

**Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Ulf R. Rapp**

**Optimierung eines Balanced Lethal Systems für  
*Salmonella Typhi* Ty21a**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Martin Benedikt Ambros Gesser**

**aus Höringen (Rheinland-Pfalz)**

**Würzburg, September 2010**

**Referent: Professor Dr. med. U. Vogel**

**Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. T. Kerkau**

**Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**02.03.2011**

Der Promovend ist Arzt

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

|           |   |                        |
|-----------|---|------------------------|
| <b>1.</b> | <b><u>EINLEITUNG</u></b>                                | <b><u>Seite 1</u></b>  |
| 1.1.      | Einführung  | 1                      |
| 1.1.1.    | Tumoren   | 1                      |
| 1.1.2.    | Immunüberwachung von Tumoren                            | 2                      |
| 1.1.3.    | Immuntherapie von Tumoren                               | 4                      |
| 1.1.4.    | Bakterielle Tumorthherapie                              | 5                      |
| 1.2.      | Balanced Lethal System in <i>Salmonella typhi</i> Ty21a | 7                      |
| 1.2.1.    | <i>Salmonella typhi</i> Ty21a                           | 7                      |
| 1.2.2.    | Antigendelivery Plasmid pMO                             | 9                      |
| 1.2.3.    | $\alpha$ -Hämolysin-Sekretionssystem                    | 9                      |
| 1.2.4.    | Balanced Lethal Systeme                                 | 11                     |
| 1.3.      | Vorgängerarbeit   | 12                     |
| <b>2.</b> | <b><u>MATERIAL</u></b>                                  | <b><u>Seite 13</u></b> |
| 2.1.      | Geräte  | 13                     |
| 2.2.      | Verbrauchsmaterialien                                   | 15                     |
| 2.3.      | Bakterienstämme   | 16                     |
| 2.4.      | Plasmide  | 17                     |
| 2.5.      | Primer  | 21                     |
| 2.6.      | Enzyme  | 23                     |
| 2.7.      | Antikörper  | 24                     |
| 2.8.      | Kulturmedien und Antibiotika                            | 24                     |
| 2.8.1.    | LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)                        | 24                     |
| 2.8.2.    | 2YT-Medium  | 24                     |
| 2.8.3.    | BHI-Medium  | 24                     |
| 2.8.4.    | Antibiotika   | 25                     |
| 2.9.      | Chemikalien   | 25                     |

|            |    |
|------------|----|
| 2.10. Kits | 27 |
|------------|----|

|                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| <b>3. <u>METHODEN</u></b> | <b>Seite 28</b> |
|---------------------------|-----------------|

---

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Umgang mit Bakterien  | 28 |
| 3.1.1. Sterilisation von Kulturmedien und Geräten  | 28 |
| 3.1.2. Herstellung von Glycerinkulturen  | 28 |
| 3.1.3. Bakterienaufzucht in Flüssigmedien  | 28 |
| 3.1.4. Bakterienaufzucht auf Kulturplatten   | 29 |
| 3.1.5. Herstellung elektrokompenter Zellen   | 29 |
| 3.2. Molekulargenetische Methoden  | 30 |
| 3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA  | 30 |
| 3.2.2. DNA-Aufreinigung  | 32 |
| 3.2.3. Elektrophoretische DNA-Auftrennung  | 35 |
| 3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 37 |
| 3.2.4.1. Screening-PCR mittels Schnelllysat  | 40 |
| 3.2.4.2. Real-Time-PCR (RT-PCR)  | 40 |
| 3.2.5. Restriktionsverdau von DNA  | 42 |
| 3.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten   | 43 |
| 3.2.7. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien   | 44 |
| 3.2.8. Photometrische Messung  | 45 |
| 3.2.9. Sequenzierung von DNA   | 46 |
| 3.2.10. Synchrone Exzision des <i>tyrS</i> -Cm-Fragments<br>aus dem Genom und Deletion der<br>Kanamycin <sup>R</sup> -Kassette aus dem pMO-Plasmid | 46 |
| 3.3. Proteinanalytische Methoden   | 48 |
| 3.3.1. Proteinisolierung aus Bakterienüberstand  | 48 |
| 3.3.2. Proteinisolierung aus Bakterienpellet   | 49 |
| 3.3.3. Natrium-Dodecylsulfate-Polyacrylamid-<br>Gelelektrophorese (SDS-Page)   | 50 |
| 3.3.4. Western-Blot  | 52 |

|           |  |                 |
|-----------|--|-----------------|
| <b>4.</b> | <b><u>ERGEBNISSE</u></b>   | <b>Seite 55</b> |
| 4.1.      | Klonierung der <i>tyrS</i> -HisTag-Expressionskassette<br>in die Sall-Site | 55              |
| 4.1.1.    | Herstellung von pMO-CTX-PSA-Sall- <i>tyrS</i> -HisTag                      | 55              |
| 4.1.2.    | Proteinanalytische Untersuchungen  | 59              |
| 4.2.      | Austausch des wildtypischen Promotors<br>durch den <i>lacI</i> -Promotor   | 62              |
| 4.2.1.    | Herstellung von<br>pMO-CTX-PSA-Spel- <i>lacI</i> - <i>tyrS</i> -HisTag     | 62              |
| 4.2.2.    | Proteinanalytische Untersuchungen  | 67              |
| 4.3.      | Komplementierung des Sigmafaktors RpoS                                     | 69              |
| 4.3.1.    | Proteinanalytische Untersuchungen  | 69              |
| 4.4.      | Proteinanalytische Untersuchungen unter<br>verschiedenen Bedingungen       | 70              |
| 4.5.      | Plasmidkopienzahl  | 70              |
| 4.5.1.    | Verrechnung der Ergebnisse   | 70              |
| 4.5.2.    | Plasmidkopienzahlen getesteter Bakterienstämme                             | 72              |
| 4.6.      | Weitere Klonierungen   | 74              |
| 4.7.      | Arbeiten mit <i>S. typhimurium aroA</i> SI7207                             | 74              |
| <b>5.</b> | <b><u>DISKUSSION UND AUSBLICK</u></b>                                      | <b>Seite 76</b> |
| <b>6.</b> | <b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>  | <b>Seite 85</b> |

**7. LITERATUR- UND BILDNACHWEIS Seite 87**

---

7.1. Literaturnachweis 87

7.2. Bildnachweis 99

**8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS Seite 101**

---

**9. DANKSAGUNG**

**10. CURRICULUM VITAE**

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

### 1.1.1. Tumoren

Als Tumor wird die autonome Gewebeneubildung mit einer gesteigerten, kontrollierten oder unkontrollierten Zellproliferation bezeichnet.

Neben den kardiovaskulären Erkrankungen sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Lunge, Prostata und Kolon sind beim Mann häufig befallene Organe. Der häufigste Tumor der Frau ist das Mammakarzinom (Bühling, Lепенies et al. 2004).

Bei „entarteten“ Zellen sind die regulierenden Mechanismen des Zellwachstums gestört. Ursachen einer malignen Transformation wirken immer auf das Genom der Zelle:

1. zufällig aufgetretene DNA-Mutationen
2. konstitutive Defekte von Genen, die in die DNA-Replikation, DNA-Reparatur DNA-Segregation eingreifen
3. Virusinfekte
4. Chemikalien
5. Strahlen

(Hanahan and Weinberg 2000; Oberholzer 2001)

Die Mutationen verschaffen den malignen Zellen Vorteile gegenüber gesunden Zellen. Es werden sechs essenzielle Eigenschaften beschrieben, die als sichere Zeichen für die Bösartigkeit eines Tumors gelten:

1. Unabhängiges Wachstum durch eigenständiges Versorgen mit Wachstumssignalen
2. Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Reizen
3. Vermeidung von programmiertem Zelltod (Apoptose)
4. Uneingeschränkte Zellproliferation
5. Induktion einer gesteigerten Angiogenese



6. Invasives Wachstum (Eindringen in benachbarte Gewebe) und Metastasierung (Eindringen in entfernte Gewebe über die Blutbahn oder die Lymphwege)

(Hanahan and Weinberg 2000; Bühling, Lепенies et al. 2004; Schuster, Nechansky et al. 2006).

Diese sechs Charakteristika kann man um ein siebentes Merkmal ergänzen, dem „Immune Escape“, also der Eigenschaft einer Immunantwort zu entgehen (siehe 1.1.3) (Shankaran, Ikeda et al. 2001; Dunn, Old et al. 2004; Zitvogel, Tesniere et al. 2006; El Hage F 2008).

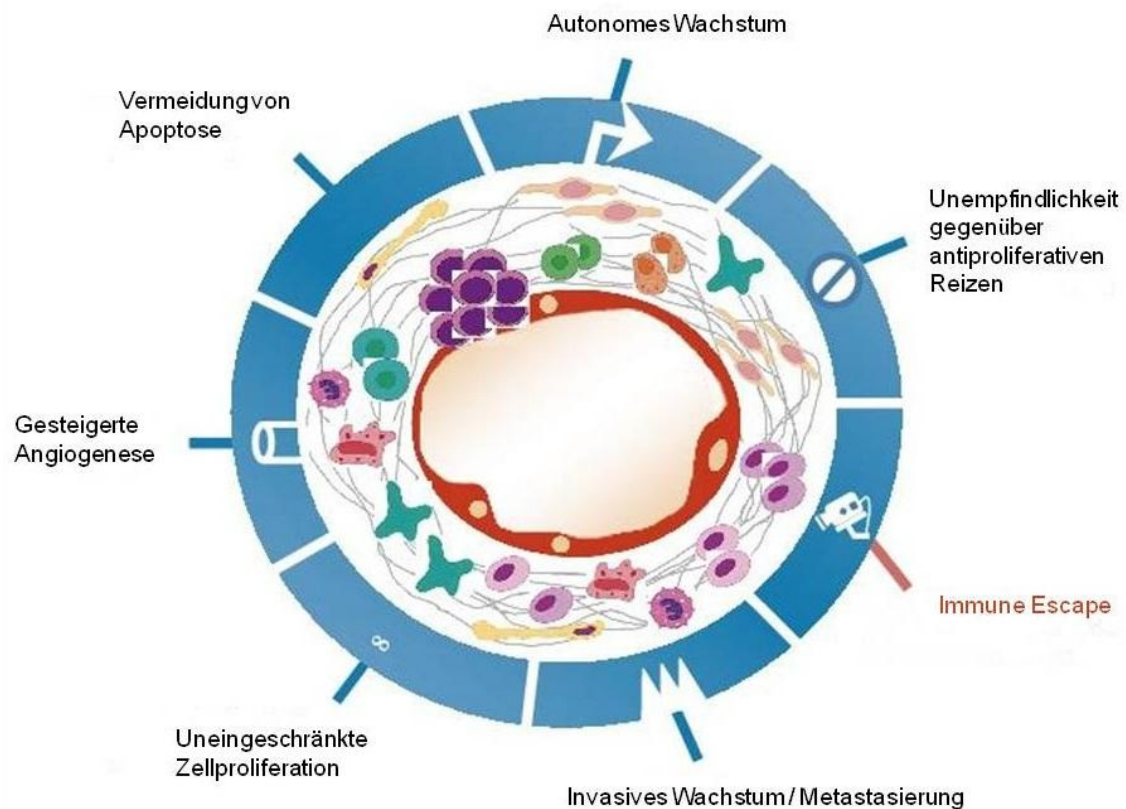


Abb. 1: Die 7 Kennzeichen von Tumorzellen nach El Hage *et al.* (El Hage F 2008)

### 1.1.2. Immunüberwachung von Tumoren

Schon im Jahre 1909 vermutete Paul Ehrlich, dass das Immunsystem entartete Zellen angreife und so die Entstehung von Krebs verhindere (Ehrlich 1909). Ein

geschwächtes Immunsystem führt somit zur gehäuften Entstehung von malignen Neoplasien (Grulich, van Leeuwen et al. 2007). So ist zum Beispiel das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken bei HIV-infizierten Patienten signifikant höher (Ruiz 2010; Shebl FM 2010). Auch die dauerhafte Therapie mit Immunsuppressiva, wie zum Beispiel bei organtransplantierten Patienten, führt zu einer dreifach erhöhten Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken als bei gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Vergleichsgruppen (McCann 1999; Vajdic and van Leeuwen 2009).

Der erste Kontakt zwischen adaptiven Immunsystem und Tumorantigenen findet in den Wächterlymphknoten (Sentinel-Lymphknoten), den Lymphknoten, die im Abflussgebiet der Lymphflüssigkeit eines bösartigen Tumors an erster Stelle liegen, statt (Lu and Finn 2007). Tumorspezifische naive  $CD4^+$  T-Lymphozyten können von antigenpräsentierenden Zellen (APC) über Präsentation von Tumorantigenen über den MHC-Klasse-II-Komplex stimuliert werden. Die Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen verläuft über Präsentation antigener Strukturen durch APC über den MHC-Klasse-I-Komplex. Zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen erkennen die Epitope von tumorassoziierten Antigenen, die über den MHC-Klasse-I-Komplex auf der Zellmembran der tumorösen Zellen präsentiert werden (Boon T 1997; Coulie PG 1997; El Hage F 2008). Die Lyse der Zielzelle ist hauptsächlich perforinvermittelt oder Fas/FasL-gesteuert (Henkart 1994; Nagata and Golstein 1995).

Eine besondere Aufgabe kommt den  $CD4^+$  T-Lymphozyten zu. Sie sind zwar nicht essenziell für die Umwandlung von  $CD8^+$  T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen, aber sie sind entscheidend beteiligt an der Ausbildung von Gedächtniszellen, die eine erneute  $CD8^+$  T-Zell-vermittelte Immunantwort einleiten können. Deshalb ist die Ausbildung von effektiven  $CD4^+$  T-Helfer-1-Zellen entscheidend für eine effektive Immunantwort gegen Tumorzellen und um die Ausbildung einer Toleranz gegenüber Tumorantigenen zu verhindern (Guerder S 1992; Finn 2003; Kaech and Ahmed 2003). Die Anwesenheit von Th1-Lymphozyten führt bei vielen malignen Neoplasien zu einer prognostischen Verbesserung (Lu and Finn 2007).

Auch das angeborene Immunsystem beteiligt sich an der Immunüberwachung von Tumoren. NKG2D-Liganden werden auf der Zelloberfläche von Lungen-, Nieren-, Prostata-, Ovarial-, Kolon- und Leberkarzinomen und Melanomen exprimiert (Groh, Wu et al. 2002; Vetter, Groh et al. 2002; Jinushi, Takehara et al. 2003). Natürliche Killerzellen und natürliche Killer-T-Zellen verfügen über den NKG2D-Rezeptor und können mit dessen Hilfe o. g. Tumorzellen erkennen und in ihrer Funktion beeinträchtigen (Diefenbach, Jamieson et al. 2000; Gao, Yang et al. 2003). Natürliche Killerzellen, Monozyten und dendritische Zellen können einen Liganden induzieren, der über den Tumornekrosefaktor zur Apoptose (TRAIL) von Tumorzellen führt (Smyth MJ 2003).

### **1.1.3. Immuntherapie von Tumoren**

Basis immuntherapeutischer Verfahren ist die Entdeckung tumorspezifischer Antigenstrukturen auf den Zelloberflächen tumoröser Gewebe. Antigene sind Moleküle, die vom Immunsystem als nicht körpereigen erkannt werden und eine starke Immunantwort auslösen (Chiara Castelli 2000). Im Fall von Tumorantigenen handelt es sich jedoch um nicht körperfremde Proteine, da sie Produkte des veränderten Genoms körpereigener Zellen sind. Deshalb kann eine Immunantwort oftmals ausbleiben, man spricht von Immuntoleranz (Speiser, Miranda et al. 1997 ; Overwijk, Theoret et al. 2003).

Es gibt verschiedene Therapieansätze denen Tumorantigene als Zielstrukturen zugrunde liegen. Diese Ansätze umfassen Vakzination mit antigeninkubierten Immunzellen (Higano, Schellhammer et al. 2009), Vakzination mit viralen Vektoren (Arlen, Kaufman et al. 2005), Verwendung von monoklonalen Antikörpern (Spector and Blackwell 2009) und Vakzinierung mit modifizierten Tumorzellen (Simons and Sacks 2006). Die Blockierung von T-Zell-spezifischen Rezeptoren deren Aktivierung zu einer Immunsuppression führt gehört ebenfalls zu den vielversprechenden Ansätzen im Bereich der Immuntherapie von Tumoren (Drake 2010).

Die verschiedenen Therapien zeigen unterschiedliche Erfolge und haben spezifische Vor- und Nachteile. Jedoch sehen sich alle den gleichen Schwierigkeiten gegenüber. Zum einen gilt es die Toleranz des Immunsystems gegenüber Tumorantigenen zu überwinden, zum anderen gibt es zahlreiche molekulare Mechanismen, die malignen Zellen erlauben, sich der Angriffe des Immunsystems zu erwehren oder sie zu unterdrücken (Dunn, Old et al. 2004; El Hage F 2008). Deshalb findet die Kombination mit einem Adjuvans breite Anwendung (Finn 2003). Adjuvantien können die Stimulierung von T-Zellen durch APC aktivieren oder die Produktion von Zytokinen anregen (Finn 2003). Und so ist zum Beispiel die Verabreichung von Zytokinen wie Interferon  $\gamma$  (Su, Zhang et al. 2010) oder Interleukin-2 Teil der onkologischen Immuntherapie (Salgaller and Lodge 1998).

#### **1.1.4. Bakterielle Tumorthherapie**

Die bevorzugte Replikation von Bakterien in Tumorgewebe wurde in den 1960er Jahren entdeckt. Clostridien vermehrten sich in den hypoxischen Bereichen von malignem Gewebe, während die mit Sauerstoff versorgten Gebiete unbesiedelt blieben. Dieses bakterielle Wachstum ging mit der Lyse großer Tumoren mit zentraler Nekrose einher, kleinere metastatische Absiedelungen zeigten jedoch keine Verkleinerung (Engelbart and Gericke 1964; Mose and Mose 1964; Thiele, Arison et al. 1964; Georges Vassaux 2006).

In neueren Experimenten ist es mit Hilfe von Clostridien gelungen, „Pro-Drug-Converting Enzymes“ (also Enzyme, die Vorstufen von Medikamenten in die eigentliche Wirkform umwandeln) im Tumorgewebe zu exprimieren. Die Bakterienstämme sezernierten Proteine, die die Fähigkeit besitzen, die Chemotherapeutika 5-Fluorouracil und CB 1954 in ihre wirksame Form umzuwandeln. Die so „vor Ort“ entstandenen Gifte können dann entartete Zellen töten (Fox ME 1996; Lemmon MJ 1997; Theys J 2001; Liu SC 2002; Minton 2003). Man erhofft sich von diesem Ansatz deutlich weniger Nebenwirkungen für den Gesamtorganismus.

