tumortherapie

Eine der größten medizinischen Herausforderungen unserer Zeit ist die Entwicklung von Heilmethoden gegen Krebs. Die wirksamste Methode bleibt die Früherkennung und die damit verbundene operative Entfernung des malignen Gewebes. Für Tumore, die zu spät für einen chirurgischen Eingriff entdeckt werden oder in nicht operablem Gewebe liegen, bleiben oft nur Methoden mit großen Nebenwirkungen oder rein palliative Behandlungen. Durch die Blutbahn oder das Lymphsystem verbreitete Tochtergeschwülste (Metastasen) erschweren die Behandlung von Krebspatienten. Auch Metastasen sind nur bedingt durch Operationen zu entfernen und müssen meist mit Chemo- oder Strahlentherapie behandelt werden. Die moderne Molekularbiologie eröffnet neben diesen hergebrachten Methoden neue Wege. Zu den vielversprechenden neuen Möglichkeiten für eine gezielte Tumorbehandlung gehören Methoden, bei denen Enzyme oder Substanzen direkt an das Zielgewebe innerhalb des Tumors gelangen. Eine Methode umfasst die Expression tumoral wirksamer Enzyme durch Trägerviren. Eine andere untersuchte Möglichkeit ist die Koppelung von Enzymen oder cytotoxischen Substanzen an Antikörper gegen das Tumorgewebe oder das Einbetten in sich langsam auflösende Mikrokapseln. Ein weiterer und viel versprechender Ansatz besteht im Einsatz von Bakterien als Trägern für tumorwirksame Agenzien. Für eine gezielte Wirkung müssen die verwendeten Bakterien innerhalb des Tumorgewebes in der Lage sein, sich zu vermehren und zu wachsen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist eine einfache Kontrolle dieser Bakterien durch Antibiotika, um eine systemische Besiedelung zu verhindern. Tumore ab einer gewissen Größe besitzen innerhalb des stark wachsenden Tumorgewebes ein hypoxisches Zentrum. Dieser hypoxische Bereich kann durch anaerobe Bakterien besiedelt werden (MOESE und MOESE, 1959). Untersuchungen verschiedener Bakterienstämme haben gezeigt, dass die Gruppe der Clostridien ein sehr gutes Besiedlungsverhalten zeigt (LAMBIN et al., 1998; DANG et al., 2001). Die proteolytischen Eigenschaften bestimmter Clostridien-Stämme reichen bei Untersuchungen bereits aus, um einige Tumore am Wachstum zu hindern und in wenigen Fällen bereits eine vollständige Beseitigung des kranken Gewebes zu bewirken (BETTEGOWDA et al., 2003; AGRAWAL et al., 2004). Andere Ansätze zielen auf eine genetische Veränderung für eine Besiedelung gut geeigneter Clostridien-Stämme ab. Hierbei sollen auf bestimmte Tumoren abgestimmte Wirkstoffe

entweder direkt in den Tumor gebracht werden (THEYS et al., 2003) oder vor Ort durch gebildete Enzyme aktiviert werden (MINTON et al., 1995). Die Gruppe der Clostridien bietet also eine Möglichkeit, gezielte Therapieformen für Tumore mit hypoxischem Zentrum zu entwickeln (MINTON, 2003).

4.2 Die Entwicklung rekombinanter *Clostridium acetobutylicum*-Sporen für eine CDEPT (Clostridial Directed Enzyme Prodrug Therapy)

Die Entwicklung eines Trägersystems für tumorwirksame Enzyme mit Hilfe von anaeroben Bakterien bietet aufgrund der genetischen Modifizierbarkeit von Bakterien eine gute Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapieformen (LEMMON et al., 1997). Bei der CDEPT werden Sporen genetisch veränderter Clostridien in das zu behandelnde Tumorgewebe gebracht. Im hypoxischen Bereich des Tumors sollen diese Sporen dann auskeimen und bestimmte Enzyme bilden. Diese Enzyme sollen Vorstufen von Arzneimitteln („Prodrugs“) durch eine katalytische Reaktion in ihre wirksame Form überführen. Durch die Gabe der Arzneimittelvorstufen in die zuliefernde Blutbahn des Tumors kann hierbei eine lokal begrenzte Wirkung des Therapeutikums erreicht werden. Systemische Nebenwirkungen der aggressiven Tumormittel können dadurch reduziert werden (MINTON et al., 1995).
Das Besiedelungsverhalten durch clostridielle Sporen wurde in vivo unter anderem im Ratten-Tumormodell des Rhabdomyosarkoms R1 nachgewiesen (THEYS et al., 2001). Es konnte hierbei auch gezeigt werden, dass die Bakterien im gesunden Teil des Körpers nicht überleben konnten. Ausgeprägte Immunantworten und Nebenwirkungen in gesundem Gewebe durch die Applikation clostridieller Sporen konnten bislang noch nicht beobachtet werden.

4.2.1 Verwendung von CYP2BI als Aktivator für Arzneimittelvorstufen

In dieser Arbeit wurde versucht, das Cytochrom P_{450}-Enzym CYP2B1 aus *Rattus norvegicus* in *E. coli* und in *C. acetobutylicum* zu exprimieren. Durch eine Expression dieses Gens in hypoxischem Tumorgewebe sollten Vorstufen der cytostatischen Arzneimittel Ifosfamid und Cyclophosphamid in ihre wirksame Form überführt werden. Beide Arzneimittel werden bereits erfolgreich in der Tumortherapie eingesetzt (CREAVEN et al., 1976). Über die 4-hydroxylierende Reaktion des Enzyms werden die Arzneimittelvorstufen aktiviert und

bewirken eine Quervernetzung von DNA-Strängen und einen damit verbundenen Zelltod. Stark wachsendes Gewebe ist von der Wirkung der toxischen Substanzen am meisten betroffen, und somit wird insbesondere der Wachstumsbereich von Tumoren angegriffen.
Vorstufen dieser Arzneimittel werden bislang in die Blutbahn der Patienten injiziert und in der Leber durch das körpereigene Cytochromsystem aktiviert (CHEN et al., 2004). Das aktivierte Therapeutikum gelangt dann wieder über die Blutbahn in das zu behandelnde Gewebe. Durch die unspezifische Gabe des Arzneimittels können im gesamten Körper Nebenwirkungen auftreten. Eine gezielte Aktivierung des Mittels an seinem Wirkungsort würde eine Reduktion der Dosis erlauben und dadurch eine Minderung der Nebenwirkungen für den Patienten bedeuten. Die Nebenwirkungen entstehen zum einen durch den unspezifischen Angriff auf alle im Wachstum befindlichen Zellen und zum anderen durch eine Inaktivierungsreaktion der Arzneimittelvorstufen hin zu toxischen Produkten. Die körpereigenen Cytochrom P_{450}-Enzyme katalysieren zwei Reaktionen, bei der ersten handelt es sich um eine 4-Hydroxylierung hin zum aktiven Arzneimittel und bei der anderen um eine unerwünschte Deaktivierung der Arzneimittelvorstufen über N-Dechlorethylierung. Bei dieser Reaktion entstehen neuro- und nephrotoxisches Chloracetaldehyd und Acrolein, die zu weiteren starken Nebenwirkungen dieser Therapie führen (FURLANUT und FRANCESCHI, 2003).
Cytochrom P_{450}-Enzyme tragen als reaktives Zentrum eine Häm-Thiolat-Gruppe. Sie sind am oxidativen Abbau von Mutagenen und Umweltgiften beteiligt. Cytochrom P_{450}-Enzyme verwenden Elektronen von NAD(P)H, um molekularen Sauerstoff zu aktivieren. Dieser wird dann in einer zweiten Reaktion dazu verwendet, eine Vielzahl von Substraten zu modifizieren. Eine Sondergruppe der Cytochrom P_{450}-Enzyme kann den Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid für diese Reaktionen verwenden. In Prokaryoten liegen die Cytochrom P_{450}-Enzyme im Cytosol vor und in Eukaryoten sind sie meist in Membranen des endoplasmatischen Retikulums oder der Mitochondrien eingebettet. Die Gruppe dieser Enzyme zeichnet sich durch sehr geringe Sequenzhomologie untereinander aus, aber sie besitzen alle eine hoch konservierte Struktur und Faltung. Es sind bislang drei konservierte Bereiche bekannt; ein konserviertes Cystein, das für die Bindung mit dem zentralen Eisenatom der Häm-Gruppe zuständig ist, die Protonenübertragungsstelle und ein EXXR-Motiv in der K-Helix. Die Enzyme, die an der Lieferung der Reduktionsäquivalente beteiligt sind, unterscheiden sich je nach zellulärer Lokalisation (WERCK-REICHHART und FEYEREISEN, 2000). Für eine erfolgreiche und funktionale Expression des Enzyms wurde in mehreren Fällen die cDNA einer NAD(P)H-P_{450}-Reduktase zusammen mit dem Cytochrom

P_{450}-Gen in *E. coli* exprimiert (JOHN et al., 1994; SHIMADA und YAMAZAKI, 1998).