Auch mit Salmonellenstämmen wurden schon vielversprechende Ergebnisse erzielt. Im Unterschied zu den grampositiven, anaeroben Clostridien sind Salmonellen fakultative Anaerobier und können sowohl hypoxische Tumorzentren, als auch kleine und sauerstoffreiche Areale (Metastasen) besiedeln (Georges Vassaux 2006). 1997 konnte das erste Mal das Potenzial von Salmonellen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass attenuierte, hyperinvasive und auxotrophe *Salmonella*-Mutanten in Tumorgewebe persistieren und replizieren. Der therapeutische Effekt war ein Wachstumsstopp der Melanomzellen und eine Verlängerung der Überlebenszeit der Mäuse. Wurden diese Mutanten mit einem Plasmid, auf dem das Enzym Thymidin-Kinase (aus *Herpes simplex Virus*) codiert ist, ausgestattet, konnte man nochmals eine Verringerung des Tumorwachstums, sowie eine Verlängerung der Überlebenszeit beobachten (Pawelek, Low et al. 1997). In einer anderen Studie konnte bei Mäusen mit Melanomen eine signifikante Größenreduktion des Tumors, sowie eine geringere Anzahl an Lungenmetastasen nach intravenöser Gabe von einem modifizierten Salmonellenstamm beobachtet werden (Luo X 2001). Weitere Verbesserungen der antineoplastischen Eigenschaften von Salmonellen wurden durch genetische Modifikationen erzielt (Niethammer, Xiang et al. 2002; Luo, Zhou et al. 2003). In der Kombination mit herkömmlichen Behandlungsmethoden erzielen genetisch veränderte Salmonellen noch größere therapeutische Effekte, zum Beispiel in Kombination mit einer Strahlentherapie (Platt, Sodi et al. 2000) oder bei paralleler Gabe von Cisplatin (Lee, Wu et al. 2005). Durch die oben beschriebenen Eigenschaften von Salmonellen eröffnen sich auch neue Möglichkeiten in der Diagnostik. Salmonellen, die die Thymidin-Kinase des *Herpes simplex Virus* exprimieren, können radioaktiv-markierte Nukleosidanaloga phosphorylieren und sie so in ihrem Zellinneren akkumulieren. Da die Bakterien im malignen Gewebe persistieren, kann man über Messung des radioaktiven Signals den Tumor lokalisieren (Tjuvajev, Blasberg et al. 2001; Soghomonyan, Doubrovin et al. 2004).

Die Vakzinierung mit *Salmonella typhi* Ty21a kann sowohl B-Zell-gesteuerte als auch T-Zell-gesteuerte Immunreaktionen auslösen (Kantele, Kantele et al. 1997; Kantele, Zivny et al. 1999; Viret, Favre et al. 1999; Dietrich, Griot-Wenk et al. 2003). Die Sensibilisierung von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gegenüber Salmonellenantigenen kann über zwei Mechanismen verlaufen: 1) Antigenpräsentation durch APC nach direkter Aufnahme und Verdau von Bakterien und 2) über Präsentation von Salmonellenantigenen durch APC nach indirekter Aufnahme durch Endozytose von anderem Gewebe und anschließender MHC-Klasse-I-Präsentation (cross-presentation)(Salerno-Goncalves and Sztejn 2009). Ein entscheidender Vorteil von *Salmonella typhi* im Hinblick auf die Sensibilisierung des Immunsystems gegenüber malignem Gewebe.

## **1.2. Balanced Lethal System in *Salmonella typhi* Ty21a**

### **1.2.1. *Salmonella typhi* Ty21a**

*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhi Ty21a (im folgenden mit *S. typhi* bezeichnet) ist ein Vakzinestamm, d. h. er wird für Impfungen verwendet.

*Salmonella typhi* Ty21a ist eine attenuierte Mutante des pathogenen Erregers *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhi Ty2. Der Virulenzverlust basiert auf mehreren irreversiblen, genetischen Defekten, die durch chemischen Stress indiziert wurden. Dazu gehört ein Mangel an UPD-Galaktose-4-Epimerase (gal E Mutante), was bedeutet, dass eine exogene Galaktosezufuhr zur Lyse des Bakteriums führt (Nikaido 1961; Germanier and Furer 1971). Des Weiteren führt eine Mutation im *ilvD*-Gen, dass die Aminosäuren Isoleucin und Valin nicht mehr vom Bakterium synthetisiert werden können und somit essenzielle Aminosäuren für *Salmonella typhi* Ty21a sind. Der Sigmafaktor RpoS beeinflusst die Initialphase der Infektion mit Salmonellen. Eine *rpoS*-Mutation führt bei Ty21a zu einer Verminderung der

Stressresistenz und somit zu einer Verminderung der Pathogenität (Robbe-saule, Coynault et al. 1995; Coynault, Robbe-Saule et al. 1996).

Trotz der zahlreichen Mutationen ist der Stamm genetisch stabil. Re-Mutationen zu einer virulenten Form wurden bisher weder *in vitro* noch *in vivo* beobachtet (Gentschev, Spreng et al. 2007).

Die Verwendung von Ty21a als Adjuvans und Vektor für Fremddantigene hat folgende Vorteile:

1. Die orale Applikation bietet eine einfache Handhabung und Umgang mit dem Impfstoff.
2. Die breite Immunantwort beinhaltet sowohl eine humorale (IgA und IgG), als auch eine zellvermittelte Immunreaktion (Kantele, Kantele et al. 1997; Kantele, Zivny et al. 1999; Viret, Favre et al. 1999; Dietrich, Griot-Wenk et al. 2003) (siehe 1.1.4).
3. Der Stamm ist gut verträglich und hat eine niedrige Versagerquote wie in einer Studie, an der mehr als 600.000 Erwachsene und Kinder teilnahmen, zeigen konnte (Levine, Ferreccio et al. 1999).
4. Leichte Nebenwirkungen sind vor allem Diarrhoe (5,1%), Emesis (2,1%) und Fieber (2%) (Engels, Falagas et al. 1998). Schwere Nebenwirkungen wurden selbst bei Verabreichung hoher Dosen nicht beobachtet (Gilman 1977).
5. Die Methoden zur genetischen Modifikation von *S. typhi* Ty21a sind etabliert. So können Plasmidvektoren, die für *Escherichia coli* entwickelt wurden, generell auch in Salmonellen eingesetzt werden (Levine, Hone et al. 1990). Es existieren Methoden, um diese Plasmide zu stabilisieren (Nakayama K. 1988) und Techniken um Fremd-DNA in das *Salmonella*-Genom zu integrieren (Hone, Attridge et al. 1988).
6. Der Einsatz von *S. typhi* Ty21a als Adjuvans und Träger für Fremdproteine wurde bereits in mehreren Studien evaluiert. *S. typhi* Ty21a diente hierbei als Carrier und Adjuvans für Antigene von *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium leprae*, *Plasmodium falciparum*, *Francisella tularensis*, *Schistosoma mansoni* und

*Hepatitis-B-Virus* (Herrington, Van De Verg et al. 1990; Levine, Hone et al. 1990; Tacket, Kelly et al. 1997).

### **1.2.2. Antigenelivery Plasmid pMO**

Grundlage für das von der AG Tumorstoffe weiterentwickelte Antigenelivery Plasmid war das pMO-CTX-Hly1, das zum einen für die Signalsequenz HlyA<sub>s</sub> als auch für die Proteinstrukturen des  $\alpha$ -Hämolysin-Sekretionssystems codiert (Gentschev, Mollenkopf et al. 1996). Später wurde die Gensequenz für das Fusionsprotein (entweder CTX-PSA plus HlyA<sub>s</sub> oder CTX-B-Raf<sup>1</sup> plus HlyA<sub>s</sub>) zwischen die Abschnitte für die Tunnelproteine HlyC und HlyB integriert.

Um die Plasmidstabilität zu erhöhen wurde zusätzlich eine Ampicillin-Resistenzkassette eingefügt (Gentschev, Fensterle et al. 2005). Weil Ampicillinresistenzen für die Anwendung im Menschen nicht mehr zugelassen sind, wurde im Rahmen der Weiterentwicklung des Plasmids das Ampicillin-Resistenzgen gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht, welche von Flipase-Recognitions-Sites (FRT-Sites) begrenzt wird (Diessner 2010). Das pMO enthält zudem eine Insertionssequenz (IS2), die die Rekombination zwischen homologen Sequenzen auf Chromosomen oder anderen Plasmiden vermittelt (Rijavec, Budic et al. 2007). Bei einer Anwendung als Impfstoff für den Menschen könnte demnach eine Gefahr der homologen Rekombination mit Abschnitten aus dem humanen Genom bestehen. Daher sollte versucht werden, das IS2-Element zu entfernen (Diessner 2010).

### **1.2.3. $\alpha$ -Hämolysin-Sekretionssystem**

Gramnegativen Bakterien stehen vier verschiedene Sekretionssysteme zur Verfügung mit deren Hilfe sie intrazellulär gebildete Proteine in den extrazellulären Raum sezernieren können (Filloux, Voulhoux et al. 2002). Das  $\alpha$ -Hämolysin-(HlyA)-Sekretionssystem ist der Prototyp eines Typ-I-Sekretionssystems. Es kommt in *Escherichia coli* vor, funktioniert aber auch in

---

<sup>1</sup> V600E-Mutante



anderen gramnegativen Bakterien, welche über die genetische Sequenz des Sekretionssystems verfügen. So auch in *Salmonella typhi* Ty21a (Spreng, Dietrich et al. 1999).

Das HlyA-Sekretionssystem besteht aus 3 Membranproteinen: 2 in der inneren Zellmembran (HlyB und HlyD), sie erkennen das spezifische Transportprotein und eines in der äußeren (ToIC), das eine Pore in der Außenmembran bildet. Die drei Membranproteine bilden einen Tunnel, der die Innen- mit der Außenmembran verbindet. Das Signal zur Sekretion stellen die 50-60 Aminosäuren am C-terminalen Ende von HlyA, dar. Proteine, die Träger der HlyA-Signalsequenz (HlyA<sub>S</sub>) sind, werden von dem Sekretionskomplex erkannt und sezerniert ohne dabei eine vorübergehende Konformationsänderung eingehen zu müssen. Die Gene für die einzelnen Komponenten können auf extrazellulärer DNA (Plasmiden) codiert sein und sind somit zugänglich für Modifikationen. Das HlyA-Sekretionssystem kann heterologe Proteine in einem Größenumfang von 20 bis mehr als 1000 Aminosäuren exportieren. Die Proteine können sowohl eukaryotischen als auch prokaryotischen Ursprungs sein (Gentschev, Dietrich et al. 2002).

Da die HlyA-Sequenz selbst ein schwaches Antigen darstellt, dass B- und T-Zellen stimuliert, ist das  $\alpha$ -Hämolysin-Sekretionssystem ein idealer Weg, den Immunzellen tumorspezifische Antigene zu präsentieren (Gentschev, Mollenkopf et al. 1996).

In der Arbeitsgruppe „Bakterielle Tumorthherapie“ werden Vakzinstämme hergestellt, die mittels des  $\alpha$ -Hämolysin-Sekretionssystem tumorspezifische Antigene, wie z. B. PSA oder C-Raf, sezernieren. So haben C-Raf sezernierende Salmonellen im Mausmodell zu einer Tumorreduktion, sowie einer humoralen und T-Zell abhängigen Immunreaktion geführt (Gentschev, Fensterle et al. 2005). Somit erscheint dieser Ansatz als sehr vielversprechend im Hinblick auf neue Krebstherapien.

#### 1.2.4. Balanced Lethal Systeme

Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze, um Plasmid-DNA in Bakterien zu stabilisieren. Die erste Möglichkeit ist im Hinblick auf die Konstruktion eines Impfstammes nachteilig, da sie den Bakterien eine Antibiotikaresistenz verleiht. Solche Stämme erhalten zudem kaum noch eine offizielle Zulassung.

Die Konstruktion eines Balanced Lethal Systems stellt eine alternative Methode der Plasmidstabilisierung dar. Das erste Balanced Lethal System wurde auf Basis des *asd*-Gens konstruiert. Produkt dieses Gens ist das Enzym Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Dehydrogenase, das essenziell an der Bildung der bakteriellen Zellwand beteiligt ist. Das Gen wurde aus dem Salmonellen-Genom deletiert und auf einem Plasmid komplementiert. Da der Funktionsverlust der Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Dehydrogenase nicht durch Aufnahme entsprechender Stoffe aus tierischem Gewebe ausgeglichen werden kann, bedeutet der Verlust des Plasmids das Absterben des Bakteriums (Curtiss, Galan et al. 1990; Tacket, Kelly et al. 1997; Spreng and Viret 2005).

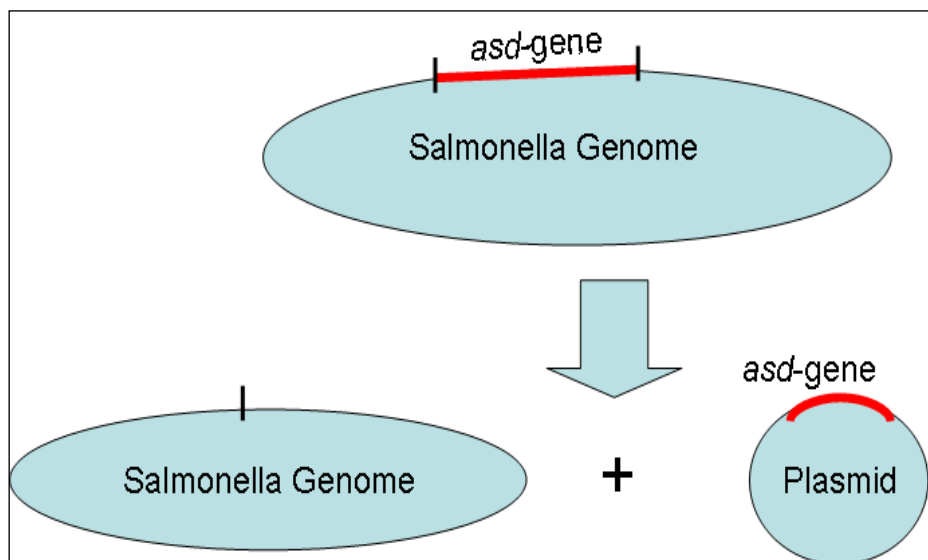


Abb. 2: Prinzip der Plasmidstabilisierung nach Curtiss *et al.* (Diessner 2010)

Der Vorteil eines Balanced Lethal Systems ist der Verzicht auf eine Antibiotikumresistenz. So spart man Kosten bei der Produktion des

Impfstammes und eliminiert gleichzeitig das Risiko einer allergischen Reaktion auf Antibiotikumreste im fertigen Impfstoff.

### **1.3. Vorgängerarbeit**

In vorangegangener Arbeit konnte ein stabiles Balanced Lethal System in *Salmonella typhi* Ty21a etabliert werden (Diessner 2010). Verwendet wurde eine Modifikation der „One-step inactivation“-Methode von Datsenko und Wanner (Datsenko and Wanner 2000). Zunächst wurde das chromosomale *tyrS*-Gen durch eine *tyrS*-Chloramphenicol-Kassette ersetzt, die von FRT-Sites begrenzt ist. Das pMO-Antigendelivery-Plasmid, das ebenfalls das *tyrS*-Gen, aber auch eine von FRT-Sites flankierte Kanamycin-Resistenzkassette trägt, wurde in *Salmonella typhi* Ty21a transformiert. In einem letzten Schritt wurden die chromosomale *tyrS*-Cm-Kassette und die extrachromosomale Kan-Resistenzkassette von dem Enzym Flipase, das an den FRT-Sites (Flipase Recognition Target) ansetzt, herausgeschnitten und die Enden mittels homologer Rekombination wieder zusammengefügt (Diessner 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte vorrangig das von Diessner etablierte Modell verbessert werden. Ansatzpunkte einer Optimierung boten Veränderungen in der Wahl der Schnittstelle für die Insertion des *tyrS*-Fragments und der Austausch des der *tyrS*-Sequenz vorgeschalteten Promotors.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

| Gerät                        | Hersteller           |
|------------------------------|----------------------|
| Analysewaage                 | ScalTec              |
| Blotting Kammer              | BioRad               |
| Brutschrank                  | Heraeus              |
| Eismaschine                  | Scotsman             |
| Elektroporator               | BioRad               |
| Exponierkassette             | Dr. Goos- Suprema    |
| Filmentwickler               | Kodak                |
| Gefrierschrank               | -20±C Liebherr       |
| Gefrierschrank               | -80±C Nunc Advantage |
| Gelelektrophoreseapparatur   | BioRad               |
| Heizblock                    | Liebisch             |
| Inkubator                    | Heraeus              |
| Kühl- und Gefrierkombination | Siemens              |

|  |                        |
|--|------------------------|
| Kühlschrank 4±C                                    | Liebherr               |
| Magnetrührer                                       | GLW                    |
| Netzgerät für Elektrophorese und Blotting<br>Gerät | BioRad                 |
| Orbitalschüttler                                   | BelicoBiot.            |
| Pipettierhilfe                                     | Eppendorf              |
| Pipetten   | Eppendorf              |
| Sequencer  | ABI PRISM 377          |
| Sterilbank   | Heraeus                |
| Thermocycler                                       | Biometra               |
| Timer  | Roth                   |
| Tischzentrifuge                                    | Eppendorf              |
| UV-Fotoanlage                                      | Sony                   |
| Vortexer   | Scientific Industries  |
| Speedvac-Konzentrator                              | Eppendorf concentrator |
| Wasserbad  | GLW                    |
| Zentrifuge   | Megafuge 1.0 R Heraeus |

Rotar Gene 2000 Real Time Cyclor

Corbett Research

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

### Material

### Hersteller

Blottingpapier 3 mm 190 g/m<sup>2</sup>

Schleicher und Schüll

Caps 1,5 ml

Eppendorf

Caps 2.0 ml

Eppendorf

Caps PCR

Sarstedt

Elektroporationsküvetten

Peqlab

sterile Reaktionsgefäße, 15 ml

Greiner

sterile Reaktionsgefäße, 50 ml

Greiner

Nitrozellulose Transfermembran

Schleicher und Schüll

Parafilm

Hartenstein Laborbedarf

Pasteurpipetten

Hartenstein Laborbedarf

Petrischalen 12 cm

Greiner

Pipettenspitzen

Hartenstein Laborbedarf

Reaktionsgefäße

Hartenstein Laborbedarf

|   |                   |
|---|-------------------|
| Röntgenfilme  | Konica            |
| Serologische Pipetten 5 ml bzw. 10 ml<br>bzw. 25 ml | Sarstedt          |
| PCR Tubes 0,2 ml für Real Time PCR                  | Biozym Scientific |

### 2.3. Bakterienstämme

| Bakterienstamm   | Herkunft            | Verwendungszweck                                |
|--|---------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$<br>Laborstamm                                 | MSZ, Würzburg       | Klonierungsarbeiten                             |
| <i>Salmonella typhi</i> Ty21a<br>attenuierter Typhus-<br>Impfstamm                 | Vivotif, Berna      | Entwicklung des Balanced<br>Lethal Systems      |
| <i>Salmonella enterica serovar</i><br><i>typhimurium</i> SL 7207                   | Stocker, B. A. D.   | Transformation von pMO-<br>Plasmid              |
| <i>Salmonella typhi</i> Ty21a mit<br><i>tyrS</i> -HisTag- <i>cat</i> -<br>Kassette | MSZ, Würzburg       | Ausgangsstamm für den<br>chromosomale Knock-out |
| <i>Salmonella typhi</i> Ty21a $\Delta$<br><i>tyrS</i> -Gen                         | <i>diese Arbeit</i> | Balanced Lethal System                          |

## 2.4. Plasmide

| Plasmid                      | Charakteristik  | Herkunft                              |
|------------------------------|---|---------------------------------------|
| pKD3                         | Chloramphenicol Resistenz ( $Cm^R$ )<br>Ampicillin Resistenz ( $Amp^R$ )<br>Priming Sites, FRT Sites  | Datsenko und Wanner,<br>2000          |
| pKD3-Spel                    | pKD3 mit integrierter Spel-Site =><br>Integrations-Site   | Diessner<br>Isolation aus Klon: 7     |
| pKD3-Spel-tyrS-s             | Chloramphenicol Resistenz ( $Cm^R$ )<br>Ampicillin Resistenz ( $Amp^R$ )<br>Priming Sites, FRT Sites<br>tyrS in Leserichtung des cat-Gens   | Diessner<br>Isolation aus Klon: 2     |
| pKD3-Spel-tyrS-as            | Chloramphenicol Resistenz ( $Cm^R$ )<br>Ampicillin Resistenz ( $Amp^R$ )<br>Priming Sites, FRT Sites<br>tyrS entgegengesetzt der<br>Leserichtung des cat-Gens   | Diessner<br>Isolation aus Klon: 1     |
| pKD3-Spel-tyrS-<br>HisTag-s  | Chloramphenicol Resistenz ( $Cm^R$ )<br>Ampicillin Resistenz ( $Amp^R$ )<br>Priming Sites, FRT Sites<br>Template für PCR-Amplifikation der<br>Rekombinationssequenz mit HisTag<br>- Markersequenz im tyrS-Gen | Diessner<br>Isolation aus Klon: 2     |
| pKD3-Spel-tyrS-<br>HisTag-as | Chloramphenicol Resistenz ( $Cm^R$ )<br>Ampicillin Resistenz ( $Amp^R$ )<br>Priming Sites, FRT Sites  | Diese Arbeit<br>Isolation aus Klon: 1 |



|   |  |  |
|---|--|--|
| pKD46   | rep (oriR 101, temperatursensitive Replikation)<br>Ampicillin Resistenz ( <i>Amp<sup>R</sup></i> )<br>enthält $\gamma$ , $\beta$ und <i>exo</i> Gene für homologe Rekombination  | Datsenko und Wanner 2000               |
| pCP20   | rep (oriT temperatursensitive Replikation)<br>Chloramphenicol Resistenz ( <i>Cm<sup>R</sup></i> )<br>Ampicillin Resistenz ( <i>Amp<sup>R</sup></i> )<br>enthält Flipase-Rekombinase-Gen Promotor (thermal induzierbar) | Datsenko und Wanner 2000               |
| pMO-PSA-CTX   | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-PSA-CTX   | Fensterle <i>et al.</i> , 2008         |
| pMO-PSA-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element                   | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-PSA-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element   | Diessner<br>Isolation aus Klon: 2      |
| pMO-PSA-CTX- <i>tyrS</i> -<br>$\Delta$ IS2-Element    | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-PSA-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element<br>mit Komplementationskassette<br><i>tyrS</i> in Leserichtung des Plasmids                                       | Diessner<br>Isolation aus Klon: 3      |
| pMO-PSA-CTX- <i>tyrS</i> -<br>as $\Delta$ IS2-Element | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-PSA-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element<br>mit Komplementationskassette<br><i>tyrS</i> entgegen Leserichtung des Plasmids                                 | Diese Arbeit<br>Isolation aus Klon: 13 |

|  |  |                                       |
|--|--|---------------------------------------|
| pMO-PSA-CTX- <i>tyrS</i> -HisTag-s $\Delta$ IS2-Element  | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-PSA-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element<br>mit Komplementationskassette<br><i>tyrS</i> -HisTag-s  | Diessner<br>Isolation aus Klon: 1     |
| pMO-PSA-CTX- <i>tyrS</i> -HisTag-as $\Delta$ IS2-Element | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-PSA-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element<br>mit Komplementationskassette<br><i>tyrS</i> -HisTag-as | Diessner<br>Isolation aus Klon: 2     |
| pMO $\Delta$ IS2-Element                                 | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>$\Delta$ IS2-Element   | Diessner<br>Isolation aus Klon: 32    |
| pMO-CTX $\Delta$ IS2-Element                             | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element   | Diese Arbeit<br>Isolation aus Klon: 2 |
| pMO-CTX- <i>tyrS</i> -s $\Delta$ IS2-Element             | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element<br>mit Komplementationskassette<br><i>tyrS</i> -s             | Diese Arbeit<br>Isolation aus Klon: 4 |
| pMO-CTX- <i>tyrS</i> -HisTag-s $\Delta$ IS2-Element      | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> )<br>Fusionsprotein Häm-CTX<br>$\Delta$ IS2-Element<br>mit Komplementationskassette<br><i>tyrS</i> -HisTag-s      | Diessner                              |
| pMO-CTX-B-Raf  | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ),<br>Kinase Dead   | Diese Arbeit                          |

|   |  |                             |
|---|--|-----------------------------|
| pMO-CTX-B-Raf /<br>Sall-TyrS HisTag<br>sense                      | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ) | Diese Arbeit<br>Klon 6      |
| pMO-CTX-B-Raf /<br>Sall-TyrS HisTag<br>reverse                    | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ) | Diese Arbeit<br>Klon 1      |
| pMO-CTX-PSA /<br>Sall-TyrS HisTag<br>sense                        | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ) | Diese Arbeit<br>Klon 58     |
| pMO-CTX-PSA /<br>Sall-TyrS HisTag<br>reverse                      | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ) | Diese Arbeit<br>Klon 50     |
| pMO-CTX / Spel-<br>lacZ-TyrS sense                                | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ) | Diese Arbeit<br>Klon 23, 24 |
| pMO-CTX / Spel-<br>lacI-TyrS HisTag<br>$\Delta$ IS2-Element sense | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ) | Diese Arbeit<br>Klon 21     |
| pMO-CTX-PSA /<br>Spel-lacI-TyrS<br>HisTag sense                   | Kanamycin Resistenz ( <i>Kan<sup>R</sup></i> ) | Diese Arbeit<br>Klon 11, 18 |

## 2.5. Primer

| Bezeichnung    | Sequenz   | Verwendungszweck   |
|----------------|---|--|
| slyB-real-for  | 5'-GGG-TTT-TAT-TCA-TTG-CGC-TCT-GG-3'                  | Real Time PCR  |
| slyB-real-rev  | 5'-GAT-TCC-TCG-GCA-ACA-CTA-TCG-3'                     | Real Time PCR  |
| HlyB-real-for  | 5'-ATT-TAC-TGG-CGC-TAC-CGA-TCT-C-3'                   | Real Time PCR  |
| Hly-B-real-rev | 5'-GAT-GTT-AAT-GCC-TGT-CCT-GTC-AG-3'                  | Real Time PCR  |
| srfl-PSA-for   | 5'-GTG-GGA-GGC-TGG-GAG-TGC-GAG-AAG-3'                 | Herstellung und Nachweis des PSA-Fragmentes                            |
| PSA-srfl-rev   | 5'-GGG-GTT-GGC-CAC-GAT-GGT-GTC-CTT-G-3'               | Herstellung und Nachweis des PSA-Fragmentes                            |
| Sall-TyrS-for  | 5'-AAA-AAA-GTC-GAC-GTT-CCC-TGT-A?A-AAA-ACC-AGG-GGG-3' | Herstellung und Nachweis des Sall-TyrS-Fragmentes                      |
| Sall-TyrS-rev  | 5'-TTT-TTT-GTC-GAC-GTA-AAT-TCC-TGG-AGC-TGA-AGC-AGA-3' | Herstellung und Nachweis des Sall-TyrS-Fragmentes                      |
| TyrS-rev       | 5'-CTC-GTC-TGG-TTC-ACG-GTG-AAG-AAG-3'                 | Nachweis der Integration der TyrS-Cm-Kassette in <i>S. typhimurium</i> |
| pMO-Hly-for    | 5'-AGC-TGA-AAT-GAT-TTT-GCT-GAT-3'                     | Screening  |

|                     |   |   |
|---------------------|---|---|
| pMO-Hly-rev         | 5'-CTG-CAG-TCT-GCA-AAG-CAA-TCC-3'                     | Screening   |
| lacI-Prom-for       | 5'-AAA-AGT-CGA-CTA-GTG-CTA-GCG-ACA-CCA-TCG-AAT-GGC-3' | Herstellung des lacI-TyrS-Fragmentes  |
| lacI-term-rev       | 5'-AAA-AAA-GTC-GAC-TAG-TGG-CAA-AAT-GCC-GCC-AGC-3'     | Herstellung der Fragmente: lacI-TyrS, lacZ-TyrS, ara-BAD-TyrS-Fragmentes; Screening |
| lacI-term-rev-short | 5'-AAA-AAA-GTC-GAC-TAG-TGG-TAC-CAA-AAT-GCC-GCC-AGC-3' | Screening; Sequenzierung  |
| pMO-Sall-Site-for   | 5'-GCT-CAA-CGG-CCT-CAA-CCT-ACT-ACT-G-3'               | Screening; Sequenzierung  |
| pMO-Sall-Site-rev   | 5'-GTC-ATA-AGT-GCG-GCG-ACG-ATA-GTC-ATG-3'             | Screening; Sequenzierung  |
| para-BAD-for        | 5'-AAA-AGT-CGA-CTA-GTG-CTA-GCC-ATT-CAG-AGA-AGA-AAC-3' | Herstellung des paraBAD-Fragmentes  |
| para-BAD-rev        | 5'-CTC-CAT-GTA-TAT-AAC-GAC-TGC-ACC-TTT-GCG-GCC-GCT-3' | Herstellung des paraBAD-Fragmentes  |
| ara-BAD-TyrS-for    | 5'-CGC-AAC-TCT-CTA-CTG-TTT-CTC-CAT-AAA-GTC-GTG-TAG-3' | Herstellung des ara-BAD-TyrS-Fragmentes   |
| lacZ-for-short      | 5'-AAA-AGT-CGA-CTA-GTG-CTA-GCG-CTC-ACT-CAT-TAG-GCA-3' | Nachweis von lacZ auf pMO; Sequenzierung  |

|                   |   |  |
|-------------------|---|--|
| lacZ-Prom-for     | 5'-AAA-AGT-CGA-CTA-GTG-CTA-GCG-CTC-ACT-CAT-TAG-GCA-3' | Herstellung und Nachweis des lacZ-TyrS-Fragmentes                      |
| pdxH-Typhimur-for | 5'-GTA-CCA-GCG-TAT-TGT-GTT-GCT-CAA-GC-3'              | Nachweis der Integration der TyrS-Cm-Kassette in <i>S. typhimurium</i> |

## 2.6. Enzyme

| Enzym                     | Hersteller     |
|---------------------------|----------------|
| <i>Taq</i> -Polymerase    | NEB, Genecraft |
| <i>Pfu</i> -Polymerase    | Stratagene     |
| <i>Phu</i> -Polymerase    | Finnzymes      |
| T4-Ligase                 | MBI Fermentas  |
| <i>Sall</i> -Endonuklease | Fermentas      |
| <i>SpeI</i> -Endonuklease | Fermentas      |
| <i>SrfI</i> -Endonuklease | Stratagene     |
| <i>PstI</i> -Endonuklease | Fermentas      |
| <i>DpnI</i> -Endonuklease | Fermentas      |
| <i>PNK</i> -Kinase        | Fermentas      |

## 2.7. Antikörper

| Antikörper  | Hersteller          |
|---|---------------------|
| Rabbit anti-HisTag antibody                               | New England Biolabs |
| Polyclonal rabbit anti-Cholera Toxin (beta subunit) IgG   | Zytomed             |
| Rabbit anti-Hemolysin antibody                            | Immuno Globe        |
| Polyclonal rabbit anti-Prostate-specific antigen antibody | Dako Cytomation     |

## 2.8. Kulturmedien und Antibiotika

### 2.8.1. LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

10 g Select-Peptone 140  
5 g Hefe Extrakt  
10 g Natriumchlorid  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

### 2.8.2. 2YT-Medium

16 g Select-Peptone 140  
10 g Hefe Extrakt  
10 g Natriumchlorid  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

### 2.8.3. BHI-Medium

37 g Brain-Heart-Infusion  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

#### **2.8.4. Antibiotika**

Falls erwünscht wurde den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf 50°C entsprechende Antibiotikallösungen zugesetzt.

| <b>Antibiotikum</b> | <b>Stocklösung</b> | <b>Endkonzentration in<br/>Medium</b> |
|---------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Ampicillin          | 100 mg/ml          | 100 µg/ml                             |
| Kanamycin           | 25 mg/ml           | 25 µg/ml                              |
| Chloramphenicol     | 20 mg/ml           | 20 µg/ml                              |
| Chloramphenicol     | 5 mg/ml            | 5 µg/ml                               |

Alle Medien wurden 20 min lang bei 121 °C autoklaviert.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden den LB bzw. BHI Flüssigmedien 13 g Agar zugegeben und nach dem Autoklavieren in Plastikschaalen gegossen.

#### **2.9. Chemikalien**

| <b>Substanz</b>                   | <b>Hersteller</b> |
|-----------------------------------|-------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid 40 %       | BioRad            |
| Agarose                           | Applichem         |
| AgarAgar                          | Applichem         |
| Ampicillin                        | Sigma             |
| Brain Heart Infusion (BHI) Medium | Difco             |



|  |               |
|--|---------------|
| Chloramphenicol  | Sigma         |
| Desoxynukleotide (dNTPs)                               | MBI Fermentas |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                | Sigma         |
| DNA–Leiter 1kB   | Invitrogen    |
| ECL <sup>T</sup> M Western Blotting Detection Reagents | Amersham      |
| Ethanol  | Applichem     |
| Ethanol, zur Analyse                                   | Roth          |
| Ethidiumbromid   | Roth          |
| Glyzerol   | Sigma         |
| Kanamycin  | Sigma         |
| Ladepuffer DNA   | AppliChem     |
| LB Broth Base Medium                                   | Sigma         |
| Magermilchpulver                                       | AppliChem     |
| Mercaptoethanol  | Sigma         |
| Natriumchlorid   | AppliChem     |
| PBS  | Applichem     |

|                |            |
|----------------|------------|
| Ponceau S      | Sigma      |
| Protein-Leiter | Invitrogen |
| SDS            | Roth       |
| TBE-Puffer     | AppliChem  |
| TEMED          | Sigma      |
| Tween-20       | Sigma      |

## **2.10. Kits**

| <b>Kit</b>                    | <b>Hersteller</b> |
|-------------------------------|-------------------|
| QIAquick Gel Extraction Kit   | QIAGEN            |
| QIAquick PCR Purification Kit | QIAGEN            |
| Spin Miniprep Kit             | QIAGEN            |

## **3. Methoden**

### **3.1. Umgang mit Bakterien**

#### **3.1.1. Sterilisation von Kulturmedien und Geräten**

Alle Geräte, sowie die für die Aufzucht von Bakterien benötigten Nährlösungen wurden bei 120 °C für 20 min lang autoklaviert. Für selektive Kulturagarplatten wurde das entsprechende Antibiotikum nach steriler Filtration und Abkühlung auf 50 °C unter sterilen Bedingungen beigemischt.

#### **3.1.2. Herstellung von Glycerinkulturen**

Von einer frisch ausgestrichenen Bakterien-Kolonie wird zunächst eine Übernachtkultur angelegt. Bakterien dieser Kultur werden am nächsten Tag mit einer Glycerinlösung gemischt und anschließend sowohl bei -20 °C als auch bei -80 °C in einem sterilen Gefäß (Kryo-Küvette) tiefgefroren. Die Konzentration von Glycerin in der Mischung soll 20 % betragen. Wegen der Problematik 100 % Glycerin exakt zu pipettieren wird eine 80 % Glycerinlösung in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> verwendet. Daraus ergibt sich eine Mischung von 333 µl Glycerinlösung und 1000 µl Übernachtkultur.

#### **3.1.3. Bakterienaufzucht in Flüssigmedien**

Bakterien wurden in LB-, BHI- oder zweifach konzentriertem YT-Medium kultiviert.

Um eine Übernacht-Flüssigkultur mit Bakterien herzustellen, wurde mit einer sterilen Impföse eine Einzelkolonie von einer Agarplatte genommen und in ein steriles Flüssigmedium gebracht. Bei Bakterienkolonien, die über eine Antibiotikaresistenz verfügten, wurde das Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

Die Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur wurde nach Bedarf variiert. Das Wachstum erfolgte in einem Schüttler bei 180 rpm.

### **3.1.4. Bakterienaufzucht auf Kulturagarplatten**

Für die Anfertigung von Verdünnungsreihen, Einzelausstrichen und das gezielte Picken von Bakterienkolonien müssen Bakterien auf Kulturagarplatten gezüchtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Stämme auf BHI- und LB-Agarplatten kultiviert. Falls ein Wachstum der Bakterien unter Antibiotikaselektionsdruck nötig war, wurden Agarplatten verwendet, bei deren Herstellung entsprechende Antibiotika zugesetzt worden sind. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank. Nach Bedarf wurde Temperatur und Dauer variiert.

### **3.1.5. Herstellung elektrokompetenter Zellen**

Elektrokompetente Zellen sind in der Lage bei einer Elektroporation freie DNA-Fragmente oder Plasmid-DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Bei der Entwicklung des Balanced Lethal Systems wurden Bakterien mit dieser Fähigkeit mehrfach benötigt.

Es wurden sowohl elektrokompetente *E. coli* als auch elektrokompetente *Salmonella*-Stämme nach folgendem Verfahren hergestellt:

#### **1. Bakterienaufzucht**

Es wird zunächst eine Bakterienübernachtskultur hergestellt. Am nächsten Tag wird LB bzw. 2YT-Medium im Verhältnis 1 : 50 mit der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 kultiviert.