4.2.2 Cytochrom P_{450}-Enzyme und Häm-Synthese in *C. acetobutylicum*

Bei Untersuchungen der Genomdaten von *C. acetobutylicum* konnte ein mögliches Cytochrom P_{450}-Gen identifiziert werden (NÖLLING et al., 2001). Dies ist insofern bemerkenswert, da bislang aufgrund des Sauerstoffbedarfs der Enzyme davon ausgegangen werden konnte, dass diese Enzyme nur in aeroben Organismen vorkommen. Das Genprodukt von *cac*3330 (NCBI-GI-NR.: 15896573) besitzt eine 59 %ige Identität zu einem untersuchten Cytochrom P_{450}-Enzym aus *Bacillus subtilis*. Das Gen BSU BG12729 (NCBI-GI-NR.: 2632496) codiert für das Cytochrom P_{450} 152A1 *cypC*. Das Gen ist im Genom von *B. subtilis* nicht mit anderen Genen assoziiert und auch *cac*3330 hat keine unmittelbar benachbarten Gene. Funktionalitätsstudien mit CYPC konnten zeigen, dass dieses Enzym am Fettstoffwechsel beteiligt ist. Es aktiviert durch Oxidation langkettige Fettsäuren (Myristin-Säure) an den Alpha- und Beta-Positionen. Interessant ist hierbei, dass dieses Enzym dafür keinen molekularen Sauerstoff sondern H_2O_2 verwendet. Es handelt sich also um eine Peroxygenase und nicht um eine herkömmliche Monooxygenase. Der Vorteil liegt hierbei darin, dass zum einen die hochreaktive Substanz Wasserstoffperoxid abgebaut werden kann und zum anderen kein Elektronenüberträger in Form einer NAD(P)H-P_{450}-Reduktase für die Reaktion notwendig ist (LEE et al., 2003). Die Gene *cypC* und *cac*3330 besitzen an der hoch konservierten Häm-Bindestelle das Cystein363 und in allen anderen bekannten reaktiven Zentren eine nahezu 100 %ige Homologie. Für ein funktionales Enzym ist eine zentrale Häm-Gruppe notwendig. Bei Untersuchungen des Genoms von *C. acetobutylicum* konnten für die meisten Gene der Häm-Synthese Homologe gefunden werden. Im bislang identifizierten Stoffwechselweg der Porphyrin- und Chlorophyll-Synthese (http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/show_pathway?cac00860+cac0098) von *C. acetobutylicum* fehlen HemY/HemG, welches die Umwandlung von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX katalysiert und HemH. HemH codiert für eine Ferrochelatase, welche die Reaktion von Protoporphyrin IX zu Protohäm katalysiert. Der Schritt von Protoporphyrinogen IX zu Protoporyphyrin IX ist eine Oxidase-Reaktion, bei der zwei O_2 auf Protoporphyrinogen IX übertragen werden und dabei zwei H_2O abgespalten werden. Diese Reaktion ist für einen anaeroben Organismus in dieser Form nicht möglich und daher verwundert das Fehlen der Enzyme nicht. Die Enzyme, die in anderen Organismen an einer Bereitstellung des zentralen Fe^{2+}-Ions für die Häm-Gruppe

beteiligt sind, konnten bislang auch nicht identifiziert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist unklar, ob *C. acetobutylicum* über eine funktionierende Häm-Synthese verfügt und ob das Genprodukt von *cac*3330 eine Funktion besitzt oder nicht. Bei Untersuchungen der Gesamt-RNA von *C. acetobutylicum* zu verschiedenen Wachstumsphasen konnte kein Transkript der DNA von *cac*3330 nachgewiesen werden. Dies könnte aber daran gelegen haben, dass dieses spezielle Gen reguliert ist und erst gebildet wird, wenn intrazellulär Wasserstoffperoxid anfällt oder andere unbekannte Parameter erfüllt sind. Das Vorhandensein von einer großen Anzahl der Enzyme die für eine Häm-Synthese notwendig sind, und einem eigenen Cytochrom P_{450}-Enzym sprechen für die Möglichkeit, dass *C. acetobutylicum* in der Lage sein könnte, andere Cytochrom P_{450}-Enzyme zu exprimieren und mit Elektronen für ihre Reaktionen zu versorgen.

Aufgrund dieser Ergebnisse und da von anderen Forschungsgruppen keine cDNA für eine NAD(P)H-P_{450}-Reduktase zu erhalten war, sollte das Gen *cyp2b1* direkt in *C. acetobutylicum* eingebracht werden. Es sollte untersucht werden, ob *C. acetobutylicum* eine Möglichkeit besitzt, ein funktionales Cytochrom P_{450}-Enzym zu exprimieren und die Reaktionen mit den notwendigen Reduktionsäquivalenten zu versorgen.

4.2.3 Analyse der Untersuchungsergebnisse

Die in Vorarbeiten hergestellten Vektoren pCYP10, pMM40-K, pMM40-V, pMM41-K und pMM41-V wurden untersucht (BARTH, 2001; BÖHRINGER, 2002). Die Bildung eines *cyp2b1*-Transskripts konnte für die Vektoren pMM40-V und pMM41-V bestätigt werden und es gelang durch eine Veränderung des Western-Transfer-Protokolls auch der Nachweis von CYP2B1 in der Membran von *E. coli.* Hierbei konnte gezeigt werden, dass die in den Vektoren pMM40-V und pMM41-V vorgenommene Modifikation der N-terminalen Region von CYP2B1, wie bereits in anderen Arbeiten gezeigt, einen positiven Effekt auf die Bildung des Proteins hat (BARNES et al., 1991). Die Anpassung der Ribosomenbindestelle des *cyp2b1*-Gens an die Shine-Dalgarno-Sequenz in dem Vektor pMM41-V hatte wie erwartet eine weitere Steigerung der Proteinexpression zur Folge (SHINE und DALGARNO, 1974). Weiterführende Western-Transfer-Versuche konnten zeigen, dass eine Expression des Proteins durch eine Zugabe der Häm-Vorstufe δ-Aminolävulinsäure erhöht werden kann (PERNECKY und COON, 1996). Ein Absenken der Wachstumstemperatur der *E. coli*-Kultur auf 28 °C resultierte in einer nur geringfügig reduzierten Proteinausbeute. Dieser

Schritt sollte eine bessere Faltung des Proteins und somit die Wahrscheinlichkeit eines funktionalen Enzyms erhöhen (BARNES, 1996; GUENGERICH et al., 1997).

Nach dem Nachweis von CYP2B1 in der Membran von *E. coli* pMM41-V wurde der *C. acetobutylicum* - *E. coli*-Schaukel-Vektor pCYP102B1 hergestellt und in *C. acetobutylicum* DSM 792 transformiert. Der bereits vorhandene Vektor pCYP102B1MB mit unverändertem *cyp2b1*-Gen wurde ebenfalls transformiert (BÖHRINGER, 2002). In Western-Transfer-Experimenten mit Proteinrohextrakten der rekombinanten *C. acetobutylicum* Stämme, konnte hierbei keine deutliche Aussage gemacht werden, da in allen durchgeführten Experimenten eine Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper gegen CYP2B1 aus *R. norvegicus* mit Proteinen des Wildtypstammes *C. acetobutylicum* DSM 792 auftrat. Diese Kreuzreaktion lag bei den durchgeführten Western-Transfer-Experimenten bei derselben Laufweite wie das erwartete CYP2B1. Es konnte keine Optimierung des Proteinnachweises erreicht werden. Die Funktionalität des rekombinanten CYP2B1-Proteins wurde im Pentoxyresorufin- Enzymtest untersucht (LUBET et al., 1985). Hierbei konnte für alle verschiedenen Proteinfraktionen keine positive Reaktion erbracht werden. Auch eine Zugabe von aufgereinigten Coenzymen zu den Proben ergab keine verwertbaren Resultate. Dahingegen zeigte die Positivkontrolle mit CYP2B1-Mikrosomen aus der Leber von *R. norvegicus* die erwarteten Ergebnisse. Ein Gemisch aus aufgereinigtem CYP2B1, Cytochrom b5 als Elektronenüberträger und NADPH-P_{450}-Reduktase aus *R. norvegicus* für die Bereitstellung der Reduktionsäquivalente konnte ein deutliches Signal im Pentoxyresorufin- Enymtest erzeugen. Aufgrund dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass der Enzymtest funktionierte, aber das gebildete CYP2B1 nicht aktiv war. Hierfür kann es mehrere Gründe geben. Die Transkription und Translation des Proteins scheinen den Ergebnissen zu Folge in *E. coli* stattgefunden zu haben. Daher müssen die Probleme zu einem späteren Zeitpunkt aufgetreten sein. Die Komplexität des gesamten Mechanismus macht eine Aussage über die tatsächliche Problemstelle sehr schwierig. Die Western-Transfer-Ergebnisse zeigen, dass CYP2B1 in die Membran von *E. coli* eingebaut wurde. Der Aufschluss der Zellen wurde mit einem Ribolyser™ und alternativ in einem Ultraschallbad durchgeführt. Bei diesem Aufschlussverfahren wirken mechanische Kräfte auf die Zellen und es könnte zu einer Beschädigung des Proteins gekommen sein. Alternativ könnte eine fehlerhafte Faltung dieses eukaryotischen Proteins in der prokaryotischen Zelle erfolgt sein. Eine solche fehlerhafte Faltung lässt sich nur in einer Strukturanaylse mit aufgereinigtem Protein nachweisen und dies wird durch den Einbau von CYP2B1 in die Membran erschwert. Eventuell lag die erzeugte Menge an Protein auch unter der Schwelle für eine wirksame Konzentration im Enzymtest oder es gelang nicht, die

notwendigen Reduktionsäquivalente für eine Reaktion bereitzustellen. Die Zugabe der aufgereinigten NADPH-P_{450}-Reduktase und Cytochrom b5 im Überschuss ergab aber auch keine positive Reaktion im Enzymtest. Für eine erfolgreiche Funktion kommt in *C. acetobutylicum* erschwerend hinzu, dass bislang nicht alle Enzyme für eine erfolgreiche Häm-Synthese gefunden werden konnten. Somit bleibt unklar, ob der Organismus in der Lage sein wird, ein funktionales Cytochrom P_{450} zu erzeugen.