#### **2. Bakterienkonzentration**

Die sich nun in der log-Phase befindende Kultur wird 20-30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C und 4000 rpm für 20-30 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

#### **3. Waschen der Zellen**

Das entstandene Bakterienpellet wird mit 1 ml eiskalter 10 % Glycerinlösung resuspendiert und anschließend mit derselben Lösung auf 50 ml aufgefüllt.

Daraufhin erfolgt eine 20 min lange Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm. Der beschriebene Waschschrift wird zweimal wiederholt. Bei der ersten Wiederholung wird das resuspendierte Pellet auf 20 ml, bei der zweiten Wiederholung auf 10 ml Gesamtansatz aufgefüllt.

#### **4. Aliquotierung**

Die so erhaltenen elektrokompetenten Zellen werden schließlich mit 10 % Glycerinlösung resuspendiert und als 100 µl Aliquots bis zur Elektroporation bei -80 °C gelagert.

Es wurden bei der Herstellung in der Regel 200 ml Bakterienkultur der optischen Dichte 0,6-0,8 auf 2 ml gewaschene Zellen ankonzentriert. Um eine hohe Elektrokompetenz der Zellen zu erreichen ist darauf zu achten, dass alle Arbeitsschritte auf Eis ausgeführt werden, und die Verarbeitung zügig durchgeführt wird.

### **3.2. Molekulargenetische Methoden**

#### **3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA wurde in sehr vielen Arbeitsschritten benötigt. Um eine ausreichende Menge an DNA zu gewinnen wurde das QIAprep spin Miniprep Kit der Firma QIAGEN verwendet.

Grundlage dieser Methode ist eine modifizierte, alkalische Zellyse. Die freigesetzte chromosomale DNA wird selektiv denaturiert, während die zirkuläre Plasmid-DNA nicht beschädigt wird. Sie bindet dann an die Membran der Filtersäule. Um Verunreinigungen durch andere Zellbestandteile zu vermeiden und möglichst reine DNA zu gewinnen wird der Filter zunächst gewaschen. In einem letzten Schritt wird die gebundene Plasmid-DNA eluiert.

Die einzelnen Arbeitsschritte werden nun beschrieben:

## **1. Bakterienanzucht**

Bakterien, die Träger des zu gewinnenden Plasmids sind, werden in LB-Medium über Nacht inkubiert. Standardgemäß wurde eine Menge von 30-50 ml Medium angeimpft.

## **2. Bakterienkonzentration**

Von der Übernachtskultur wurden drei- bis viermal 6 ml bei 14.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das so gewonnene Pellet weiter verwendet.

## **3. Zellyse**

Das Pellet wird in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und dann mit 250 µl Puffer P2 vorsichtig gemischt, dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert. Nach 4 min wird durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 und vorsichtigem Schütteln das Lysat neutralisiert.

## **4. Abzentrifugation von Zelldetritus**

Der Ansatz wird 10 min lang bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Danach befindet sich die Plasmid-DNA im Überstand, während die restlichen Zellbestandteile und die chromosomale DNA ein Pellet bilden.

## **5. Adsorption von Plasmid-DNA**

Der Überstand wird auf eine QIA prep Spin Miniprep-Säule pipettiert und dann 1 min abzentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Der Vorgang kann wiederholt werden, gerade bei low-copy-Plasmiden oder falls eine hohe DNA-Konzentration erwünscht ist.

## **6. Inaktivierung von Nukleasen**

Die Filtermembran wird mit 500 µl PB-Puffer gewaschen und erneut 1 min abzentrifugiert, um eventuell vorhandene Nukleasen zu entfernen.

## **7. Waschen der Membran**

Es werden 750 µl PE-Puffer auf die Filtermembran pipetiert und dann zweimal abzentrifugiert, um Reste von Alkohol und Puffer gründlich zu entfernen. Der Durchfluss wird verworfen.

## **8. Elution**

Um die adsorbierte DNA wieder zu lösen wird auf die Membran 30-50 µl Elutionspuffer oder destilliertem H<sub>2</sub>O pipetiert. Um den Lösungsvorgang zu verbessern wird der Filter 10 min bei 50 °C inkubiert.

## **9. DNA-Gewinnung**

In einem letzten Schritt wird die Filtersäule in ein neues Eppendorff-Cap abzentrifugiert. Im Durchfluss befindet sich nun die gewünschte Plasmid-DNA.

### **3.2.2. DNA-Aufreinigung**

DNA wurde sowohl aus PCR-Ansätzen und aus Restriktionsansätzen als auch aus Agarosegelen aufgereinigt.

#### **a) aus PCR- und Restriktionsansätzen**

Um DNA-Fragmente aus Reaktionen mit Enzymbeteiligung weiterverarbeiten zu können, müssen sie zunächst von Enzymen, wie z. B. einer DNA-Polymerase oder Restriktionsenzymen und Salzen aus den entsprechenden Pufferlösungen befreit werden. Diese Störfaktoren können nachfolgende Anwendungen der PCR-Produkte beeinträchtigen oder gar unmöglich machen.

Für die Aufreinigung von PCR-Reaktionen und Verdauungsansätzen wurde das Spin PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet.

Auch hier spielt, wie bei der Aufreinigung von Plasmid-DNA, eine Filtermembran die zentrale Rolle. Die DNA-Fragmente binden in einem bestimmten Salzmilieu, das durch den PE-Puffer geschaffen wird, an eine spezielle Silicat-Membran. Reste von Enzymen, Nukleotidtriphosphaten, Primer und Puffermedien binden nicht und werden durch Zentrifugation entfernt.

Nachdem auch die restlichen Salze entfernt wurden, kann nun die reine DNA in einer beliebigen Menge Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  eluiert werden.

Die einzelnen Arbeitsschritte werden nun beschrieben:

### **1. Einstellung DNA-Bindeverhältnisse**

DNA-Ansatz und PB-Puffer werden in einem Verhältnis 1 : 5 gemischt; z. B. 30  $\mu\text{l}$  DNA + 150  $\mu\text{l}$  PB-Puffer

### **2. DNA-Bindung**

Das DNA/Puffer-Gemisch wird auf die QIAquick spin Säule pipetiert, abzentrifugiert (14.000 rpm) und der Durchfluss entfernt.

### **3. Waschen der Membran**

Die Silicat-Membran wird mit 750  $\mu\text{l}$  PE-Puffer gewaschen und 1 min lang abzentrifugiert. Der Durchfluss wird wieder verworfen.

### **4. Entfernung des Restalkohols**

Um das restliche Ethanol zu entfernen wird noch mal für 2 min zentrifugiert. Danach wird die Säule in ein neues 1,5 ml Cap gestellt.

### **5. Lösung der DNA**

Um die auf der Silicat-Membran gebundene DNA zu eluieren werden auf die Mitte der Membran 30-50  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  pipetiert. Danach wird die Säule bei 50 °C 10 min lang inkubiert. Dies soll die Elution optimieren.

### **6. DNA-Gewinnung**

In einem letzten Schritt wird die Säule bei 14.000 rpm in das 1,5 ml Cap abzentrifugiert. Im Durchfluss befindet sich nun reine DNA.



## **b) aus Agarosegelen**

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer molekularen Größe. Um ein Fragment bestimmter Größe zu isolieren schneidet man die entsprechende Bande aus dem Gel aus. Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN kann nun aus diesem aus diesem kleinen Stück Gel das gewünschte DNA-Fragment isoliert werden. Das weitere Verfahren entspricht prinzipiell der Aufreinigung von PCR-Ansätzen. Die einzelnen Arbeitsschritte:

### **1. Einstellung DNA-Bindeverhältnisse**

Das ausgeschnittene Gelstück wird mit der dreifachen Menge QG-Puffer versetzt und anschließend 10 min lang bei 50 °C inkubiert. Während des Erhitzens wird die Mischung gelegentlich gevortext bis das Gel vollständig aufgelöst ist und eine Gelbfärbung sich eingestellt hat.

### **2. DNA-Bindung**

Das DNA/Puffer-Gemisch wird auf die QIAquick spin Säule pipetiert, abzentrifugiert (14.000 rpm) und der Durchfluss entfernt.

### **3. Entfernung des Agarosegels**

Um Gelreste gänzlich zu entfernen werden 500 µl QG-Puffer auf die Membran pipetiert, 1 min abzentrifugiert und anschließend der Durchfluss verworfen.

### **4. Waschen der Membran**

Die Silicat-Membran wird mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und 1 min lang abzentrifugiert. Der Durchfluss wird wiederum verworfen.

### **5. Entfernung des Restalkohols**

Um das restliche Ethanol zu entfernen wird noch mal für 2 min zentrifugiert. Danach wird die Säule in ein neues 1,5 ml Cap gestellt.

## 6. Lösung der DNA

Um die auf der Silicat-Membran gebundene DNA zu eluieren werden auf die Mitte der Membran 30-50 µl Elutionspuffer oder H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> pipetiert. Danach wird die Säule bei 50 °C 10 min lang inkubiert. Dies soll die Elution optimieren.

## 7. DNA-Gewinnung

In einem letzten Schritt wird die Säule bei 14.000 rpm in das 1,5 ml Cap abzentrifugiert. Im Durchfluss befindet sich nun reine DNA.

### 3.2.3. Elektrophoretische DNA-Auftrennung

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um verschiedene Arten von Molekülen (z. B. DNA oder Proteine) zu trennen. Dabei wandert eine Mischung aus zu trennenden Molekülen unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Dabei wandern kleine, negativ geladene Moleküle (Anionen) am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode und positiv geladene Moleküle (Kationen) in Richtung der negativ geladenen Kathode. So wird eine Auftrennung nach Größe und Ladung ermöglicht.

#### a) Herstellung eines Agarosegels

Die gewünschte Menge TBE-Puffer (Tris-Borat-Puffer) wird mit Agarose gemischt (z. B. 200 ml TBE / 2 g Agarose). Die Menge an zugesetzter Agarose variiert entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Abschnitte. Bei kleinen DNA-Fragmenten wird mehr Agarose zugesetzt, um ein dichteres Molekularsiebnetzwerk zu erhalten. Das Gemisch wird für 2 bis 3 Minuten in der Mikrowelle gekocht, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind.

Unter ständigem Rühren mit dem Rührfisch lässt man die Lösung auf ca. 60°C abkühlen. Das flüssige Gel wird im Verhältnis 1 µl zu 10 ml Gel-Lösung mit Ethidiumbromid versetzt und gut vermischt.

Das Produkt wird in Gel-Schlitten gegossen und der Kamm für die Freihaltung der Geltaschen eingesetzt.

Nach Festwerden des Gels wird es als Gel-Platte aus den Schlitten entnommen und im Kühlschrank gelagert.

Das Ethidiumbromid, welches dem Gel beigemischt wurde, lagert sich bei der Gelelektrophorese in die Nukleinsäuresequenz ein und kann unter UV-Licht (254-366 nm) Bestrahlung zu einer Lichtemission von orange-rotem (590 nm) Licht angeregt werden. Durch die Konzentrierung des Farbstoffes in dem DNA-Strang ist eine Unterscheidung von dem im Gel gelöstem Ethidiumbromid leicht möglich.

## **b) Gelelektrophorese**

Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen werden sie mit Ladepuffer gemischt. Dem Ladepuffer ist ein sichtbarer Farbmarker beigemischt. Anhand der daraus entstehenden Farbfront kann entschieden werden, wann die Gelelektrophorese beendet wird.

Neben den Proben wird auch ein Massenstandard aufgetragen, um eine Abschätzung der Größe der getrennten DNA-Fragmente zu ermöglichen. Das beladene Gel wird in einer Elektrophoresekammer 30-50 min einer Spannung von 160-200 Volt ausgesetzt. Die Parameter müssen jedoch individuell an die Größe der Elektrophoresekammer angepasst werden. Es ist dabei darauf zu achten, dass die Taschen des Gels auf der Kathodenseite der Elektrophoresekammer zu liegen kommen und dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt ist.

Unter einer UV-Lampe können die gewanderten DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

## **c) Materialien**

### 1. Ethidiumbromidlösung

- 10 mg Ethidiumbromid (10 mg/ml)
- 1 ml Millipore

## 2. TBE-Puffer (10X) (Tris-Borat-Puffer)

- 108 g TRIS
- 55 g Borsäure
- 7,4 g Na<sub>2</sub> EDTA
- ad 1 l Millipore

## 3. DNA-Ladepuffer (10X)

- 250 mg Bromphenolblau
- 250 mg Xylencyanol
- 33 ml 150 mM Tris (pH 7,6)
- 60 ml Glycerin
- 7 ml Millipore

### **3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) lässt sich DNA spezifisch amplifizieren. Sie wurde 1983 von dem US-Amerikaner Kary Banks Mullis entwickelt; er erhielt 1993 den Nobelpreis für Chemie für diese Erfindung.

Das Verfahren findet breite Verwendung, zum Beispiel in Medizin, Biologie und Kriminalistik: diagnostischer Nachweis von Erreger-DNA in Blut, Tests auf Vorliegen von Erbkrankheiten, Klonierungen, Erstellung von genetischen Fingerabdrücken.

Um einen bestimmten DNA-Bereich vervielfältigen zu können muss man die Nukleotidsequenz vor und nach dem zu amplifizierenden Bereich kennen. Kurze DNA-Stränge, die komplementär zu diesen Bereichen sind heißen Primer. Sie stellen den Beginn der Synthese durch die DNA-Polymerase dar.

Weitere Komponenten eines PCR-Ansatzes sind:

- das **Template**, die Original-DNA, aus der ein bestimmter Bereich vervielfältigt werden soll
- eine **thermostabile DNA-Polymerase**, z. B. die Taq-Polymerase

- **Desoxyribonukleosidtriphosphate**, die Bausteine aus denen DNA besteht
- eine **Pufferlösung**, die das Milieu garantiert, in dem die Polymerase aktiv ist.

Ein PCR-Prozess besteht aus 30-50 Zyklen, die in einem Thermocycler stattfinden. Man unterscheidet 3 Schritte eines Zyklus:

### 1. Denaturierung

Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94-96 °C erhitzt, um die DNA-Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.

### 2. Annealing

Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2-3 °C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 und 65 °C. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann das dazu führen, dass die Primer sich nicht (Temperatur zu hoch) oder an falschen Stellen (Temperatur zu niedrig) an der Ausgangs-DNA anlagern.

### 3. Elongation

Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang in 5'-Richtung. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Die Temperatur hängt nun von der verwendeten DNA-Polymerase ab (zwischen 68 und 72 °C); die Zeit, die dieser

Schritt benötigt, ebenfalls von der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll. Am Ende des letzten Zyklus erfolgt eine zehnminütige Inkubationszeit, während der die Polymerase die noch unvollständigen DNA-Stränge fertig synthetisieren kann. Im Thermocycler wird die DNA dann bei 4 °C gekühlt, bis zur Herausnahme und Lagerung bei -20 °C. (Mullis K 1986; Saiki, Gelfand et al. 1988)

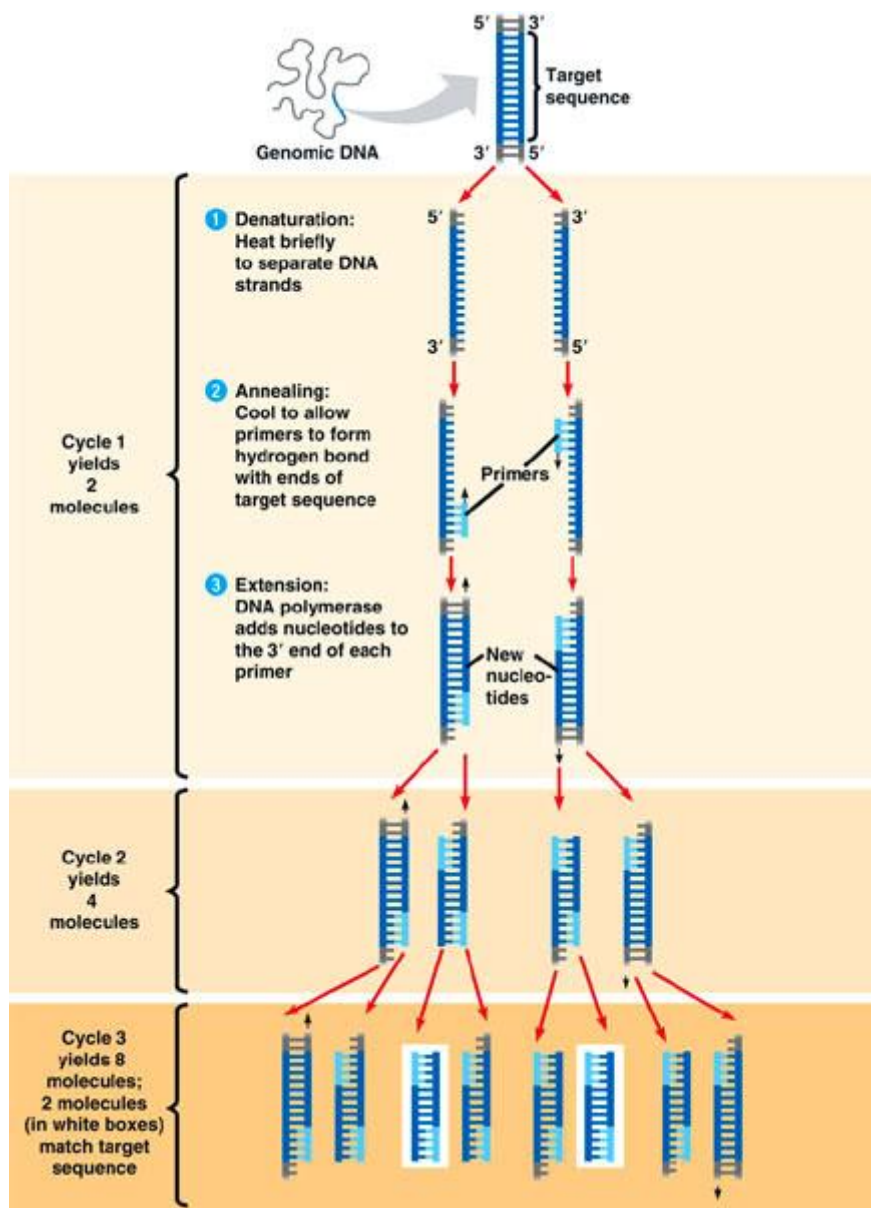


Abb. 3: Die 3 Schritte der PCR

### **3.2.4.1 Screening-PCR mittels Schnelllysat**

Die Methode, eine PCR mit Hilfe von Bakterienlysaten durchzuführen, bietet durch die Möglichkeit, mehrere Kolonien gleichzeitig zu untersuchen, eine effiziente und schnelle Art des „Vorscreenens“.

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Kolonien gepickt, diese zunächst, um sie für spätere Experimente zu sichern, auf einer neuen nummerierten Agarplatte ausgestrichen und anschließend in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert. Um die Bakterienzellen aufzubrechen, wurden die Ansätze 5-10 min bei 100-110 °C inkubiert, sofort auf Eis gestellt und anschließend kurz abzentrifugiert, um Zellbestandteile zu sedimentieren.