4.2.4 Mögliche Ansatzpunkte für eine Verbesserung des angestrebten Cytochrom P_{450}-Systems

Eine Veränderung der verwendeten 5'-regulatorischen Einheit des *cyp2b1*-Gens könnte eine Erhöhung der Proteinausbeute bewirken. Die Ribosomenbindestelle wurde bereits angepasst, aber die Verwendung eines anderen Promoters könnte eine deutliche Steigerung der Proteinausbeute bewirken. Eine Coexpression von NADPH-Cytochrom-P_{450}-Reduktase (EC 1.6.2.4) mit dem eingebrachten Cytochrom P_{450}-Gen könnte zu einer Bereitstellung der nötigen Reduktionsäquivalente führen und damit zu einem wirksamen Enzymkomplex (PRITCHARD et al., 1998). Ein anderer Ansatz wäre die Herstellung eines aktiven Fusionsproteins mit einer NADPH-Cytochrom-P_{450}-Reduktase und dem reaktiven Bereich des Cytochrom P_{450}-Enzyms (FISHER et al., 1992). Durch eine Veränderung des N-terminalen Bereichs von CYP2B1 könnte es gelingen, das Protein in einer funktionalen Form in *E. coli* zu exprimieren (JOHN et al., 2002) oder eine funktionales lösliches Protein zu erzeugen, das dieselbe Substratspezifität besitzt.

Durch gezielte Veränderungen des Proteins ist es möglich, die Umsatzraten für Cyclophosphamid und Ifosfamid zu erhöhen und die Bildung der unerwünschten Nebenprodukte über den N-Dechlorethylierungsweg zu vermeiden (CHEN et al., 2004). In dieser Studie wurde auch CYP2B11 aus dem Hund untersucht, dieses Enzym weist sehr hohe Aktivierungsraten für Cyclophosphamid über den 4-Hydroxylierungsweg auf und scheint keine Inaktivierungsreaktion für das Therapeutikum zu besitzen.

Gesteuerte Proteinevolution über „Gene-Shuffling“ mit CYP2B-Proteinen aus verschiedenen Organismen könnte ein Enzym erzeugen, welches sehr hohe Umsatzraten für „Prodrugs“ besitzt und auch in einem clostridiellen System aktiviert werden kann. Untersuchungen in

dieser Richtung werden zurzeit an der Universität Boston von der Arbeitsgruppe von Prof. D. J. Waxman durchgeführt (http://www.bu.edu/biology/ Faculty_Staff/djw.html).
Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt ist die Analyse des potentiellen *C. acetobutylicum* Cytochrom P_{450}-Proteins. Die Aufklärung der Funktionsweise und Substratspezifität von CAC3330 könnte eine Veränderung ermöglichen, welche es erlaubt, die Substraterkennungstelle so zu verändern, dass Cyclophosphamid und Ifosfamid aktiviert werden können. Das zu *cac*3330 homologe Gen aus *B. subtilis*, *cyp*C, verwendet H_2O_2 als Sauerstoffquelle und benötigt daher keinen molekularen Sauerstoff und keine NADPH P_{450}-Reduktase. Sauerstoff wirkt zudem für *C. acetobutylicum* schon in geringen Mengen toxisch und wird für die Verwendung sauerstoffabhängiger Cytochrome immer ein Problem darstellen.

4.3 Entwicklung einer Tumortherapie unter Verwendung des *Clostridium perfringens*-Enterotoxins (CPE)

In dieser Arbeit sollte ein neuer Ansatz für eine durch Clostridien vermittelte Tumortherapie untersucht werden. CPE soll als neues Therapeutikum in zu behandelndes Tumorgewebe gebracht werden. Als Träger sollen Sporen mit verändertem genetischen Material des für Menschen unbedenklichen *C. acetobutylicum* verwendet werden (LAMBIN et al., 1997). Die Sporen sollen im hypoxischen Bereich des Tumors auskeimen, und die vegetativen Zellen sollen in diesem Umfeld das Toxin produzieren und sezernieren.

4.3.1 Verwendung von CPE als Mittel in der Tumortherapie

Das Enterotoxin von *C. perfringens* ist eines von 14 Toxinen dieses Organismus und Auslöser für Lebensmittelvergiftungen und damit verbundene Diarrhoe (ROOD, 1998). Das CPE bindet hierbei an die apikale Membran der Enterocyten in der Bürstensaumoberfläche des Dünndarms. Die Bindung erfolgt vermutlich an Rezeptoren aus der Gruppe der Claudine (SONODA et al., 1999; FUJITA et al., 2000). Das Toxin bildet mit diesem Rezeptor einen initialen, auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel bei 90 kDA laufenden Komplex (KOKAI-KUN und MCCLANE, 1997). Durch Wechselwirkungen mit weiteren bislang unbekannten Proteinen aus der eukaryotischen Membran vergrößert sich der Komplex auf 155 kDa

(KOKAI-KUN et al., 1999). Dieser Protein-Toxin-Komplex besitzt die für die toxische Wirkung verantwortliche Porenfunktion und kann kleinere Moleküle durchlassen. Extrazelluläre Ca^{2+}-Ionen können in die eukaryotische Zelle einströmen. Je nach extrazellulärer Toxinkonzentration variiert die Porenzahl. Eine hohe Anzahl an Poren führt zu einem starken Einstrom von Ca^{2+}-Ionen und dadurch vermutlich zu einer Onkose. Geringe Mengen an Ca^{2+}-Ionen führen dahingegen zu einer Apoptose der Zelle. Bei der Onkose werden durch den massiven Einstrom von Ca^{2+}-Ionen die Proteine Calpain und Calmodulin aktiviert, aber es ist bislang unklar, was weiter passiert. Bei der Apoptose werden Calpain und Calmodulin ebenfalls aktiviert. Calpain führt in einer Enzymkaskade zur Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom c. Freies Cytochrom c aktiviert vermutlich über Caspase 3/7 die Caspasekaskade und leitet damit die Apoptose der Zelle ein. Die durch das Absterben der geschädigten Zelle entstandene Lücke im Darmepithel ermöglicht es nun weiteren Toxinmolekülen, an der Basolateralmembran der benachbarten Zellen anzuheften. Die CPE-Rezeptor-Komplexe bilden jetzt weitere 155 kDa-Komplexe aus und können im Zusammenspiel mit Occludinen der „tight-junctions“ zwischen den eukaryotischen Zellen einen 200 kDa-Komplex ausbilden. Durch diese Verbindung werden Proteine der „tight-junctions“ ins Innere der Zelle gebracht, und die Funktion dieser Schnittstelle zwischen den Zellen wird beschädigt. Es kommt zu einer parazellulären Permeabilität und daraus resultiert die durch CPE induzierte Diarrhoe (SINGH et al., 2000; CHAKRABARTI et al., 2005).

CPE ist ein Cytosolprotein mit 319 Aminosäuren (CZECZULIN et al., 1993). Seine molekulare Masse beträgt 35 kDa (HAUSCHILD und HILSHEIMER, 1971). Klinische Isolate von *C. perfringens* Typ A tragen das Toxin-Gen auf einem transponierbaren Element von 6,3 kBp (BRYNESTAD et al., 1997). Vergleiche des Genoms von *C. perfringens* (SHIMIZU et al., 2001) mit klinischen Isolaten konnten zeigen, dass das *cpe*-Gen bei allen bislang untersuchten Isolaten stets zwischen *uap*C und *nad*C inseriert ist (MIYAMOTO et al., 2002). Die ersten 45 Aminosäuren von CPE besitzen keine bislang ermittelte Funktion und ein Abschneiden dieser N-terminalen Region konnte sogar die toxische Wirkung des Proteins um den Faktor 3 erhöhen (GRANUM und RICHARDSON, 1991). Die Aminosäuren 45 – 54 sind essentiell für die Ausbildung der 155 kDa-Komplexe und damit für die toxische Wirkung von CPE notwendig (SMEDLEY III und MCCLANE, 2004). Die 30 Aminosäuren des C-Terminus von 289 bis 319 erlauben es dem Toxin, an der eukaryotischen Membran zu binden (HANNA et al., 1991; HANNA et al., 1992). Die Bindung erfolgt hier vermutlich an Claudin-3 und -4-Rezeptoren (FUJITA et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2005). Das Toxin wird am

Beginn der Sporulation von *C. perfringens* gebildet und bei der Lyse der Mutterzelle freigesetzt (DUNCAN et al., 1972; DUNCAN, 1973).

Tumorzellen vieler untersuchter Zellinien überexprimieren Claudin-4-Rezeptoren bis zu 1000fach. Die Ursache dafür ist noch nicht bekannt. CPE kann an diesen Rezeptoren binden und dadurch einen Zelltod der Tumorzelle bewirken. Ab einer Konzentration von 500 ng Toxin/ml Kulturmedium konnte in Zellkulturversuchen ein Effekt des Toxins auf die verwendeten Tumorzellinien beobachtet werden (MICHL et al., 2001; KOMINSKY et al., 2004).
Ziel dieser Arbeit war es daher, das Toxin-Gen aus *C. perfringens* zu isolieren, es in *C. acetobutylicum* zu exprimieren, es von der Sporulation zu entkoppeln und das Protein nach der Transkription unter Verwendung eines Signalpeptids aus der Zelle auszuschleusen. Der Einfluss des rekombinanten *C. acetobutylicum*-Stamms auf Tumorgewebe und sein Besiedelungsverhalten sollten anschließend im Mausmodell untersucht werden (MICHL und GRESS, 2004).

4.3.2 Durchgeführte Experimente und Analyse

Das *cpe*-Gen wurde aus dem Typstamm *C. perfringens* A DSM 11784 isoliert und in einen pUC18-Vektor subkloniert. Der natürliche Promoter des Gens wurde bei den nachfolgenden Schritten durch Promotoren aus *C. acetobutylicum* ersetzt. Die verwendeten Promotoren des *bdhA*-Gens und des *ptb*-Gens sind während des gesamten Wachstums von *C. acetobutylicum* aktiv (FEUSTEL, 2004) und sollten somit eine ständige Produktion des Toxins gewährleisten. In anfänglichen Experimenten gelang es nicht, stabile Plasmide mit dem *ptb*-Promoter und dem *cpe*-Gen zu erzeugen. Der *ptb*-Promoter besitzt auch in dem für die anfänglichen Klonierungsarbeiten verwendeten Organismus *E. coli* eine deutliche Aktivität und das gebildete Toxin hat eventuell einen toxischen Effekt auf *E. coli* gehabt. Für die weiteren Arbeiten wurde ein *E. coli – C. acetobutylicum*-Schaukel-Vektor auf der Basis von pJIR750 hergestellt. Der *bdhA*-Promoterbereich mit Ribosomenbindestelle wurde in einem ersten Schritt in den Vektor pJIR750-bdhA eingebracht. Um eine Sekretion des fertigen Proteins durch das Sec-System von *C. acetobutylicum* zu erreichen, wurden 4 verschiedene potentielle Signalpeptide ausgewählt. Die Genprodukte von *cac*0746, *cap*0168 und *cap*0056 werden durch das Sec-System ausgeschleust und durch die Signalpeptidase I geschnitten (DESVAUX

et al., 2005). Für Orf5 wurde gezeigt, dass es extrazellulär auftritt und dort in der cytoplasmatischen Membran verankert ist (THORMANN et al., 2002). Die Gensequenzen dieser Peptide wurden jeweils in den Vektor pJIR750-bdhA kloniert. Anschließend wurde versucht, das *cpe*-Gen direkt in die dabei entstandenen Vektoren p7BIG1 bis p7BIG4 zu klonieren, aber es konnten keine erfolgreichen Ligationen nachgewiesen werden. Um eine bessere Selektionsmöglichkeit für eine erfolgreiche Klonierung zu erhalten, wurde das *cpe*-Gen mit dem Resistenzgen *erm*C für Erythromycin gekoppelt. In weiteren Klonierungsarbeiten gelang es dann, die „*cpe-erm*C-Kassette“ hinter die Gensequenzen der Signalpeptide in den Vektoren p7BIG1 – p7BIG3 zu ligieren. Die Ligation der Gen-Kassette in den Vektor p7BIG4 gelang nicht. Die Ursache hierfür blieb unklar. Da eine Ligation des *spo0A*-Gens aus *C. acetobutylicum* in diesen Vektor erfolgreich verlief, liegt die Ursache vermutlich in der Toxizität des gebildeten Fusionsproteins aus CPE und dem Signalpeptid von *cac*0746. Die Vektoren p7BIG1TOX, p7BIG2TOX und p7BIG3TOX wurden in vivo methyliert und anschließend in den Stamm *C. acetobutylicum* transformiert.

Bei Western-Transfer-Experimenten konnte gezeigt werden, dass p7BIG1-TOX zwar CPE bildet, es aber in die Membran einbaut und nicht ausschleust. Das fusionierte Signalpeptid von Orf5 aus dem *sol*-Operon von *C. acetobutylicum* ist also vermutlich ein stabiler Membrananker. Es konnte nicht gezeigt werden, ob die Verankerung wie bei nativem Orf5 extrazellulär oder innerhalb der Zelle stattgefunden hat. Bei einer Untersuchung des Proteoms von *C. acetobutylicum* auf Signalpeptidsequenzen wurde Orf5 nicht als ausgeschleustes Protein aufgeführt (DESVAUX et al., 2005). Der Stamm *C. acetobutylicum* p7BIG3TOX konnte dahingegen kein nachweisbares Fusionsprotein erzeugen. Der Stamm mit dem Plasmid p7BIG2TOX erzeugt CPE und sezerniert es in das Kulturmedium. Das verwendete Signalpeptid von AmyP erfüllt also die erwartete Funktion. Weiterführende Experimente konnten zeigen, dass bei einer optischen Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 600 nm bis zu 500 ng/ml CPE erzeugt werden. Die Produktion des Toxins erfolgt wie durch die Verwendung des *bdh*A-Promoters erwartet während der gesamten Wachstumsphase. Die RT-PCR-Experimente zeigen eine stetige Expression des Gens und das Toxin lässt sich während des gesamten Wachstums im Kulturüberstand nachweisen. Im Vergleich mit dem Wachstum des Wildtypstamms *C. acetobutylicum* DSM 792 konnte kein Unterschied im Wachstumsverhalten des plasmidtragenden Stammes nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass das rekombinante CPE ein leicht verändertes Laufverhalten im Polyacrylamidgel zeigt. Dies lässt vermuten, dass eventuell das Signalpeptid nicht abgeschnitten wurde.

Die durchgeführten Cytotoxizitätstests mit Pankreaskarzinomzellen der Zellinie CAPAN1 konnten zeigen, dass das gebildete Toxin annähernd die gleiche Toxizität wie rekombinant in *E. coli* hergestelltes CPE besitzt. Die ermittelte Menge an Toxin in einem Milliliter Kulturüberstand von *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 entspricht auch bei dieser Messung ca. 500 ng/ml. Somit ist es gelungen, wirksames CPE in *C. acetobutylicum* unabhängig von der Sporulation zu exprimieren, über das Sec-System auszuschleusen und im Kulturüberstand nachzuweisen.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit des gesamten CPE-Therapie-Systems wurden Sporen von *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 in steril gezüchtete „NMRI nu/nu“ Mäusen mit CAPAN1-Tumoren injiziert. Es konnte keine dichte Besiedelung des Tumorgewebes und auch keine Wirkung auf das Tumorwachstum nachgewiesen werden. In der Leber und der Milz der Tiere konnten aber lebensfähige Sporen gefunden und auch zum Auskeimen gebracht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Besiedelung des Tumors durch *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 nicht die notwendige Dichte erreicht hat. Somit konnte vor Ort nicht genügend Toxin gebildet werden und dadurch war kein Einfluss der rekombinanten Clostridien auf das Tumorwachstum nachweisbar. Die Kontrollgruppe von unbehandelten Mäusen zeigte dieselben Tumorwachstumsraten wie die behandelte Gruppe.

4.3.3 Ansatzpunkte für eine Optimierung der CPE-Expression

CPE konnte erfolgreich im Cytotoxizitätstest nachgewiesen werden. Im Tierversuch war es allerdings nicht wirksam. Eine Ursache könnte hierbei an einer mangelnden Besiedelung des Tumorgewebes gelegen haben. *C. sporogenes* M-55 weist in Vergleichsstudien mit anderen Clostridien ein sehr viel besseres Besiedelungsverhalten von Tumoren auf als der verwendete Stamm *C. acetobutylicum*. In diesen Stamm konnten bislang aber keine Plasmide transformiert werden. Der Stamm *C. sporogenes* NCIMB 10696 weist aber ein ähnliches Besiedelungsverhalten auf, und es ist möglich, Plasmide über Konjugation in diesen Stamm einzubringen (PURDY et al., 2002; MINTON, 2003). Ein anderer Stamm mit großem Potential für eine Tumorbesiedlung und eine damit verbundenen Behandlung ist *C. novyi* NT (DANG et al., 2001). Dieser Stamm zeigt eine sehr gute Besiedelungseffizienz und seine proteolytischen Eigenschaften reichten im Tierversuch aus, um ein Tumorwachstum zu hemmen und in Einzelfällen Tumore in ihrer Größe zu reduzieren. Als Nebeneffekt trat bei der Behandlung durch diesen Stamm auch eine unerwartete Reaktion des Immunsystems auf,

in deren Verlauf die verbleibende Wachstumszone des Tumors angegriffen und beseitigt wurde (AGRAWAL et al., 2004). Bislang ist es aber noch nicht gelungen, diesen Stamm mit molekularbiologischen Methoden gezielt zu verändern. Ziel muss es sein, einen Clostridien-Stamm mit diesen Besiedelungseigenschaften zu erzeugen, der CPE gezielt in das Tumorgewebe abgeben kann.

Ein weiterer Ansatz für eine Optimierung des vorliegenden Systems liegt in einer Modifikation des Toxins. Der N-terminale Bereich von CPE besitzt keine erkennbare Funktion und ein Abtrennen der ersten 44 Aminosäuren hat eine Steigerung der Toxizität des resultierenden Proteins um den Faktor 2 bis 3 zur Folge (GRANUM und RICHARDSON, 1991). Die Wirkung der bislang durch den Stamm *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 exprimierten 500 ng/ml Kulturüberstand liegt am unteren Grenzbereich der wirksamen Dosis von CPE. Eine Erhöhung der Wirksamkeit des Toxins durch eine Kürzung des Proteins könnte eine deutliche Steigerung der Effizienz bedeuten. Eine gekürztes *cpe*-Gen wurde bereits in pUC19 ligiert und in das dabei entstandene Plasmid pUCPET2 wurde in einem weiteren Schritt eine Erythromycin-Kassette ligiert. Weitere Schritte mit dem Plamsid pUCCPETERM2 wurden noch nicht durchgeführt.