Die DNA befindet sich im Überstand und kann sofort für die PCR eingesetzt oder bei –20 °C gelagert werden.

4 µl des Lysat-Überstandes konnten anschließend in einen PCR-Ansatz eingesetzt werden.

Um größerer Mengen Kolonien zu überprüfen, wurden 10 Bakterienkolonien in einem Schnelllysat kumuliert und einzeln auf einer Agarplatte ausgestrichen. Ergab sich bei einem kumulierten Ansatz ein positives Ergebnis, so konnten die Bakterienkolonien anschließend einzeln überprüft werden.

#### **Ansatz für Screening-PCR (20 µl)**

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| 10x Puffer                        | 2 µl    |
| dNTPs                             | 0,2 µl  |
| Taq-Polymerase                    | 0,1 µl  |
| Primer A                          | 0,2 µl  |
| Primer B                          | 0,2 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 16,3 µl |

### **3.2.4.2 Real-Time-PCR (RT-PCR)**

Basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet die Real-Time-PCR (RT-PCR) zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung der zu amplifizierenden

DNA. Am Ende, bzw. während eines PCR-Zyklus wird die DNA-Menge mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen bestimmt. Dies ist möglich weil die Fluoreszenz proportional mit der DNA-Menge zunimmt. Eine Auftrennung mittels Gelelektrophorese ist nicht nötig, die Daten liegen sofort vor (Kubista, Andrade et al.)

### Ansatz Real-Time-PCR

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Mastermix                         | 10 µl |
| Primer A <sub>1</sub>             | 1 µl  |
| Primer A <sub>2</sub>             | 1 µl  |
| Template                          | 1 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 7 µl  |

### Verrechnung der Ergebniswerte

Theoretisch geht man bei der PCR von einer Amplifikation von  $2^n$  nach n-Zyklen aus. Den Exponenten stellt der Ct-Wert (logarithmisch) dar, dessen Threshold so gesetzt wird, dass nur die Phase der größten Amplifikation berücksichtigt wird.

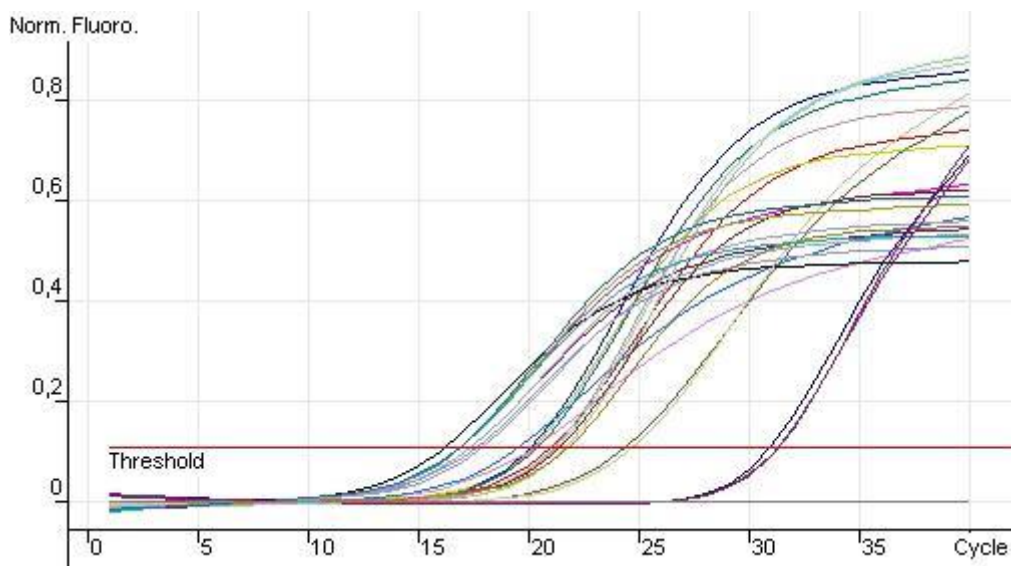


Abb. 4: Grafische Darstellung der DNA-Amplifikation einer RT-PCR



Es ergibt sich folgende Rechnung:

$$2^{Ct} = \text{DNA-Menge}$$

Die im ersten Rechenschritt ermittelten Einzelmengen lassen sich nach weiteren Verrechnungen grafisch darstellen und erlauben eine Aussage über das chromosomale und extrachromosomale Vorliegen der amplifizierten DNA-Sequenzen. Die mehrfach vorliegende Menge an Plasmid-DNA wird mit der einfach vorliegenden Menge an genomischer DNA verglichen. So kann eine relative Aussage über die Plasmidkopienzahl der getesteten Bakterienstämme getroffen werden.

### 3.2.5. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme sind bakterielle Proteine, die doppelsträngige DNA an ganz bestimmten Stellen schneiden. Diese Endonukleasen haben die Aufgabe Bakterien vor viraler DNA zu schützen. Damit die eigene DNA der Bakterien nicht auch geschnitten wird, liegt diese – im Gegensatz zur viralen – in methylierter Form vor und ist damit geschützt.

Bei dem Schneidevorgang entstehen zwei Enden. Diese können überlappend (sticky) oder glatt sein (blunt). Ein Beispiel für ein überlappend schneidendes Enzym ist EcoRI, blunt-ends fallen bei einem Verdau mit SmaI:



EcoRI



SmaI

Abb. 5: Schneideprinzip von EcoRI und SmaI

Die Nukleotid-Sequenz, die von den Restriktionsenzymen als Schnittstelle erkannt werden, sind Palindrome, das heißt ihre Sequenzen sind Punkt spiegelnd.

Die in der Molekularbiologie und Gentechnik eingesetzten Restriktionsenzyme sind Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Diese spalten die DNA innerhalb der Erkennungssequenz, benötigen kein ATP und haben keine Methylierungsfunktion.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme stammen von Fermentas.

Je nach vorhandener Star-Aktivität des Enzyms wurden die Restriktionsansätze bei 37 °C 2-18 h inkubiert. Um optimale Restriktionsergebnisse zu erzielen und die Star-Aktivität möglichst gering zu halten wurden jeweils die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet.

### **3.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Fragmente ligiert, die komplementäre 3'- bzw. 5'-Überhänge, so genannte „sticky ends“ (z. B. Sall), sowie glatte Ende, also „blunt ends“ (z. B. SrfI) besitzen.

Wird das zu integrierende DNA-Fragment „blunt end“ geschnitten, muss einer Ligation eine Behandlung mit dem Enzym PNK vorausgehen, da dieses die Enden phosphoryliert.

Komplementäre Enden von DNA-Sequenzen sind das Produkt eines Verdauens mit Restriktionsenzymen die kohäsive Enden erzeugen.

Werden in einem Ansatz die zu ligierenden DNA-Sequenzen zusammengegeben, so lagern sich die Enden aneinander. Es können sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen ausbilden. Durch Zugabe des Enzyms T4-DNA-Ligase werden kovalente Phosphodiester-Bindungen zwischen der freien 5'-Phosphatgruppe und der freien 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose geknüpft. Das Enzym benötigt für die Ligation Energie in Form von ATP.

Für die Integration von Nukleotid-Fragmenten in verdaute Vektorplasmide ist zunächst die Abspaltung der 5' Phosphatgruppe des Vektors empfehlenswert, um die Religation des gespaltenen Vektors zu verhindern. Für diesen Zweck

wird der Vektor-Restriktionsansatz mit dem Enzym Ciap (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas) behandelt:

Es werden 10 Units Ciap zu dem Restriktionsverdau gegeben und das Gemisch wird 30 min bei 37 °C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren wird der Ansatz für 15 min auf 85 °C erhitzt. Danach wird die DNA mittels Gelaufreinigung gewonnen und kann für die Ligation verwendet werden.

#### Standard-Ligationsansatz (20 µl)

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| T4-DNA-Ligase                     | 1 µl  |
| 10x Ligasepuffer                  | 2 µl  |
| Plasmid-DNA                       | 2 µl  |
| Fragment-DNA                      | 2 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 13 µl |

Vektor- und Fragmentanteil werden im Ligationsansatz so aufeinander abgestimmt, dass ein Mengenverhältnis von 1 zu 3-5 vorliegt. Schätzt man die Mengen visuell mittels Agarosegelelektrophorese ab, muss die Größe des Vektors bzw. des Fragments und die Konzentration der beiden Komponenten berücksichtigt werden und der Ansatz entsprechend variiert werden.

Die Ligationsansätze wurden 16 bis 48 h bei 16 °C inkubiert. Nach erfolgter Ligation von Vektor und zu integrierendem Fragment wird das Gemisch 15 min auf 65 °C erhitzt, um die Ligase wieder vom DNA-Strang abzulösen.

### **3.2.7. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien**

Für die Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen wurde die Elektroporation in folgenden Schritten verwendet.

#### 1. Inkubation

Elektrokompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut und anschließend für 45 Sekunden mit Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten inkubiert. In der Regel

wurden 100 µl Zellen mit bis zu 5 µl DNA gemischt. Anschließend wird das Inkubat in eiskalte Elektroporationsküvetten pipettiert.

## 2. Elektroporation

Die gefüllte Küvette wird im Elektroporator einer Spannung von 1,8 kV ausgesetzt. Die Pulsdauer sollte mindestens 4 ms betragen.

## 3. Zellwandregeneration und Expression der Antibiotikumresistenz

Nach erfolgtem Puls müssen die Bakterien sofort mit 1 ml nährstoffreichen Mediums versetzt werden. Anschließend erfolgt eine Zwischeninkubation der Zellen. In dieser Zeit wird die Antibiotikumresistenz ausgebildet, die die Bakterien durch Aufnahme des Plasmids erworben haben. Die Dauer variiert je nach Antibiotikumresistenz.

## 4. Ausplattieren

Die Zellen werden auf Agar-Platten ausplattiert, die je nach Bedarf verschiedene Antibiotika enthalten. Abschließend werden die Platten im Brutschrank inkubiert. Dauer und Temperatur wird je nach Bakterien und Transformations-DNA angepasst.

Für jede Elektroporation ist auch eine Negativkontrolle durchzuführen, bei der die Bakterien ohne Transformations-DNA elektroporiert werden. So kann eine eventuelle Kontamination überprüft werden.

### **3.2.8. Photometrische Messung**

#### a) von DNA-Konzentrationen

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration eines Ansatzes wurde dessen Absorption mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers in einer Küvette gegen einen Leerwert gemessen.

Zwei µl DNA-Lösung werden mit 98 µl Millipore gemischt und das Absorptionsverhalten bei 260 und 280 nm gemessen.

Aus der ermittelten Absorption bei 260 nm kann auf die DNA Konzentration geschlossen werden.

Durch das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  kann auf die Reinheit der DNA-Lösung geschlossen werden: Werte von 1,8 entsprechen reiner DNA. Liegt eine Proteinverunreinigung vor, so ist der  $OD_{260}/OD_{280}$ -Quotient kleiner als 1,8.

b) von Bakterienkulturdichte

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei wird 1 ml Bakterienkultur in eine spezielle Messküvette pipettiert und das Verhältnis der Absorption gegen das unbewachsene Nährmedium gemessen.

### **3.2.9. Sequenzierung von DNA**

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden im MSZ Würzburg durchgeführt.

Ein Sequenzierungsansatz setzt sich aus 1 µg DNA (z. B. 10 µl DNA-Ansatz der Konzentration 100 ng/µl), 1µl Sequenzierungsprimer der Konzentration 10 pmol/µl und Millipore (ad 14 µl) zusammen.

Bei dem durchgeführten Sequenzierungsverfahren konnten 400-700 Basenpaare abgelesen werden.

Die Ergebnisse wurden jeweils mit den bekannten DNA-Sequenzen auf die durchgeführten Modifikationen hin überprüft.

### **3.2.10 Synchroner Exzision des *tyrS*-Cm-Fragments aus dem Genom und Deletion der Kanamycin<sup>R</sup>-Kassette aus dem pMO-Plasmid**

Als Vorbereitung wurden elektrokompetente *S. typhi* Ty21a mit Cm-Integration und dem Plasmid pCP20, auf dem das Enzym Flipase codiert ist, hergestellt. In diese Zellen konnte im weiteren Verlauf jede Variante des pMO-Plasmids transformiert werden, um dann einen Stamm ohne chromosomales *tyrS*-Gen herzustellen.

Die nachfolgend beschriebene Methode wurde von Diessner etabliert:

1. Transformation des pMO-Plasmids in elektrokompetente S. t. Ty21a mit Cm-Integration und pCP20

Test auf das Vorhandensein beider Plasmide durch Selektion auf Amp-Kan-BHI-Platten bei 30 °C für 48 h. Die niedrige Temperatur ist nötig, um das hitzesensitive Plasmid pCP20 nicht zu verlieren

2. Übernachtskultur

Es werden 10-15 ml Amp-Kan-BHI-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

3. Temperatur-Shift

100 ml Amp-BHI-Medium werden mit 100 µl (die Volumina sind prinzipiell frei wählbar, wichtig ist nur das Verhältnis 1 : 1000) Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wird abwechselnd bei 37 °C und 30 °C inkubiert. Der Temperaturwechsel wird stündlich und insgesamt viermal vollzogen, d. h., die Kultur wird 8 h lang inkubiert.

4. Zweite Übernachtskultur

100 ml BHI-Medium werden mit 100 µl Shift-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5. Einzelklone

Um Einzelkolonien zu gewinnen wird eine Verdünnungsreihe angelegt. Die Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  bis  $10^{-8}$  werden auf BHI-Platten ausplattiert. Die Platten werden bei 37 °C 24 h lang inkubiert.

6. Nachweis der Resistenzverluste

Die aus 5. gewonnenen Einzelkolonien werden auf Amp-, Kan-, Cm- und BHI-Platten gepickt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Klone dürfen nur auf den BHI-Platten ohne Antibiotika wachsen.

## 7. PCR-Nachweis

Um den genomischen Knock-out von *tyrS* nachzuweisen kann man mit den Primern pdxY-reverse und pdxH-forward-neu das Chromosom überprüfen. Es ergibt sich ein chromosomales Restfragment von 900 Basenpaaren.

## 3.3. **Proteinanalytische Methoden**

### 3.3.1. **Proteinisolierung aus Bakterienüberstand**

Um nachzuweisen, dass bestimmte Proteine von Bakterien exprimiert und sekretiert werden, muss man diese Proteine aus dem sog. Überstand, das heißt aus dem Medium, in dem die Bakterien gezüchtet wurden, isolieren. Die isolierten Proteine werden dann im Western-Blot Verfahren mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

Die einzelnen Arbeitsschritte werden nun beschrieben:

#### 1. Bakterienaufzucht

Es werden 50 ml BHI- oder LB-Medium mit 1 ml (*E. coli*), bzw. 1,5 ml (*S. typhi*) Übernachtskulturen angeimpft. Das entspricht einem Verhältnis von 1 : 50, bzw. 1 : 33. Kultiviert wurde bei 30 °C oder 37 °C. Gegebenenfalls wird ein Antibiotikum dem Medium zugesetzt. In dieser Arbeit wurden Proteine aus Übernachtskulturen sowie aus Kulturen, die eine OD<sub>600</sub> von 1,0 aufwiesen isoliert.

#### 2. Gewinnung des Überstandes

25 ml der Bakterienkultur werden für 1 h bei 4.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. 20 ml des Überstandes werden vorsichtig in ein neues Greiner-Tube überführt, das Bakterienpellet wird verworfen.

### 3. Proteinfällung

Die 20 ml Überstand werden mit 2 ml Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) versetzt und über Nacht auf Eis bei 4 °C inkubiert.

Das Gemisch wird 40 min lang bei 4.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und verworfen.

Das zurückbleibende Pellet wird in 1 ml Aceton gelöst und wiederum unter genannten Bedingungen abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Greiner-Tube mit Pellet wird für 30 min offen getrocknet.

### 4. Aufnahme in Lämmli-Puffer

Die Proteine befinden sich nun an der Wand des Greiner-Tubes. Sie werden in 200 µl 2x-Lämmli-Puffer gelöst. Sobald eine Gelbfärbung eintritt werden 20 µl 3 M Tris HCl hinzugefügt.

### 5. Denaturierung

Die Proteine werden für 10 min bei 100 °C aufgeköcht und danach bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.2. Proteinisolierung aus Bakterienpellet**

Um zelluläre Proteine von Bakterien nachzuweisen muss man diese aus dem sog. Bakterienpellet isolieren. Die isolierten Proteine werden dann im Western-Blot Verfahren mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

Von der Kultur werden 2 ml 5 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 µl 2x-Lämmli-Puffer gelöst. Das Gemisch wird 10 min bei 100 °C gekocht und danach nochmals abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand enthält die zellulären Proteine.



### **3.3.3. Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS Page)**

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Proteinauftrennung nach molekularer Größe.

Die isolierten Proteine werden in Lämmli-Puffer gelöst und dann bei 100 °C 5 min lang gekocht um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen. Proteine sind nicht wie DNA linear negativ geladen, sondern können je nach Aminosäuresequenz unterschiedliche Gesamtladungen beider Vorzeichen besitzen. Das Natrium-Dodecylsulfat (SDS) ist negativ geladen und bindet an die Proteine. So wird die Eigenladung dieser Proteine durch übermächtige Negativladung maskiert. Des Weiteren werden die Proteine durch die SDS-Bindung denaturiert, das heißt die Sekundär- und Tertiärstrukturen werden zerstört. Damit liegen die Eiweiße linear vor und sind gleichmäßig negativ geladen. Um Neuausbildungen von Disulfidbrücken intra- und intermolekular zu verhindern ist dem Puffer  $\beta$ -Mercaptoethanol beigemischt.

Jetzt können die Proteine ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Ladung spielt keine Rolle mehr. Um nach der Elektrophorese eine Vorstellung von der Größe der aufgetrennten Proteine zu bekommen wird ein Proteinmarker mit auf das Gel aufgetragen.

Das Polyacrylamidgel ist zweischichtig und wird zwischen zwei Glasplatten gegossen, damit kein Sauerstoff an das Gel gelangt. Er würde die Polymerisation verhindern. Das obere Sammelgel dient lediglich der Aufnahme der Proben. In ihm befinden sich die Geltaschen. Den Großteil macht das Trenngel aus. In ihm werden die Proteine spezifisch aufgetrennt. Es wurde ausschließlich 10%-iges Trenngel verwendet. Die Probenmenge belief sich zwischen 15-50 $\mu$ l.