Eine Problematik dieser Arbeit war das Fehlen eines Promoters, der in Clostridien eine hohe Aktivität besitzt, aber in *E. coli* nicht aktiv ist. Sobald das *cpe*-Gen unter der Kontrolle des *ptb*- oder *bdh*A-Promoters stand, gestalteten sich die Klonierungsgarbeiten als schwierig. Der aufgrund seiner höheren Aktivität während des Wachstums von *C. acetobutylicum*, bevorzugte *ptb*-Promoter konnte daher nicht verwendet werden. Gelänge es, einen Promoter zu finden, welcher in Clostridien ein hohes Expressionsniveau besitzt und während der Klonierungsarbeiten in *E. coli* inaktiv ist, könnte eine weitere Steigerung der Toxinausbeute möglich sein. Der *E. coli – Lactococcus lactis*-Schaukel-Vektor pOri23 trägt den *Lactococcus* Promoter p23. Dieser Promoter ist in *E. coli* inaktiv besitzt aber in *L. lactis* und *Staphylococcus aureus* eine sehr hohe Aktivität (QUE et al., 2000). Wenn dieser starke Promoter auch in Clostridien konstitutiv aktiv ist, wäre dies eine gute Möglichkeit viele Probleme mit für *E. coli* toxischen, clostridiellen Genprodukten bei der Klonierung zu umgehen.

Untersuchungen des Sekretoms von *C. acetobutylicum* und der Expressionsraten der dazugehörigen Gene könnte Hinweise auf ein wirksameres Signalpeptid geben. Eine Modifikation der Signalpeptidase I-Schnittstelle könnte ebenfalls eine Steigerung der Proteinausbeute bewirken. Das für die Fusion mit CPE verwendete Signalpeptid der alpha-Amylase AmyP (*cap*0168) von *C. acetobutylicum* könnte im Bereich der Signalpeptidase I-

Erkennungssequenz „RSO/AK“ modifiziert werden. Dadurch könnte eine Erhöhung der Prozessierungsrate der Signalpeptidase I für dieses Fusionsprotein und damit eine höhere Ausbeute erreicht werden (BARBE et al., 2004). Die durch Vergleiche aller Proteine des Sekretoms erhaltene Konsensussequenz für die Signalpeptidase I-Schnittstelle von *C. acetobutylicum* ist (V/A/I)-(K/F/Y)-A/A (DESVAUX et al., 2005). Die errechnete Schnittstelle von *cap*0168 ist zwar funktional, könnte aber durch eine Modifikation und eine Anpassung an die Konsensussequenz verbessert werden.

4.3.4 Der Einfluss des zentralen Sporulationsregulators Spo0A auf die Enterotoxinbildung von *Clostridium perfringens*

Das Enterotoxin von *C. perfringens* wird während der Sporulation gebildet (DUNCAN, 1972). Untersuchungen der drei Promotoren im 5'-regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens konnten zeigen, dass die DNA-Sequenzen direkt vor den ermittelten Transkriptions-startpunkten hohe Ähnlichkeit zu Erkennungssequenzen von RNA-Polymerase-Komplexen mit den sporulationsabhängigen Sigma-Faktoren SigE und SigK haben (ZHAO und MELVILLE, 1998). Die genaue Funktion dieser beiden, bei der Sporulation für die Mutterzelle spezifischen, Sigma-Faktoren bei der CPE-Expression wird zurzeit von der Arbeitsgruppe Melville untersucht (http://www.biol.vt.edu/faculty/melville/research.html). Spo0A ist der zentrale Regulator der Sporulation und essentiell für Initiation der Sporulationphase (PHILLIPS und STRAUCH, 2002). Eine Deletion dieses zentralen Sporulationsregulators Spo0A in *C. perfringens* resultierte wie erwartet darin, dass die Mutante keine Endosporen mehr bilden konnte. Diese Deletionsmutante konnte aber auch kein CPE mehr bilden. Spo0A ist demnach auch an der Regulation von CPE beteiligt (HUANG et al., 2004). In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen des 5'-regulatorischen Bereichs des *cpe*-Gens konnten mehrere DNA-Bereiche zeigen, die hohe Ähnlichkeit zu Spo0A-Bindestellen in *B. subtilis* aufweisen (BURBULYS et al., 1991; BALDUS et al., 1994). Die Deletion des Gens für den transkriptionellen Regulator der Katabolit-Repression in *C. perfringens* CcpA (Catabolite control protein A) führte ebenfalls zu einer stark reduzierten CPE-Expression in der Sporulationsphase. Dahingegen wurde die Expression von CPE in der Wachstumsphase erhöht. Der Regulator CcpA hat demnach auch einen Einfluss auf die Aktivierung der Expression von CPE. Die Experimente deuten darauf hin, dass CcpA in der Wachstumsphase ein *cpe*-Repressor ist und im Verlauf der Sporulation eine stark

induzierende Wirkung auf das *cpe*-Gen besitzt (VARGA et al., 2004). Eine auf der Konsensussequenz des *cre*- (catabolite responsive element) Motivs aus *B. subtilis* basierende Erkennungssequenz für aktiviertes CcpA (FUJITA et al., 1995), konnte im 5'-regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens in dieser Arbeit nicht entdeckt werden. Daher kann man vermuten, dass CcpA nicht direkt an einer Regulation beteiligt ist, sondern ein anderes beteiligtes Gen reguliert. Es kann aber auch sein, dass für die Aktivierung des Gens keine Bindung an eine *cre*-ähnliche Erkennungsequenz notwendig ist. Die Erfahrungen mit CcpA zeigen, dass ein *cre*-Motiv nicht zwingend vorhanden sein muss (FAIRES et al., 1999).

In den durchgeführten Gelretardationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass rekombinant in *E coli* exprimiertes Spo0A aus *C. acetobutylicum* in seiner phosphorylierten Form (Spo0A-P) an den 5'- regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens binden kann. Die Experimente zeigen deutlich eine Verschiebung der DNA-Sonde in Verbindung mit 0,4 µg Spo0A-P. Das Protein hatte weiterhin keinen deutlichen Einfluss auf die anderen verwendeten DNA-Sonden. In dem untersuchten Genbereich liegen 4 potentielle Spo0A-Bindestellen mit hoher Identität zur ermittelten Konsensussequenz von *B. subtilis*. Es konnte bei den weiteren durchgeführten Gelretardationsexperimenten nicht nachgewiesen werden, welche dieser Bindestellen von Spo0A-P erkannt wird. Da sich der Bereich der Bindung von Spo0A-P nicht eingrenzen ließ, wurde auf eine „Footprint"-Analyse verzichtet. Spo0A aus *C. perfringens* hat eine 76 %ige Identität zu dem verwendeten Spo0A aus *C. acetobutylicum*, es ist aber nicht auszuschließen, dass das Spo0A-Protein aus *C. perfringens* andere Bindungseigenschaften aufweist. Somit ergeben die durchgeführten Experimente nur ein weiteres Indiz für einen Einfluss von Spo0A-P auf die Regulation des *cpe*-Gens in *C. perfringens*. Eine direkte Bindung von Spo0A-P aus *C. perfringens* an den 5'-regulatorischen Bereich des *cpe*-Gens und eine damit verbundene Regulation muss noch nachgewiesen werden. Außerdem ist unklar, wie der Einfluss von CcpA auf die Expression des *cpe*-Gens abläuft.

4.4 Untersuchung eines möglichen ADP-Ribosyltransferase-Systems in *C. acetobutylicum*

Bei einer Analyse der veröffentlichten Genomdaten (NÖLLING et al., 2001) von *C. acetobutylicum* wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories ein potentielles Toxin-Gen entdeckt. Das Genprodukt von *cac*0338 kodiert vermutlich für eine Mono-ADP-Ribosyltransferase. Das Protein hat eine Länge von 388 Aminosäuren und besitzt im Bereich

der Aminosäuren 210 bis 323 eine clostridielle Binär-Toxin A-Domäne. Das Genprodukt des stromabwärts lokalisierten *cac*0339 ist 341 Aminosäuren lang und besitzt eine ADP-Ribosylglykohydrolase-Domäne im Bereich der Aminosäuren 26 bis 324.
In dieser Arbeit sollte neben der Funktion dieser Enzyme auch die Möglichkeit einer Operon-Struktur der beiden räumlich assoziierten Gene geklärt werden.

4.4.1 Mono-ADP-Ribosyltransferase und ADP-Ribosylglykohydrolase

Die Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen. Hierbei wird ein ADP-Ribose-Rest (ADPR) von einem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) über eine N-glycosidische Bindung auf bestimmte Aminosäuren eines Proteins übertragen (CORDA und GIROLAMO, 2003). Diese Modifikation kann an Arginin, Cystein, Diphtamid oder Asparagin stattfinden (OKAZAKI und MOSS, 1999). In eukaryotischen Systemen wird diese Modifikation ausschließlich für die Regulation von Enzymen verwendet. Es treten hierbei Poly- und Mono-ADP-Ribosylierungen auf. Die Poly-ADP-Ribosylierung tritt hierbei nur im Zellkern auf und spielt eventuell eine Rolle bei der Zelldifferenzierung oder der DNA-Reparatur (WILLIAMS und JOHNSTONE, 1983). Viele prokaryotische Toxine, wie das sezernierte Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae*, sind Mono-ADP-Ribosyltransferasen, manche dieser Enzyme haben aber auch eine innerzelluläre regulatorische Funktion. In *Rhodospirillum rubrum*, einem phototrophen Organismus aus der Gruppe der anaeroben Stickstoffixierer, wird das Eisenprotein des Nitrogenase-Komplexes über ein ADP-Ribosylierungssystem reguliert. Abhängig vom Stoffwechselzustand des Bakteriums wird das Enzym über die Anheftung einer ADP-Ribose inaktiviert oder über Abtrennen der Gruppe durch eine ADP-Ribosylglykohydrolase reaktiviert (LOWERY et al., 1986).
Das enterotoxische, binäre Toxin C2 von *Clostridium botulinum* ADP-ribosyliert Aktin (AKTORIES et al., 1986). Durch diese Modifikation wird das Aktin-Skelett der betroffenen Zellen zerstört, die Zellen sterben ab und es kommt zu Blutungen. Das Toxin besteht aus zwei Proteinen, deren Gene beide auf dem Chromosom von *C. botulinum* lokalisiert sind. Die Komponente C2II vermittelt die Bindung an die eukaryotische Membran und erlaubt es C2I, in die Zelle translociert zu werden. In der Zelle ADP-ribosyliert C2I G-Aktin am Arginin der Position 177. Das ADP-ribosylierte G-Aktin bindet dann an einen im Aufbau befindlichen

Aktin-Strang und verhindert dadurch eine weitere Elongation. Somit kommt es zu einem Kettenabbruch und einer Destabilisierung des Cytoskeletts (BARTH, 2004).
Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob beide in *C. acetobutylicum* entdeckten Gene eine Operon-Struktur haben und gemeinsam exprimiert werden. Mit RT-PCR-Versuchen mit RNA-Proben aus verschiedenen Wachstumsphasen von *C. acetobutylicum* sollte untersucht werden, wann die Gene aktiv sind. Außerdem sollten durch eine Überexpression und eine Suppression Hinweise auf eine Funktion der beiden Proteine gefunden und untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob diese Mutationen einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *C. acetobutylicum* haben.

4.4.2 Untersuchung der Gene *cac*0338 und *cac*0339 aus *C. acetobutylicum*

SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)-Untersuchungen der Proteinsequenz von *cac*0338 ergaben eine 97 %ige Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines Signalpeptids mit einer potentiellen Signalpeptidase-Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 21 und 22. Das Protein CAC0339 besitzt kein Signalpeptid. Das Vorhandensein einer clostridiellen Binär-Toxin A-Domäne und eines Signalpeptids deutet auf eine extrazelluläre Funktion des Proteins CAC0338 hin. Die Anordnung der Gene im Genom von *C acetobutylicum* entspricht der Anordnung zweier sehr ähnlicher Gene in *Listeria monocytogenes lmo*0066 und *lmo*0067. Beiden Genprodukten dieser Gene wird bislang keine Funktion zugewiesen, es wird aber vermutet, dass sie bei der Regulation der Stickstoffixierung eine ähnliche Rolle spielen wie die entsprechenden Genprodukte in *R. rubrum*.
Während des gesamten Wachstums des Wildtypstamms *C. acetobutylicum* DMS792 konnten keine mRNA-Transkripte der Gene nachgewiesen werden. Auch konnte nicht bewiesen werden, dass die beiden Gene polycistronisch abgelesen werden. Durchgeführte Kontrollen mit Oligonukleotidstartern für die Amplifikation von cDNA des *gyrA*-Gens zeigten, dass in den verschiedenen RNA-Isolaten genügend mRNA vorhanden war und die cDNA-Synthese erfolgreich verlaufen ist. Eine Negativkontrolle mit hitzeninaktivierter reverser Transskriptase hat gezeigt, dass keine DNA-Verunreinigungen in der RNA-Präparation gewesen sind. Da auch mit verschiedenen Oligonukleotidstartern keine Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde auf eine geplante „Northern“-Transfer-Analyse verzichtet. Aufgrund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass entweder die Gene nicht transskribiert werden, oder in den Proben nicht genügend mRNA der Gene vorhanden war. Da die Gene eine potentielle regulatorische

Funktion haben, kann es durchaus sein, dass Transkripte nur in geringen Mengen vorliegen oder erst bei bestimmten Umgebungseinflüssen auf die Zelle gebildet werden. Die Klonierung der Gene in *E. coli* gestaltete sich ebenfalls als sehr schwierig. Es ist ohne Probleme gelungen, den *cac*0338 und *cac*0339 umfassenden Genbereich in einen pUC18-Vektor zu ligieren. Die Probleme traten aber auf, sobald die Gene einzeln hinter den Promoter des *ptb*-Gens aus *C. acetobutylicum* in den Vektor pJIR750-ptb ligiert werden sollten. Das Gen *cac*0338 ließ sich auch nach mehrmaligen verschiedenen Versuchen nicht in diesen Vektor ligieren. In Verbindung mit dem *ptb*-Promoter wäre eine transkriptionell funktionale Einheit entstanden und da der Promoter in *E. coli* auch aktiv ist, kann es sein, dass das Genprodukt aufgrund seiner ADP-ribosylierenden Funktion toxisch wirkt. Unerklärlich ist, warum es nicht gelungen ist, *cac*0338 in umgekehrter Orientierung in den Vektor zu ligieren. Durch ein umgedrehtes *cac*0338-Gen sollte der Vektor gegenläufige mRNA erzeugen, die in *C. acetobutylicum* eine Hemmung der CAC0338-Synthese bewirken sollte. Da kein funktionales Protein gebildet werden konnte, sollte eigentlich auch keine toxische Wirkung bei *E coli* auftreten. Die Herstellung von Vektoren für eine Überexpression und eine Hemmung von *cac*0339 in *C. acetobutylicum* gelang dahingegen. Es gelang aber nicht, diese Vektoren in *E. coli* in vivo zu methylieren, daher konnten weiterführende Versuche mit beiden Vektoren in *C. acetobutylicum* nicht durchgeführt werden. Da die Überexpression und Hemmung von *cac*0338 auch von größerem Interesse war, wurden weitere Versuche abgebrochen, bis es gelingt, das Gen *cac*0338 in einen in *C. acetobutylicum* aktiven Überexpressionsvektor zu ligieren. Auch die Ligation der promoterlosen Gene *cac*0338 und *cac*0339 in die Protein-Überexpressionvektoren pET28a und pET29a gelang nur für das Gen *cac*0339. Durch einen angehängten Histidin-Rest sollten im weiteren Verlauf die Proteine aufgereinigt und charakterisiert werden. Da aber auch hier das für die Arbeit interessantere Gen nicht ligiert werden konnte, wurde auf eine Weiterführung der Arbeit zu diesem Zeitpunkt verzichtet. Alle erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass das Genprodukt von *cac*0338 für *E. coli*-Stämme problematisch ist.

Um das Gen erfolgreich zu exprimieren, könnte versucht werden, die Vektoren nach der Ligation in verschiedene *E. coli*-Stämme zu transformieren. Es hat sich gezeigt, dass bestimmte *E. coli*-Stämme sich besser für eine Transformation eignen. Ein weiterer Ansatz wäre die Verwendung von anderen Promotoren, im Idealfall solchen, die in *E coli* nicht aktiv sind und erst in *C. acetobutylicum* aktiv sind oder induziert werden können. Hierbei könnte auch der Promoter p23 aus *L. lactis* hilfreich sein. Um eine bessere Selektionsmöglichkeit für Vektoren mit der gewünschten Ligation zu erhalten, könnte man in einem weiteren

Ligationsschritt ein Resistenzgen an das Gen *cac*0339 koppeln. Durch diesen in den Versuchen zur Expression des *cpe*-Gens durchgeführten Schritt könnte man alle falsch positiven Transformanten aus einem „Screening“-Verfahren ausschließen.

5 Literaturverzeichnis

Agrawal, N., C. Bettegowda, I. Cheong, J. F. Geschwind, C. G. Drake, E. L. Hipkiss, M. Tatsumi, L. H. Dang, L. A. Diaz Jr., M. Pomper, M. Abusedera, R. L. Wahl, K. W. Kinzler, S. Zhou, D. L. Huso und B. Vogelstein. 2004. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **101**: 15172-15177.

Aktories, K., M. Bärmann, I. Ohishi, S. Tsuyama, K. H. Jakobs und E. Habermann. 1986. Botulinum C2 toxin ADPribosylates actin. *Nature* **322**: 390–392.

Altschul, S. F., T. L. Madden, Alejandro A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389–3402.

Baldus, J. M., B. D. Green, P. Youngman und C. P. Moran; Jr. 1994. Phosphorylation of *Bacillus subtilis* transcription factor Spo0A stimulates transcription from the *spoIIG* promoter by enhancing binding to weak 0A boxes. *J. Bacteriol.* **176**: 296-306.

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

Barbe, S., L. van Mellaert und J. Anné. 2004. *Clostridium*-mediated transfer system of therapeutic proteins to solid tumors: increased heterologous protein production. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **69**: 49-52.