Es folgt die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel:

| Sammelgel | Lösungen                           | Trenngel  |
|-----------|------------------------------------|-----------|
| - 1,1 ml  | Acrylamid / Bisacrylamid (40%)     | - 5 ml    |
| - 7,55 ml | H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub> | - 12,1 ml |
| - 50 µl   | 0,2-SDS                            | - 100 µl  |
| - 10 µl   | TEMED                              | - 20 µl   |
| - 1,25 ml | 1M Tris pH 6,8   3M Tris pH 9,0    | - 2.5 ml  |
| - 100 µl  | APS                                | - 200 µl  |

In die Gelkammer wird das Gel senkrecht eingesetzt und mit 0,01-SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die angelegte Spannung beträgt 120 V. Aufgetrennt wird bis die blaue Lauffront aus dem Gel fließt und sich im SDS-Puffer verteilt. Nach der Elektrophorese können die Proteine mittels speziellen Färbungen oder immunologisch im Western-Blot nachgewiesen werden.

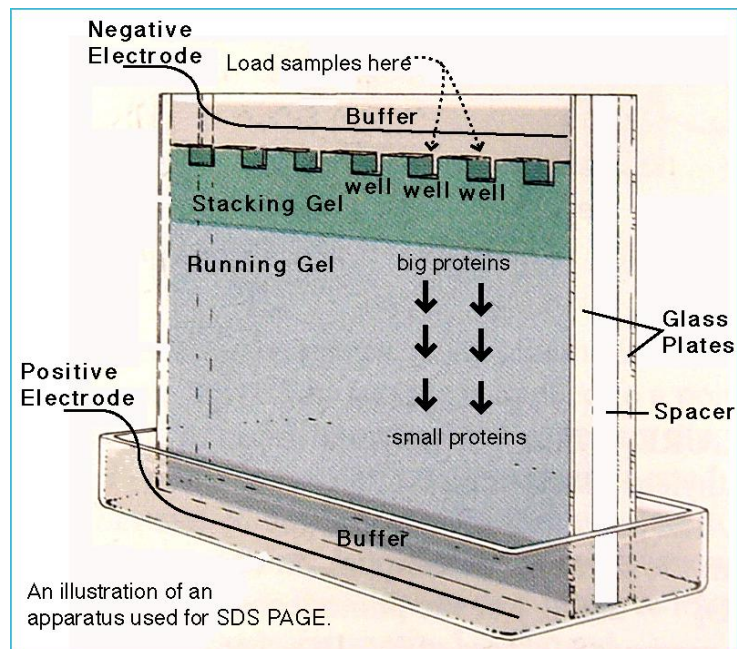


Abb. 6: Schematische Darstellung eines SDS-Page

### 3.3.4. Western-Blot

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine, können aus den Gelen auf Nitrozellulose geblottet werden, um dann mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht zu werden.

Die einzelnen Arbeitsschritte werden nun beschrieben:

#### 1. Waschen des Gels

Das Proteingel wird für 1 h in Towbin-Puffer eingelegt. Der nachfolgende Blottingvorgang setzt das Milieu des Puffers voraus.

#### 2. Semi-Dry-Blotting

Zwischen 2 Metallplatten wird ein „Sandwich“ aus Whatman-Papern, Nitrozellulose und Polyacrylamidgel geschichtet. Auf die untere Platte (Anode) werden 2 in Towbin-Puffer getränkte Whatman-Papers gelegt. Darauf kommt die Nitrozellulose, auf die wiederum das Gel und 2 weitere Whatman-Papers gelegt werden. Es ist entscheidend, dass eventuell entstandene Luftblasen sorgfältig ausgestrichen werden. Sie würden den Blotvorgang stark beeinträchtigen.

Auf den Sandwich wird schließlich die obere Metallplatte (Kathode) gepresst. Die angelegte Spannung beträgt 25 V. Geblottet wurde 1-1,5 h.

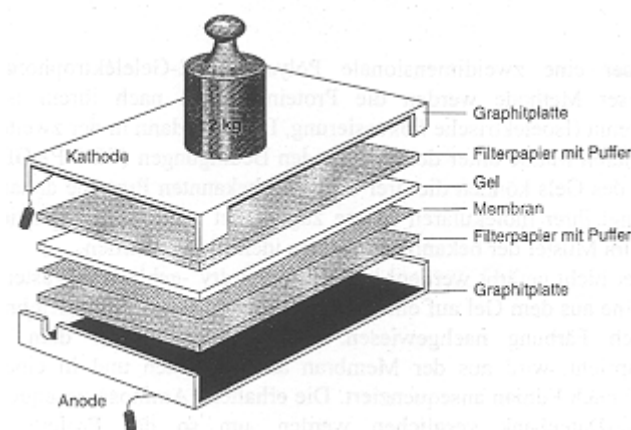


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Semi-Dry-Blots

### 3. Blocken

Nach dem Blotvorgang werden die Proteine, die sich jetzt auf der Nitrozellulosemembran befinden mit 0,05-Magermilchpulver-PBS-Lösung für mindestens 1 h geblockt. Dadurch soll verhindert werden, dass der primäre Antikörper später unspezifisch an freien Bindungsstellen auf der Membran bindet.

### 4. Inkubation mit Antikörper I

Über Nacht wird die Nitrozellulose mit dem ersten Antikörper bei 4 °C inkubiert.

### 5. Waschen der Nitrozellulosemembran

Im Anschluss an die erste Inkubation wird die Membran dreimal für je 30 min auf dem Schüttler mit PBS-Tween-Puffer gewaschen. So werden ungebundene Antikörper I entfernt.

### 6. Inkubation mit Antikörper II

Nach dem Waschvorgang wird die Membran für ca. 2 h mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser bindet an den Fc-Teil des Antikörper I. Mit Hilfe von Reagenzien kann eine funktionelle Gruppe, die kovalent an den Antikörper II gebunden ist, nachgewiesen werden.

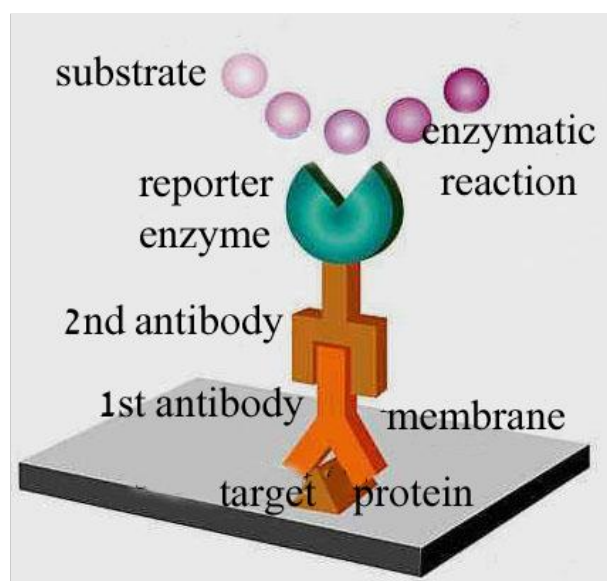


Abb. 8: Prinzip der Antikörperbindung mit nachfolgender Enzymreaktion

#### 7. Waschen der Nitrozellulosemembran

Genau wie nach der ersten Inkubation wird auch nach der zweiten dreimal 30 min mit PBS-Tween gewaschen. Ungebundene Antikörper II werden somit entfernt.

#### 8. Röntgenentwicklung

Nach dem Waschvorgang werden je 2 ml von zwei Entwicklungsflüssigkeiten auf die Membran gegeben. Unter Schütteln wird die Nitrozellulose 1 min inkubiert. Vorsichtig wird die Membran zwischen zwei Whatman-Papern getrocknet und anschließend in eine Entwicklungskassette eingelegt.

In der Dunkelkammer werden Röntgenfilme aufgelegt. Die Bestrahlung kann je nach Signalstärke von 10 s bis 30 min dauern. Gebundene Antikörper und somit das entsprechende Protein werden so detektiert.

## 4. Ergebnisse

Im Rahmen der Optimierung des Balanced Lethal Systems in *Salmonella typhi* Ty21a wurden mehrere Klonierungen vorgenommen. Um die Antigenexpression zu verbessern wurde zunächst die Insertionsstelle für die *tyrS*-Expressionskassette geändert. Danach wurde der wildtypische *tyrS*-Promotor durch *lacI*-Promotor ersetzt.

### 4.1. Klonierung der *tyrS*-HisTag-Expressionskassette in die Sall-Site

Es sollte getestet werden, ob die Wahl der Schnittstelle Einfluss auf die Antigenproduktion hat. Der erste Schritt ist die Herstellung eines DNA-Fragments mit Sall-Schnittstellen am Ende.

#### 4.1.1. Herstellung von pMO-CTX-PSA-Sall-*tyrS*-HisTag

Das Sall-P(wt)-*tyrS*-HisTag-Fragment für die Insertion in die Sall-Site wurde mittels PCR gewonnen.

##### PCR-Ansatz:

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Pfu-Puffer                        | 40 µl  |
| DMSO                              | 40 µl  |
| DNTPs                             | 4 µl   |
| Sall-TyrS-for                     | 4 µl   |
| Sall-TyrS-rev                     | 4 µl   |
| pKD3- <i>tyrS</i> -HisTag         | 4 µl   |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 300 µl |

Das Primer-Paar Sall-TyrS-for und -rev wurden für diese Arbeit entworfen. Es handelt sich um Primer, die an die *tyrS*-HisTag-Sequenz binden und ein überhängendes Ende besitzen, auf dem die Sall-Schnittstelle codiert ist. Das

entstehende DNA-Fragment umfasst somit den Wildtyppromotor, *tyrS*-HisTag und die *Sall*-Site.

Die Annealing-Temperatur betrug 50 °C und die Elongationszeit 4 min.

Nach Aufreinigung der DNA zeigte sich folgendes Bild in der Gelelektrophorese, die Länge des entstandenen Fragments beträgt 1.6 kb:

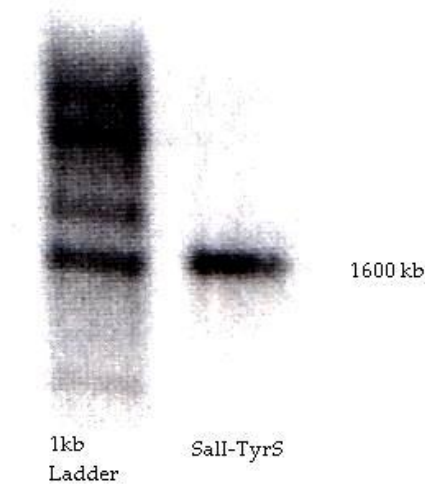


Abb. 9: DNA-Gelfoto von *Sall*-*tyrS*-Fragment

Danach wurden die Vektoren und das DNA-Fragment mit dem Restriktionsenzym *Sall* gespalten.

#### Restriktionsansatz für das PCR-Fragment

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| <i>Sall</i> - <i>tyrS</i> -HisTag | 30 µl |
| <i>Sall</i>                       | 2 µl  |
| O <sup>+</sup> -Puffer            | 4 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 4 µl  |

→ Inkubation bei 37 °C für 2 h

### Restriktionsansatz für das Plasmid

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| PMO-CTX-PSA (100 ng / $\mu$ l)    | 15 $\mu$ l |
| Sall                              | 1 $\mu$ l  |
| O <sup>+</sup> -Puffer            | 3 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 11 $\mu$ l |

→ Inkubation bei 37 °C über Nacht, anschließend zweifache Behandlung mit Ciap im Abstand von 30 min und DNA-Aufreinigung mittels Gelelektrophorese.  
Der Ansatz für pMO-CTX-Braf (70 ng /  $\mu$ l) ist identisch.

Im Anschluss wurden die Plasmide und das *tyrS*-Fragment aufgereinigt und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen:

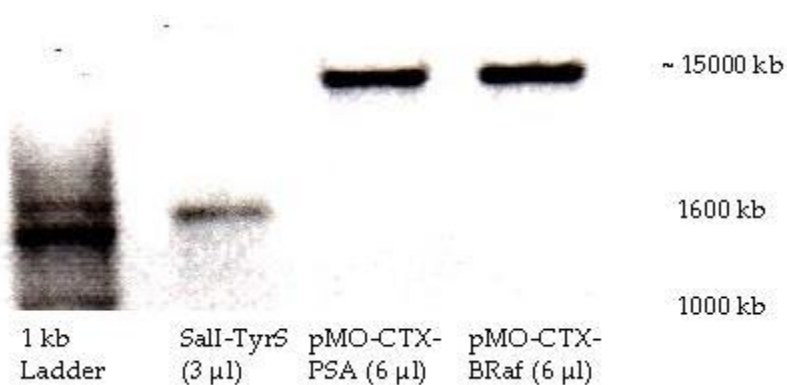


Abb. 10: DNA-Gelfoto von Sall-*tyrS*-Fragment und verdauten pMO-Plasmiden

Daraus ergaben sich folgender Ansatz für die Ligation:

### Ligationsansatz

|                                   |             |
|-----------------------------------|-------------|
| PMO-CTX-PSA / -Braf               | 6 $\mu$ l   |
| Sall- <i>tyrS</i> -Fragment       | 4,5 $\mu$ l |
| Ligase-Puffer                     | 2 $\mu$ l   |
| Ligase                            | 1 $\mu$ l   |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 6,5 $\mu$ l |



→ Inkubation bei 16 °C über Nacht, anschließend Hitzeinaktivierung von DNA-Ligase bei 65 °C für 10 min.

Die aufgereinigten Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5α elektroporiert. Danach wurden die Bakterien auf Kanamycin-Agarplatten ausgestrichen, sodass nur die Bakterien wuchsen, die das Plasmid aufgenommen hatten. Von den Stämmen wurde dann ein Schnelllysate hergestellt mit dem per PCR überprüft wurde, ob die Bakterien wirklich das Plasmid tragen. Als Primer wurden SalI-TyrS-for und SalI-TyrS-rev. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde durch Miniprep gewonnen und mittels PCR und Sequenzierung überprüft.

Das Plasmid pMO-CTX-PSA-Sall-tyrS-HisTag (sense) stellt sich schematisch wie folgt dar:

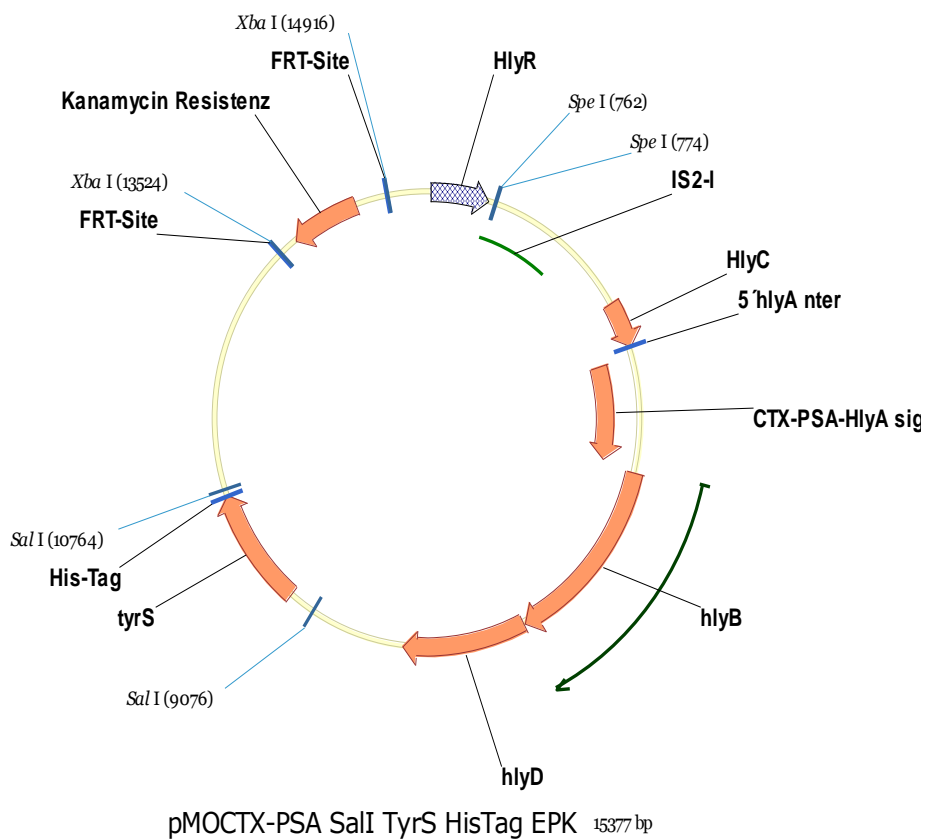


Abb. 11: Plasmidkarte von pMO-CTX-PSA-Sall-P<sub>WT</sub>-tyrS-HisTag EPK

Dieses Plasmid wurde in *S. typhi* Ty21a transformiert und anschließend die chromosomale *tyrS*-Cm-Kassette und die Kanamycin-Resistenz auf dem Plasmid mittels der Exzisionsmethode nach Diessner (Diessner 2010) deletiert.

#### 4.1.2. Proteinanalytische Untersuchungen

Mittels Western-Blot-Verfahren konnte die Expression mehrerer Proteine getestet werden. Das Produkt des *tyrS*-Gens wurde mit Hilfe des HisTag-Antikörpers nachgewiesen, für den Nachweis des Fusionsproteins standen mehrere Antikörper zur Verfügung: Anti-CTX, Anti-PSA und Anti-Hly.

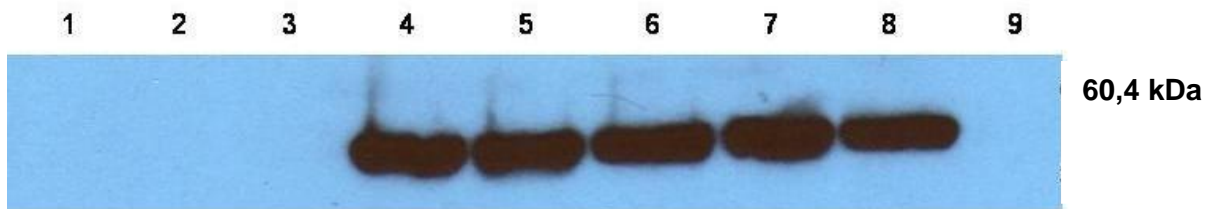


Abb. 12: Western-Blot Analyse der Expression von Tyrosyl-tRNA-Synthetase durch *S. typhi* in OD<sub>600</sub> 1,0-Kulturen. Inkubation mit Anti-HisTag-AK.

- |         |   |
|---------|---|
| Spur 1: | <i>S. typhi</i> Ty21a   |
| Spur 2: | pMO-CTX-PSA   |
| Spur 3: | pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (sense) Klon 60  |
| Spur 4: | pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (sense) Klon 57  |
| Spur 5: | pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (sense) Klon 58  |
| Spur 6: | pMO-CTX-BRaf-Sall-TyrS-HisTag (sense)   |
| Spur 7: | pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (antisense)  |
| Spur 8: | pMO-CTX-PSA-ΔIS2-Spel-TyrS-HisTag (sense)   |
| Spur 9: | pMO-CTX-PSA-ΔIS2-Spel-TyrS-HisTag (sense) mit TyrS-Cm- und Kan <sup>R</sup> -Deletion |

Mit diesem Proteingel wird das quantitative Vorkommen der Tyrosyl-tRNA-Synthetase nachgewiesen. Die Stämme mit Plasmiden, in denen die *tyrS*-

HisTag EPK in die Sall-Site integriert wurde, zeigen eine deutliche Bande, die bei ca. 48 kDa liegt.