Barth, C. 2001. Entwicklung eines biologischen Systems zur Tumortherapie: Klonierung des Gens für Cytochrom P_{450} 2B1 in *Clostridium acetobutylicum* und Untersuchung auf Expression. Diplomarbeit, Universität Ulm.

Barth, H. 2004. Uptake of binary actin ADP-ribosylating toxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**: 165-82.

Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne und S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**: 783-795.

Berlyn, M. K., K. B. Low und K. E. Rand. 1996. Linkage Map of *Escherichia coli* K12. In: **F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter und H. E. Umbarger.** *Escherichia coli* and *Salmonella*, 9th edition. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA: 1715-1816.

Bertram, J., A. Kuhn und P. Dürre. 1990. *Tn916*-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in regulation of solvent formation. *Arch. Microbiol.* **153**: 373-377.

Bettegowda, C., L. H. Dang, R. Abrams, D. L. Huso, L. Dillehay, I. Cheong, N. Agrawal, S. Borzillary, J. M. McCaffery, E. L. Watson, K. S. Lin, F. Bunz, K. Baidoo, M. G. Pomper, K. W. Kinzler, B. Vogelstein und S. Zhou. 2003. Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **100**: 15083-15088.

Birnboim, H. C., und J. Doly. 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

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

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

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive methode for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brynestad, S., B. Synstad und P. E. Granum. 1997. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology*. **143**: 2109-15.

Burbulys, D., K. A. Trach und J. A. Hoch. 1991. Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.

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

Chakrabarti, G., und B. A. McClane. 2005. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell Microbiol.* **7**: 129-46.

Chen, C. S., J. T. Lin, K. A. Goss, Y. He, J. R. Halpert und D. J. Waxman. 2004. Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: Identification of cytochrome P_{450} 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. *Mol. Pharmacol.* **65**: 1278–1285.

Corda, D., und M. Di Girolamo. 2003. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J.* **22**: 1953-1958.

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

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

Dang, L. H., C. Bettegowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler und B. Vogelstein. 2001. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **98**: 15155-60.

Deutscher, M. P. 1990. Maintaining protein stability. *Methods Enzymol.* **182**: 83-89.

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

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

Duncan, C. L., D. H. Strong und M. Sebald. 1972. Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **110**: 378-391.

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

Faires, N., S. Tobisch, S. Bachem, I. Martin-Verstraete, M. Hecker und J. Stülke. 1999. The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 141-148.

Feustel, L. 2004. Molekularbiologische Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *sol*-Operons von *Clostridium acetobutylicum.* Dissertation, Universität Ulm.

Feustel, L., S. Nakotte und P. Dürre. 2004. Characterization and development of two reporter gene systems for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 798-803.

Fisher, C. W., M. S. Shet, D. L. Caudle, C. A. Martin-Wixtrom und R. W. Estabrook. 1992. High-level expression in *Escherichia coli* of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochromes P_{450} and NADPH-P_{450} reductase flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10817–10821.

Fogh, J., W. C. Wright und J. D. Loveless. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**: 209-214.

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

Fujita, Y., Y. Miwa, A. Galinier und J. Deutscher. 1995. Specific recognition of the *Bacillus subtilis gnt cis*-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol. Microbiol.* **17**: 953-960.

Furlanut, M., und L. Franceschi. 2003. Pharmacology of ifosfamide. *Oncology* **65 Suppl. 2**: 2-6.

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

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Hanna, P. C., T. A. Mietzner, G. K. Schoolnik und B. A. McClane. 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. *J. Biol. Chem.* **266**: 11037-11043.

Hanna, P. C., E. U. Wieckowski, T. A. Mietzner und B. A. McClane. 1992. Mapping of functional regions of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* **60(5)**: 2110-2114.

Harris, L. M., N. E. Welker und E. T. Papoutsakis. 2002. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *J. Bacteriol.* **184**: 3586-3597.

Hauschild, A. H. W., und R. Hilsheimer. 1971. Purification and characterization of the enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* **17**: 1425-1433.

Hollergschwandner, C. G. 2003. Unterschiede in der Regulation der Sporulation von *Clostridium acetobutylicum* und *Bacillus subtilis*. Dissertation, Universität Ulm.

Huang, I. H., M. Waters, R. R. Grau und M. R. Sarker. 2004. Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbiol. Lett.* **233(2)**: 233-240.

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

John, G. H., J. A. Hasler, Y. A. He und J. R. Halpert. 1994**.** *Escherichia coli* expression and characterization of cytochromes P_{450} 2B11, 2B1, and 2B5. *Arch. Biochem. Biophys.* **314(2)**: 367-375.

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

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

Kedzie, K. M., C. A. Balfour, G. Y. Escobar, S. W. Grimm, Y. A. He, D. J. Pepperl, J. W. Regan, J. C. Stevens und J. R. Halpert. 1991. Molecular basis for a functionally unique cytochrome P_{450}IIB1 variant. *J. Biol. Chem.* **266**: 22515-22521.

Kleiner, D., P. Wyatt und M. J. Merrick. 1988. Construction of multicopy expression vectors for regulated overproduction of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1779-1784.

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

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

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

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

Lee, D. S., A. Yamada, H. Sugimoto, I. Matsunaga, H. Ogura, K. Ichihara, S. I. Adachi, S. Y. Park und Y. Shiro. 2003. Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P_{450} from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem*. **278**: 9761-9767.

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

Levin, R., und R. W. Brauer. 1951. The biuret reaction for the determination of proteins; an improved reagent and its application. *J. Lab. Clin. Med.* **38(3)**: 474-480.

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

Lowery, R. G., L. L. Saari und P. W. Ludden. 1986. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation in vitro. *J. Bacteriol.* **166**: 513–518.

Lubet, R. A., R. T. Mayer, J. W. Cameron, R. W. Nims, M. D. Burke, T. Wolff und F. P. Guengerich. 1985. Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**: 43-48.

McClane, B. A. 1992. *Clostridium perfringens* enterotoxin: structure, action and detection. *J. Food Safety* **12**: 237-252.

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

Melville, S. B., R. Labbe und A. L. Sonenshein. 1994. Expression from the *Clostridium perfringens cpe* promoter in *C. perfringens* and *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.* **62**: 5550–5558.

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

Mermelstein, L. D., und E. T. Papoutsakis. 1993. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage Φ3TI methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1077-1081.

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

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

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

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

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

Miyamoto, K., G. Chakrabarti, Y. Morino und B. A. McClane. 2002. Organization of the plasmid *cpe* locus in *Clostridium perfringens* type A isolates. *Infect. Immun.* **70**: 4261-4272. Erratum in: *Infect. Immun.* **71**: 1611.

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

Moese, J. R., und G. Moese. 1964. Oncolysis by Clostridia. I. activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other non-pathogenic Clostridia against the Ehrlich carcinoma. *Cancer Res.* **24**: 212-6.

Nasri, M., und D. Thomas. 1986. Relaxation of recognition sequence of specific endonuclease *Hin*dIII. *Nucleic Acids Res.* **14**: 811-821.

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

Nölling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, GTC Sequencing Center Production, Finishing, und Bioinformatics Team, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin und D. R. Smith. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **183**: 4823-4838.

Noyer-Weidner, M., S. Jentsch, J. Kupsch, M. Bergbauer und T. A. Trautner. 1985. DNA methyltransferase genes of *Bacillus subtilis* phages: structural relatedness and gene expression. *Gene* **35**: 143-50.

O'Brien, R. W., und J. G. Morris. 1971. The ferredoxin-dependent reduction of chloramphenicol by *Clostridium acetobutylicum*. J. Gen. Microbiol. **67**: 265-271.

Okazaki, I. J., und J. Moss. 1999. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *Annu. Rev. Nutr.* **19:** 485-509.

Oultram, J. D., M. Loughlin, T. J. Swinfeld, J. K. Brehm, D. E. Thomson und N. P. Minton. 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 83-88.

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

Phillips, Z. E., und M. A. Strauch. 2002. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 392-402.

Pritchard, M. P., M. J. Glancey, J. A. Blake, D. E. Gilham, B. Burchell C. R. Wolf und T. Friedberg. 1998. Functional co-expression of CYP2D6 and human NADPH-cytochrome P_{450} reductase in *Escherichia coli*. *Pharmacogenetics* **8**: 33-42.

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

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

Raleigh, E. A., und G. Wilson. 1986. *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. **83**: 9070-9074.

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

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

Sambrook J., D. W. Russell, N. Irwin und K. A. Janssen. 2001**.** Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

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

Schmitt, J., H. Hess und H. G. Stunnenberg. 1993. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Reports* **18**: 223-230.

Shimada,T., und H. Yamazaki. 1998. Cytochrome P_{450} reconstitution systems. *Methods Mol. Biol.* **107**: 85–93.

Shimizu, T., K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, A. Yamashita, T. Shiba, N. Ogasawara, M. Hattori, S. Kuhara und H. Hayashi. 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **99**: 996-1001.

Shine, J., und L. Dalgarno. 1974. The 3′-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342-1346.

Singh, U., C. M. van Itallie, L. L. Mitic, J. M. Anderson und B. A. McClane. 2000. CaCo-2 cells treated with *Clostridium perfringens* enterotoxin form multiple large complex species, one of which contains the tight junction protein occludin. *J. Biol. Chem.* **275**: 18407-18417.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. **150**: 76-85. Erratum in: *Anal. Biochem.* **163**: 279.

Smedley III, J. G., und B. A. McClane. 2004. Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *Clostridium perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infect. Immun.* **72**: 6914-6923.

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

Suggs, S. V., T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashima, M. J. Johnson, K. I. Itakura und R. B. Wallace. 1981. Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In: **D. D. Brown.** Developmental biology using purified genes. Academic Press, New York, USA: 683-693.

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

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

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

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

Theys, J., S. Barbe, W. Landuyt, S. Nuyts, L. van Mellaert, B. Wouters, J. Anné und P. Lambin. 2003. Tumor-specific gene delivery using genetically engineered bacteria. *Curr. Gene Ther.* **3**: 207-221.

Thormann, K., und P. Dürre. 2001. Orf5/SolR: a transcriptional repressor of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **27**: 307-313.

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

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

Vieira, J., und J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.

Wallace, D. M. 1987. Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* **152**: 33-41.

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

Weiss, S. B., W. T. Hsu, J. W. Foft und N. H. Scherberg. 1968. Transfer RNA coded by the T4 bacteriophage genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**: 114-121.

Werck-Reichhart, D., und R. Feyereisen. 2000. Cytochromes P_{450}: a success story. *Genome Biology* **1**: reviews 3003.1–3003.9.

Whipple, A. O. 1949. An evaluation of radical surgery for carcinoma of the pancreas and ampullary region. *Ann. Intern. Med.* **31**: 624-7.

Williams, G. T., und A. P. Johnstone. 1983. ADP-ribosyl transferase, rearrangement of DNA, and cell differentiation. *Biosci. Rep.* **3**: 815-830.

Wnek, A. P., und B. A. McClane. 1989. Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a 160,000-Mr complex in mammalian membranes. *Infect. Immun.* **57**: 574–581.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Zhao, Y., und S. B. Melville. 1998. Identification and characterization of sporulation-dependent promoters upstream of the enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **180**: 136-142.

Zor, T., und Z. Selinger. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **236**: 302-308.

6 Zusammenfassung

1. Bei Untersuchungen des Genoms von *Clostridium acetobutylicum* wurde mit *cac*3330 ein Homolog zu dem Cytochrom P_{450} codierenden Gen *cyp*C aus *Bacillus subtilis* entdeckt. Es konnte mit RT-PCR-Experimenten kein Nachweis für eine Transkription dieses Gens erbracht werden.

2. Das Gen *cyp2BI* aus *Rattus norvegicus* wurde in *Escherichia coli* und *C. acetobutylicum* exprimiert. In Western-Transfer-Experimenten konnte das entsprechende Protein in beiden genetisch veränderten Organismen nachgewiesen werden. In Enzym-Tests mit Proteinfraktionen beider Organismen konnte aber keine Aktivität des rekombinanten Proteins gemessen werden.

3. Das *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) wurde erfolgreich in *C. acetobutylicum* exprimiert. Das *cpe*-Gen wurde mit der Signalpeptid-codierenden-Sequenz der *amyP* aus *C. acetobutylicum* fusioniert. Das dadurch resultierende Fusionsprotein wurde ausgeschleust und konnte im Überstand der Kulturen in einer Konzentration von 0,5 mg/l nachgewiesen werden.

4. In Cytotoxizitäts-Tests mit humanen Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie CAPAN1 zeigte das rekombinante CPE aus *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 eine toxische Wirkung.

5. Bei Tierversuchen mit steril gezüchteten „NMRI nu/nu“-Mäusen, die CAPAN1 Tumore trugen, wurden Sporen von *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX Klon C6 injiziert. Im Gegensatz zu in vitro-Versuchen konnte hierbei aber keine CPE-Wirkung nachgewiesen werden. Vermutlich war die sezernierte Dosis für eine Wirkung auf die Tumore zu gering.

6. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes *C. acetobutylicum* Spo0A in seiner phosphorylierten Form Spo0A-P an Gen-Abschnitten des 5'-regulatorischen Bereichs des *cpe*-Gens aus *C. perfringens* binden kann.

7. Bei Untersuchungen der *C. acetobutylicum*-Gene *cac*338 und *cac*339 konnte bei Reverse-Transkriptase-Experimenten nicht nachgewiesen werden, ob sie transkribiert werden und ob dies als Operon geschieht oder nicht.

8. Eine Überexpression des Gens *cac*338 scheiterte daran, dass es nicht gelang, das Gen in *E. coli* in einen Überexpressions-Schaukel-Vektor für *C. acetobutylicum* zu ligieren. Weitere Studien des Gens waren dadurch nicht möglich.

7 Summary

1. During the analysis of the complete *Clostridium acetobutylicum* genome a gene (*cac*3330) with high homology to *cypC* of *Bacillus subtilis*, encoding the cytochrome p_{450} protein CypC was detected. RT-PCR experiments yielded no proof for the transcription of this gene.

2. The *Rattus norvegicus* gene *cyp2bI* was successfully expressed in *E. coli* and *C. acetobutylicum*. The gene product could be detected in both genetically altered organisms during Western-transfer experiments. Enzyme tests with protein fractions of both organisms did not show any activity of the recombinant proteins.

3. The *C. perfringens* enterotoxin (CPE) was successfully expressed in *C. acetobutylicum*. The *cpe* gene was fused with the signalpeptide coding sequence of the *C. acetobutylicum amyP* gene. These modifications lead to a secretion of the resulting fusion protein to the cultures supernatant in a concentration of 0.5 mg/l.

4. During cytotoxicity tests with human pancreatic tumour cell line CAPAN1, the recombinant CPE from *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX clone C6 showed a toxic effect.

5. During experiments with “NMRI nu/nu“-mice, raised in a sterile environment and carrying CAPAN1 tumours, were injected with *C. acetobutylicum* p7BIG2TOX clone C6 spores. In contrast to the in vitro essays, no CPE effects on tumour growth were detected. Possibly, the secreted dose of toxin was not high enough to reach therapeutic levels.

6. Recombinant *C. acetobutylicum* Spo0A in its phosphorylated form Spo0A-P is able to bind to regions of the 5'-regulatory area of the *C. perfringens cpe*-gene.

7. During examination of the *C. acetobutylicum* genes *cac*338 and *cac*339 no transcripts of the genes could be detected with RT-PCR. It could not be determined if the genes form an operon or not.

8. An overexpression of the gene *cac*338 was unsuccessful. It was not possible to ligate the gene into an *E. coli – C. acetobutylicum* shuttle vector. Thus, no further studies of the gene were possible.

Danksagung

Meinen Dank möchte ich zuerst einmal Herrn Prof. Dr. Peter Dürre für die Aufnahme in seine wunderbare Arbeitsgruppe und das Überlassen dieses interessanten Themas aussprechen. Ich möchte ihm nochmals besonders für das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit, und die Möglichkeit diese selbstständig zu gestalten, danken. Nicht zu vergessen sind hierbei auch die vielen erheiternden Einblicke in die Untiefen unserer Sprache und die sicherlich weniger erheiternde Durchsicht dieses Manuskripts. Auch wenn wir in Computerdingen wohl immer zwei verschiedene Sprachen sprechen werden, so habe ich wenigstens gelernt, dass Mac-Benutzer noch nicht vom Aussterben bedroht sind und wohl doch einer erhaltenswerten Spezies angehören. Nur mit dem Datenträgerauswurf über den Papierkorb werde ich mich wohl nie anfreunden können.

Herrn Prof. Dr. Bernd Eikmanns danke ich für sein Vertrauen in Computerdingen und für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Meinen Laborkollegen gilt natürlich ganz besonderer Dank. Allen voran Brigitte Zickner die es mehr als nur einmal verstanden hat meinen morgendlichen, fragilen Motivationsaufbau durch ihre erfrischend nüchterne Art zu unterstützen, und zum Dank dafür dann mehr als einmal das verbale Kreuzfeuer zwischen Sandra und mir ertragen musste. Einen weiteren speziellen Platz nehmen Christoph und Sandra ein, die ständige Begleiter auf meinem wissenschaftlichen Werdegang mit allen Höhen und Tiefen gewesen sind und mit denen mich mehr als nur fast 10 gemeinsame Jahre verbinden.

Es fällt schwer hier irgendjemanden nicht zu nennen und ich möchte eigentlich generell jedem in der Abteilung für das hervorragende Arbeitsklima und die vielen gemeinsamen Aktivitäten die niemals langweilig waren danken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Omi für die stetige Hilfe während all der Jahre bedanken. Claudia und Kaja möchte ich natürlich besonders für die Liebe und Unterstützung danken die mir auch über schwierige Phasen hinweggeholfen haben.

Lebenslauf

24.04.1974	Geburt in Ulm
1980 bis 1982	Grundschule Scharmützelsee Berlin
1982 bis 1984	Grundschule Oberelchingen
1984 bis 1993	Gymnasium Anna-Essinger, Ulm
05/1993	Abitur
09/1994 bis 11/1995	Zivildienst in der Fachklinik für Neurologie, Dietenbronn GmbH, 88477 Schwendi.
10/1996 bis 12/2000	Studium der Biologie an der Universität Ulm. Vordiplom 1998 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Humangenetik, Chemie sowie Pharmakologie und Toxikologie.
01/2001 bis 10/2001	Experimentelle Diplomarbeit in der Abteilung für Mikrobiologie und Biotechnologie unter Anleitung von Herrn Dr. Stupperich mit dem Thema: „Mikrobiologische Untersuchungen an einer Tyrosin-Phenollyase in *Sporomusa ovata*“.
01/2002	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation in der Abteilung für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm.

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, März 2006

_____

(Gunnar Box)