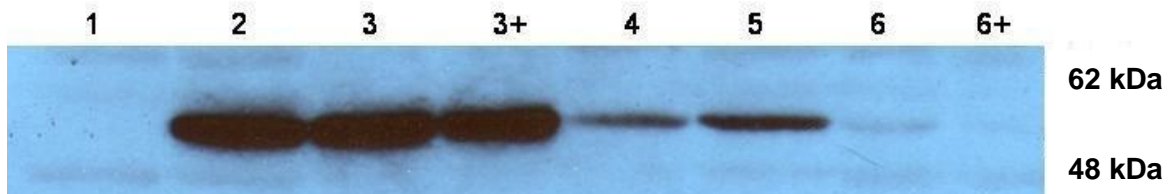


Abb.13: Western-Blot Analyse der Expression von Fusionsprotein von *S. typhi* in OD<sub>600</sub> 1,0-Kulturen. Inkubation mit Anti-Hämolysin-AK.

- Spur 1: *S. typhi* Ty21a  
 Spur 2: pMO-CTX-PSA  
 Spur 3: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (sense)  
 Spur 4: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (antisense)  
 Spur 5: pMO-CTX-PSA-ΔIS2  
 Spur 6: pMO-CTX-PSA-ΔIS2-Spel-TyrS-HisTag (sense)  
 + = Nährmedium mit 0,1% Galaktose

Der Röntgenfilm von Abbildung 13 zeigt das Vorhandensein des Fusionsproteins in dem die Bakterien umgebenden Medium (= Überstand). Der Salmonellenstamm mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag-sense (Spur 3) zeigt eine Bande, die mit der Größe der Bande der Positivkontrolle vergleichbar ist. Der Zusatz von Galaktose in das Nährmedium scheint keinen Effekt auf die Proteinsekretion zu haben. *Salmonella typhi* Ty21a mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag-antisense (Spur 4) zeigt eine geringere Bande. Bemerkenswert ist, dass die Deletion des IS2-Elements (Spur 5) zu einer deutlich geringeren Sekretion des Fusionsproteins führt im Vergleich zur Positivkontrolle.

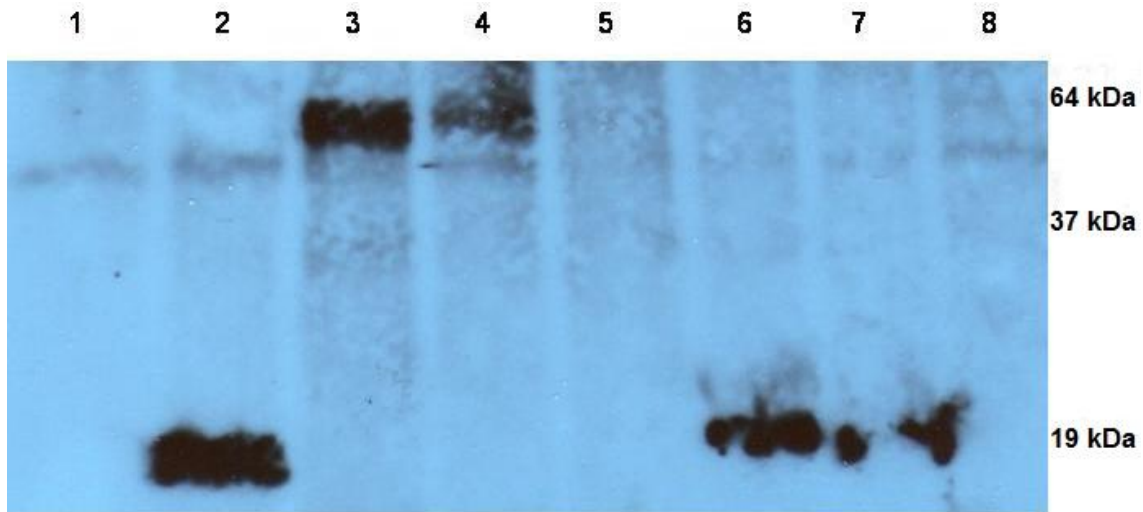


Abb.14: Western-Blot Analyse der Expression von Fusionsprotein durch *S. typhi* in OD<sub>600</sub> 1,0-Kulturen. Inkubation mit Anti-Hämolyisin-Ak.

- Spur 1: *S. typhi* Ty21a
- Spur 2: pMO-CTX
- Spur 3: pMO-CTX-PSA
- Spur 4: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag
- Spur 5: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (sense) mit TyrS-Cm- und Kan<sup>R</sup>-Deletion
- Spur 6: pMO-CTX-ΔIS2-Spel-lacI-TyrS-HisTag (sense) Klon 21
- Spur 7: pMO-CTX-ΔIS2-Spel-lacI-TyrS-HisTag (sense) Klon 8
- Spur 8: pMO-CTX-PSA-ΔIS2-Spel-TyrS-HisTag (sense)

Mit diesem Western-Blot wurde erstmals die deletierte Form des Stamms mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag-sense (Spur 5) getestet. Es konnte kein Fusionsprotein im Überstand detektiert werden. Spur 6 und 7 repräsentieren Vorstufen der neuen Klonierung mit dem lacI-Promotor, die im folgenden Teil ausführlich beschrieben wird. Die Größe des Fusionsprotein ist kleiner, weil PSA noch nicht ins Plasmid eingefügt ist, d. h. das Fusionsprotein nur aus CTX und der HlyA-Sequenz besteht.

## 4.2. Austausch des wildtypischen Promotors durch den lacI-Promotor

### 4.2.1. Herstellung von pMO-CTX-PSA-Spel-lacI-tyrS-HisTag

Der Klonierung lag die Überlegung zu Grunde, dass ein schwächerer Promotor zu einer höheren Plasmidkopienzahl führen und die Menge an synthetisiertem Fusionsprotein steigern könnte. Der Austausch des wildtypischen Promotors und Terminators von *tyrS* erfolgte durch eine PCR mit speziellen Primern. Die Primer lacI-prom-for und lacI-term-rev binden Nukleotide vor dem Startcodon der Tyrosyl-tRNA-Synthetase, jedoch so, dass der ursprüngliche Promotor und Terminator nicht amplifiziert werden. Stattdessen sind die Primer so gewählt, dass nur ein Teil auf dem Template bindet, der Überhang codiert den lacI-Promotor (lacI-prom-for) und den lacI-Terminator (lacI-term-rev). Wenn nun die DNA-Polymerase den Teil zwischen den Primern synthetisiert hat ist die Elongation noch nicht abgeschlossen. Es wird erst noch die überhängenden Primer-Enden abgelesen. Die Primerlänge von über 100 mer überstieg die Kapazität der Pfu- und Phusion-Polymerase, die erste Wahl sind, weil diese Enzyme über ein Proof-Reading verfügen. Es musste also die Taq-Polymerase verwendet werden, die zwar über kein Proof-Reading verfügt. Eine anschließende Sequenzierung zeigte, dass bei dem lacI-Promotor eine Basenaustauschdeletion in der -35-Region stattfand.

#### PCR-Ansatz:

|   |        |
|---|--------|
| 10x-Puffer                                | 45 µl  |
| Taq-Polymerase                            | 4,5 µl |
| dNTPs                                     | 4,5 µl |
| lacI-prom-for                             | 4,5 µl |
| lacI-term-rev                             | 4,5 µl |
| Template (pMO-CTX-PSA / Sall-TyrS HisTag) | 9 µl   |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>         | 378 µl |

Die Annealing-Temperatur betrug 50 °C und die Elongationszeit 4 min.

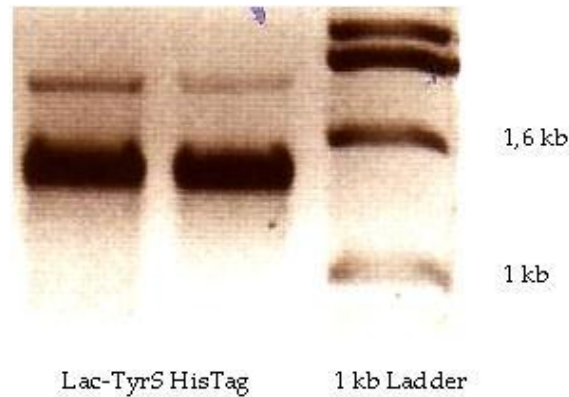


Abb. 15: DNA-Gelfoto von lacI-TyrS-HisTag

Das lacI-tyrS-Fragment wurde zuerst in das Plasmid pMO-CTX integriert, das als Ausgangsplasmid für weitere Klonierungen wie z. B. pMO-CTX-PSA oder pMO-CTX-Braf dient. Dazu wurde das Plasmid und das Fragment zuvor mit dem Restriktionsenzym SpeI verdaut.

#### Restriktionsansatz für lacI-TyrS-HisTag

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| lacI-TyrS-HisTag                  | 15 µl |
| SpeI                              | 1 µl  |
| Tango-Puffer                      | 3 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 11 µl |

#### Restriktionsansatz für pMO-CTX-ΔIS2

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| pMO-CTX (IS2-Del)                 | 10 µl |
| SpeI                              | 1 µl  |
| Tango-Puffer                      | 3 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 16 µl |

→ Inkubation bei 37 °C für 2 h, anschließend zweifache Behandlung mit Ciap im Abstand von 30 min.

Nach dem Verdau des Plasmids und des PCR-Produkts wurden beide DNA-Strukturen miteinander ligiert:

### Ligationsansatz

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| pMO-CTX (IS2-Del)                 | 4 µl  |
| lacI-TyrS HisTag                  | 2 µl  |
| Ligase-Puffer                     | 2 µl  |
| T4 DNA Ligase                     | 1 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 11 µl |

→ Inkubation bei 16 °C über Nacht, anschließend Hitzeinaktivierung von DNA-Ligase bei 65 °C für 10 min.

Das PSA-Fragment musste noch in das Plasmid pMO-CTX integriert werden. Es wurde mittels PCR gewonnen.

### PCR-Ansatz

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| 10x-Puffer                        | 40 µl  |
| dNTPs                             | 4 µl   |
| Pfu-Polymerase                    | 4 µl   |
| SrfI-PSA-for                      | 4 µl   |
| PSA-SrfI-rev                      | 4 µl   |
| pMO-CTX-PSA / Sall-TyrS HisTag    | 4 µl   |
| DMSO                              | 40 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 292 µl |

Die Annealing-Temperatur betrug 50 °C und die Elongationszeit 4 min.

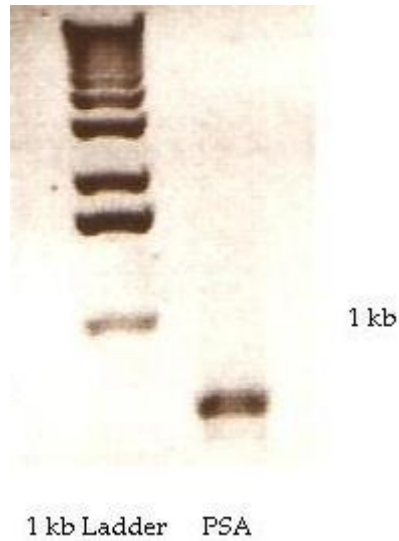


Abb. 16: DNA-Gelfoto von PSA-Fragment

Da es sich bei SrfI um ein „blunt end“-schneidendes Enzym handelt, musste das Fragment anschließend erst phosphoryliert werden. Hierzu wurde das Enzym PNK verwendet:

#### PNK-Ansatz

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| PSA-Fragment                      | 6 µl  |
| rATPs                             | 1 µl  |
| Puffer B                          | 2 µl  |
| PNK                               | 1 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 10 µl |

Nun musste das Plasmid mit SrfI gespalten werden, damit eine Ligation möglich wurde:

#### Restriktions-Ansatz für pMO-CTX / Spel-lacI-TyrS

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Plasmid                           | 10 µl |
| SrfI                              | 1 µl  |
| SrfI-Puffer                       | 2 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 7 µl  |



→ Inkubation bei 37 °C für 2 h, anschließend zweifache Behandlung mit Ciap im Abstand von 30 min

Im Anschluss wurden mehrere Ligationsansätze getestet, wobei der folgende am effizientesten war:

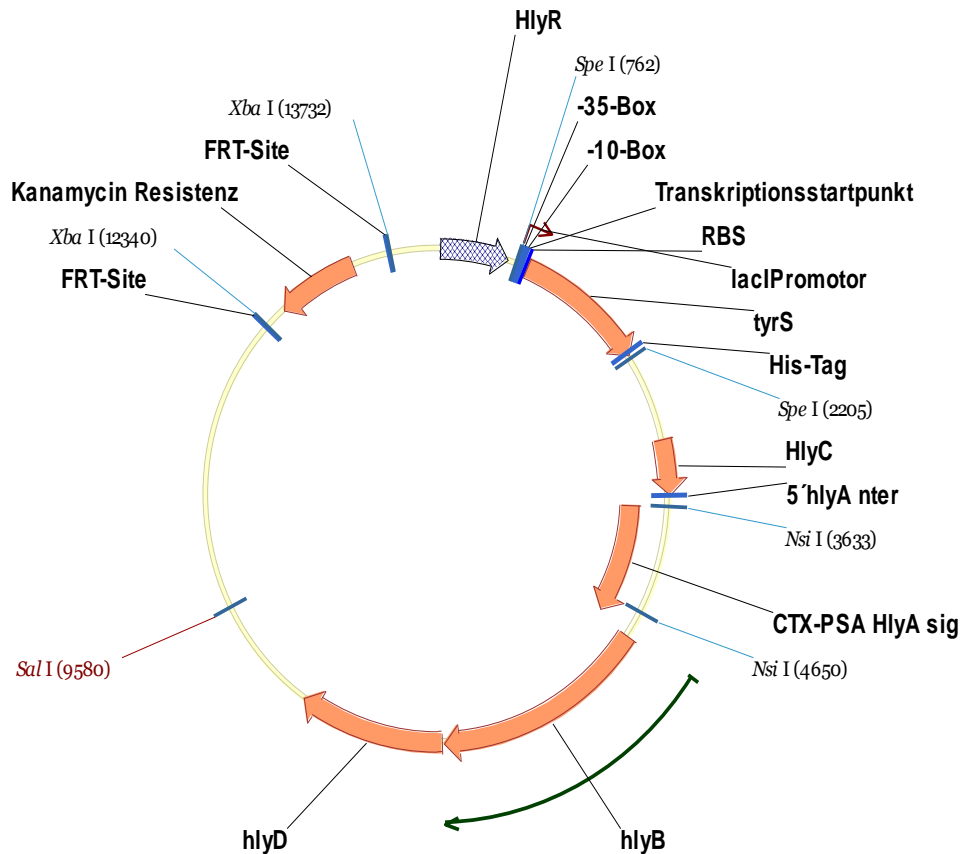
#### Ligationsansatz

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Plasmid                           | 3 µl  |
| Fragment                          | 6 µl  |
| Ligase-Puffer                     | 2 µl  |
| Ligase                            | 1 µl  |
| H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub> | 11 µl |

→ Inkubation bei 16 °C über Nacht, anschließend Hitzeinaktivierung von DNA-Ligase bei 65 °C für 10 min.

Die aufgereinigten Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5α elektroporiert. Danach wurden die Bakterien auf Kanamycin-Agarplatten ausgestrichen, sodass nur die Bakterien wuchsen, die das Plasmid aufgenommen hatten. Von den Stämmen wurde dann ein Schnelllysat hergestellt mit dem per PCR überprüft wurde, ob die Bakterien wirklich das Plasmid tragen. Als Primer wurden lacl-prom-for und lacl-term-rev. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde durch Miniprep gewonnen und mittels PCR und Sequenzierung überprüft.

Das Plasmid pMO-CTX-PSA ( $\Delta$ IS2) Spel-P<sub>lacl</sub>-TyrS-HisTag (sense) stellt sich schematisch wie folgt dar:



pMOCTX-PSA (IS2 Deletion) SpeI lacI TyrS Histag (Standard Terminator) EPK 14193 bp

Abb. 17: Plasmidkarte von pMO-CTX-ΔIS2-SpeI-P(lacI)-tyrS-HisTag

Dieses Plasmid wurde in *S. typhi* Ty21a transformiert und anschließend die chromosomale *tyrS*-Cm-Kassette und die Kanamycin-Resistenz auf dem Plasmid mittels der Exzisionsmethode nach Diessner deletiert.

#### 4.2.2. Proteinanalytische Untersuchungen

Die Expression der Tyrosyl-tRNA-Synthetase und des Fusionsantigens wurden analog zu 4.1.2 getestet.

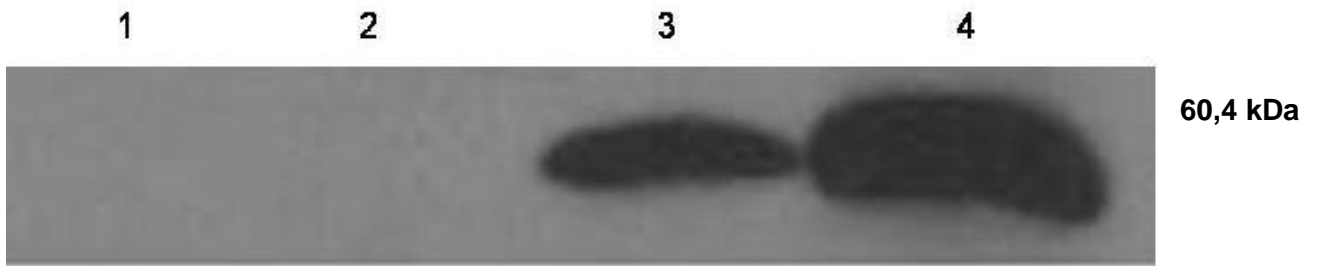


Abb. 18: Western-Blot Analyse der Expression von Tyrosyl-tRNA-Synthetase durch *S. typhi* in OD<sub>600</sub> 0,6-Kulturen. Inkubation mit Anti-HisTag-AK.

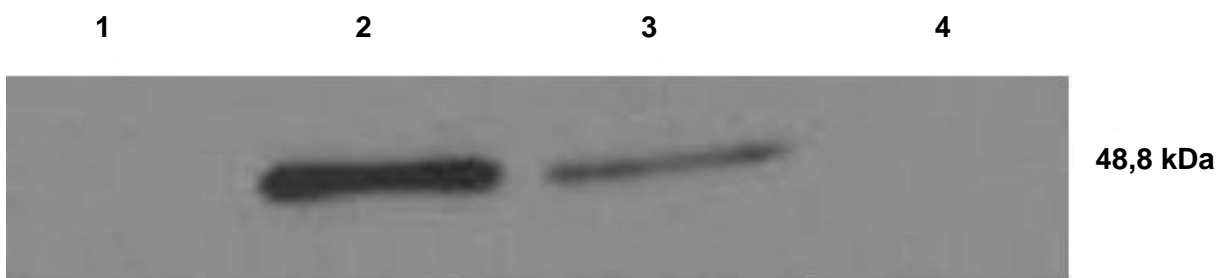


Abb. 19: Western-Blot Analyse der Expression von *S. typhi* in OD<sub>600</sub> 0,6-Kulturen. Inkubation mit Anti-Hämolyisin

- Spur 1: *S. typhi* Ty21a
- Spur 2: pMO-CTX-PSA
- Spur 3: pMO-CTX-PSA-Spel-lacI-TyrS-HisTag (sense) mit TyrS-Cm- und Kan<sup>R</sup>-Deletion
- Spur 4: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (sense) mit TyrS-Cm- und Kan<sup>R</sup>-Deletion

Abbildung 18 zeigt den Nachweis der Tyrosyl-tRNA-Synthetase im bakteriellen Zellpellet. Die Bande des Salmonellenstamms mit dem Plasmid pMo-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (Spur 4) ist doppelt so breit wie die des Stamms mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-Spel-lacI-TyrS-HisTag (Spur 5).

Um die Sekretion des Fusionsantigens zu überprüfen wurden Überstände mit dem Hämolyisin-Antikörper inkubiert (Abb. 19). Der Western-Blot zeigt den

ersten Stamm ohne chromosomales *tyrS*, der das Fusionsantigen sekretiert. Im Vergleich zur Positivkontrolle ist die Bande (Spur 3) nur etwa halb so breit.

### 4.3. Komplementierung des Sigmafaktors RpoS

In den *S. typhi*  $\Delta tyrS$  mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag-sense wurde das Plasmid pRpoS (Hotz, Fensterle et al. 2009) transformiert, auf dem der Sigmafaktor RpoS codiert ist. Dieser Faktor fehlt dem attenuierten Stamm *S. typhi* Ty21aa.

#### 4.3.1 Proteinanalytische Untersuchungen

Die Expression des Fusionsantigens wurde analog zu 4.1.2 getestet.



Abb. 20: Western-Blot Analyse der Expression von Fusionsantigenen durch *S. typhi*, Überstand bei OD 1,0, Inkubation mit Anti-Choleratoxin-AK.

- Spur 1: pMO-CTX-PSA
- Spur 2: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag
- Spur 3: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (sense) mit TyrS-Cm- und Kan<sup>R</sup>-Deletion
- Spur 4: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag (sense) mit TyrS-Cm- und Kan<sup>R</sup>-Deletion + pRpoS

Eine RpoS-Komplementierung in *S. typhi* Ty21a mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag-sense induziert eine nachweisbare Sekretion des Fusionsproteins.

#### 4.4. Proteinanalytische Untersuchungen unter verschiedenen Bedingungen

Die Expression, bzw. Sekretion des Fusionsantigens wurde bei verschiedenen Temperaturen in verschiedenen Medien getestet.

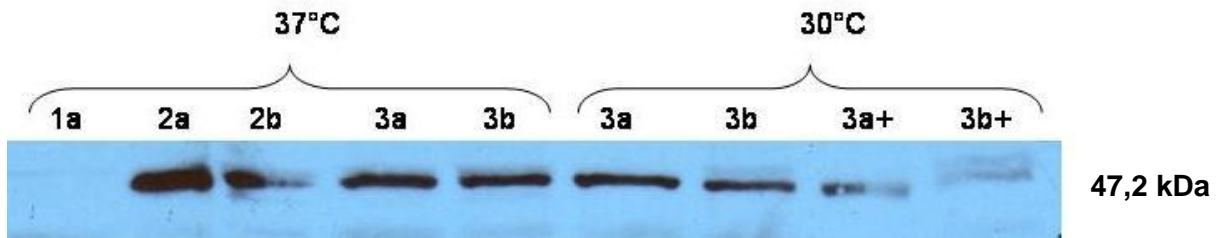


Abb. 21: Western-Blot Analyse der Expression von Fusionsprotein durch *S. typhi*, Pellet bei OD 1,0, Inkubation mit Anti-Choleratoxin-AK.

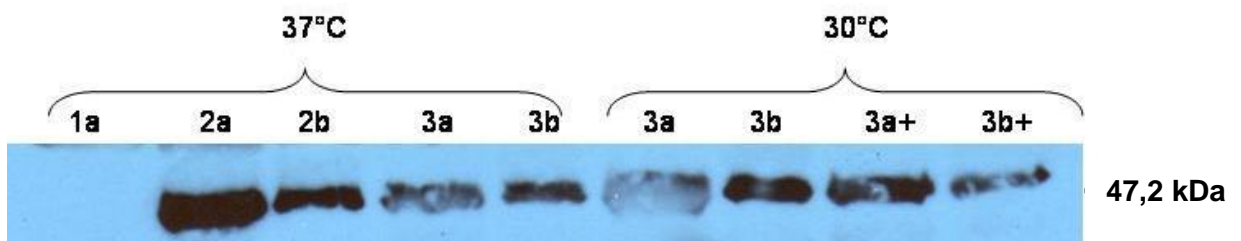


Abb. 22: Western-Blot Analyse der Expression von Fusionsprotein durch *S. typhi*, Überstand bei OD 1,0, Inkubation mit Anti-Choleratoxin-AK.

Spur 1: *S. typhi* Ty 21a

Spur 2: pMO-CTX-PSA

Spur 3: pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag

a = BHI-Medium    b = LB-Medium    + = Medium mit 0,05% Galaktose

Mit diesem Western-Blot wurde anhand von *S. typhi* mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag exemplarisch getestet, ob verschiedene Bedingungen während des Bakterienwachstums Einfluss auf die Proteinexpression / -sekretion nehmen.

Die Expression von *tyrS* scheint bei 37 °C etwas stärker. Die Banden der Antigensekretion sind bei beiden Temperaturen gleich. Die Bakterien, die in BHI-Medium gezüchtet wurden haben breitere Banden im Vergleich zu den LB-Kulturen. Der Zusatz von Galaktose scheint sich weder auf die *tyrS*- noch auf die Sekretion des Antigens auszuwirken.

## **4.5. Plasmidkopienzahl**

### **4.5.1. Verrechnung der Ergebnisse**

Mithilfe der Real Time PCR konnten die Mengen von genomischer und Plasmid-DNA in Relation gesetzt werden. Diese Methode gibt keine Auskunft über die absoluten DNA-Mengen. Jedoch können die DNA-Mengen von Chromosom und Plasmid miteinander verglichen werden.

Im Kapitel Methoden wurde beschrieben wie man die DNA-Mengen aus den Werten der Real Time PCR berechnen kann. Zum Vergleich wird die Menge der genomischen DNA per Definition gleich 1 gesetzt und der Anteil der Plasmid-DNA als Vielfaches von 1 abgebildet.

#### 4.5.2. Plasmidkopienzahlen getesteter Bakterienstämme

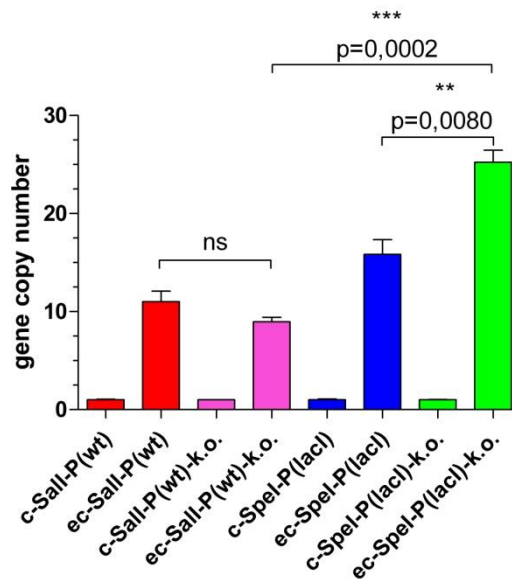


Abb. 23: Plasmidkopienzahl von *S. typhi* + pMO-Sall-P<sub>wt</sub>-TyrS-HisTag und *S. typhi* + pMO-Spel-P<sub>lacI</sub>-TyrS-HisTag

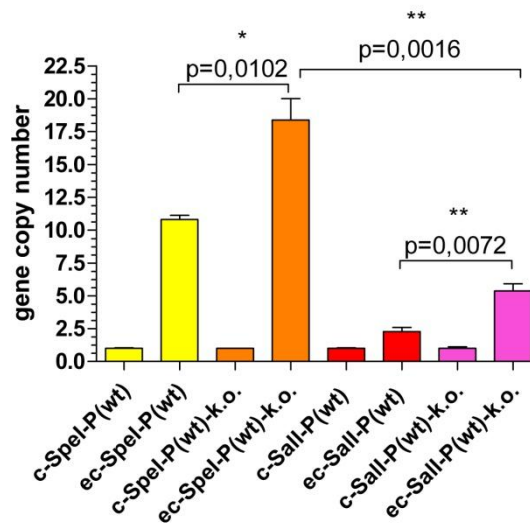


Abb. 24: Plasmidkopienzahl von *S. typhi* + pMO-Spel-P<sub>wt</sub>-TyrS-HisTag und *S. typhi* + pMO-Sall-P<sub>wt</sub>-TyrS-HisTag

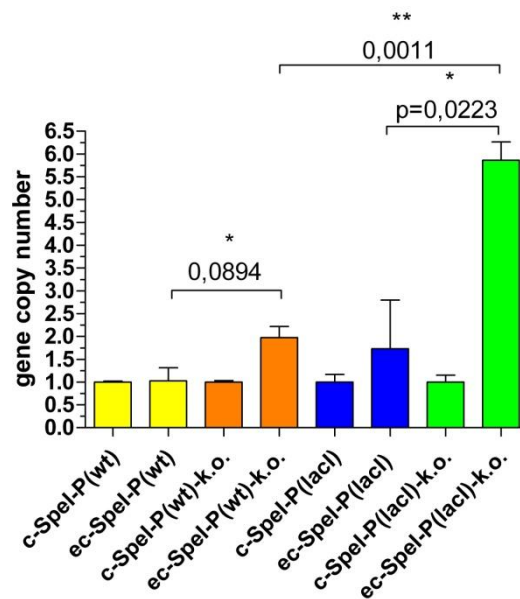


Abb. 25: Plasmidkopienzahl von *S. typhi* + pMO-Spel-P<sub>wt</sub>-TyrS-HisTag und *S. typhi* + pMO-Spel-P<sub>lacI</sub>-TyrS-HisTag

c = Menge der amplifizierten chromosomalen DNA

ec = Menge der amplifizierten extrachromosomalen DNA

k.o. = *S. typhi* mit chromosomaler Deletion von *tyrS*

Diesen Grafiken lassen sich mehrere Informationen entnehmen:

1. Der Unterschied zwischen der Plasmidkopienzahl zwischen Ausgangsstamm und dem Stamm mit chromosomaler *tyrS*-Deletion ist signifikant. Die chromosomale Deletion führt zu einer höheren Kopienzahl, was allerdings nicht gleichbedeutend mit einer stärkeren Antigensekretion ist (siehe Proteinexpressionstest).
2. Abbildung 24 zeigt den Vergleich zwischen den Plasmidkopien von pMO-Spel-TyrS und pMO-Sall-TyrS. In den chromosomal deletierten Stämmen führt die Spel-Schnittstelle zu einer signifikant höheren Plasmidkopienzahl als die Sall-Schnittstelle.



3. In Abbildung 25 werden Plasmide mit derselben Schnittstelle (SpeI), aber unterschiedlichen Promotoren, Wildtyp- und lacI-Promotor, verglichen. Das Plasmid mit dem lacI-Promotor führt zu signifikant höheren Kopienzahlen.

#### 4.6. Weitere Klonierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Klonierungen durchgeführt, die nicht weiter verfolgt wurden, da sich die Klonierung mit dem lacI-Promotor als sehr vielversprechend herausstellte.

1. S. typhi + pMO-CTX-Braf-Sall-TyrS-HisTag (sense)

Das Tumorantigen PSA wurde durch Braf ersetzt.

2. S. typhi + pMO-CTX-ΔIS2-SpeI-lacZ-TyrS-HisTag

Während der Klonierung, bei der das *tyrS*-HisTag-Gen unter die Kontrolle des lacI-Promotors gestellt wurde, wurde auch ein Plasmid hergestellt, bei dem der *tyrS*-Sequenz der lacZ-Promotor vorgeschaltet wurde, um die Weiterarbeit im Falle eines Versagens von P<sub>lacI</sub> zu gewährleisten.

3. Vorstufen zur Herstellung des P<sub>araBAD</sub>-TyrS-HisTag-Fragments

Die Vorstufen wurden sowohl für die SpeI-Site als auch für die Sall-Site hergestellt. Der Promotor P<sub>araBAD</sub> stellt eine Alternative zu P<sub>lacI</sub> dar, weil er durch Lactose induzierbar ist.

#### 4.7. Arbeiten mit *S. typhimurium* aroA SL7207

Es wurde mehrmals versucht die *tyrS*-Chloramphenicol-Kassette in *Salmonella typhimurium* SL7207 aroA zu integrieren um Versuche im Mausmodell zu ermöglichen. Hierbei muss das essenzielle *tyrS*-Gen auf dem bakteriellen Genom durch die *tyrS*-Chloramphenicol-Kassette ausgetauscht werden. Zwar

gelang die Integration der Kasette, jedoch an falscher Stelle auf dem bakteriellen Chromosom und nicht im Austausch der originalen *tyrS*-Sequenz.

## 5. Diskussion und Ausblick

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projektes „Balanced Lethal System für *Salmonella typhi* Ty21a“ der Arbeitsgruppe „Bakterielle Tumorthherapie“ gemacht. Ziel des Projektes ist die Entwicklung eines bakteriellen Impfstoffes, der seinen Einsatz in der Therapie maligner Erkrankungen finden soll.

Bei diesem Impfstoff macht man sich zu nutzen, dass die zelluläre Immunabwehr durch die Anwesenheit von Antigenen stimuliert wird (Chiara Castelli 2000). Der Stamm *Salmonella typhi* T21a + pMO-CTX-PSA-P<sub>lacI</sub>-tyrS-HisTag sezerniert das, an Cholera toxin gekoppelte, prostataspezifische Antigen via Hämolysin-Sekretionssystem. Die Gensequenzen des Fusionsantigens CtxB-PSA-HlyA<sub>signal</sub> und des  $\alpha$ -Hämolysin-Sekretionssystems sind auf dem Plasmid pMO codiert. Entscheidend für die Effizienz der Immunisierung ist die Quantität des Tumorantigens. Es besteht die Möglichkeit, das Tumorantigen in das bakterielle Chromosom zu integrieren, jedoch ist hierbei keine hohe Expression zu erwarten, da die Gensequenz nur einmalig vorläge. Eine Alternative bietet die Codierung des Proteins auf einem Plasmid. Eine suffiziente Plasmidstabilität stellt allerdings eine große Herausforderung dar. Man kann ein Plasmid mittels Einfügen einer Antibiotikumresistenz stabilisieren, jedoch ist dies bei einem Bakterienstamm, der Anwendung im menschlichen Körper finden soll obsolet. Außerdem stellt die industrielle Fermentation von Bakterienkulturen unter Verwendung von Antibiotika einen erheblichen Kostenfaktor dar. Eine weitere Möglichkeit ist die Konstruktion eines sog. Balanced Lethal Systems, bei dem ein essenzielles Gen chromosomal deletiert und auf dem Plasmid komplementiert wird.

Es wurden zahlreiche Ansätze zum Erhalt von Plasmiden in Bakterien beschrieben. Einen Überblick bieten die Publikationen von Garmory *et al.* 2005 und Spreng *et al.* 2005 (Garmory, Leckenby *et al.* 2005; Spreng and Viret 2005).

Anfang der 90er Jahre wurde ein Balanced Lethal System auf der Basis des Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Dehydrogenase-Gens (*asd*-Gen) entwickelt (Curtiss, Galan et al. 1990).

*Asd*-basierte Plasmidstabilisierungssysteme kamen in vielen präklinischen Studien zur Anwendung und garantierten die Expression verschiedenster Antigene von Plasmiden in *Salmonella* Stämmen.

Da das Produkt des *asd*-Gens, die Diaminopimelinsäure, in Tieren nicht vorkommt, trugen 100 % der applizierten Impf-Salmonellen nach verschiedenen Zeitintervallen das Komplementationsplasmid (Srinivasan, Tinge et al. 1995; Kang, Srinivasan et al. 2002).

In klinischen Studien fanden *asd*-stabilisierte *Salmonella*-Stämme als Träger von Hepatitis-B-Antigenen auch im Menschen Anwendung. An freiwilligen Versuchspersonen wurden verschiedene Dosen von Impf-Salmonellen getestet. Es konnte jedoch keine spezifische Immunantwort erfasst werden. Als Ursachen werden die mangelnde Antigenexpression *in vivo* und ein zu schneller Antigenabbau diskutiert (Nardelli-Haefliger, Kraehenbuhl et al. 1996; Tacket, Kelly et al. 1997; Spreng and Viret 2005).

Eine weitere Erkenntnis aus den Versuchen mit *asd*-basierten Balanced Lethal Systemen war die Tatsache, dass eine übermäßige Produktion des Komplementationsproduktes zu einem Verlust des Plasmids führt.

Es reicht ein Plasmid mit dem essenziellen Gen aus, um die chromosomale Deletion zu komplementieren. Dass Bakterien mit einer größeren Anzahl an Plasmiden, die alle Träger des essenziellen Gens sind, einige dieser Plasmide verlieren ist wenig erstaunlich. Umso weniger wenn auf highcopy Plasmiden Gensequenzen codiert sind, die einen Selektionsnachteil bedingen (Galán, Nakayama et al. 1990).

Es wurde gezeigt, dass die Integration des *asd*-Gens in ein multicopy Plasmid zu einer 200- bis 300-fachen Überproduktion von Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Dehydrogenase führt als es zur Komplementierung der chromosomalen

Deletion nötig wäre. Die Deletion von Teilen der *asd*-Promotorregion auf den Komplementationsplasmiden führte zu einer geringeren Produktion der Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Dehydrogenase und gleichzeitig zu einer Steigerung der Immunogenität der Impf-Salmonellen (Kang, Srinivasan et al. 2002).

Der Nachteil des Einsatzes von Stoffwechselprodukt-Auxotrophien wie z. B. der *asd*-Gen basierten Diaminopimelinsäure zur Stabilisierung von Plasmiden liegt in der Herstellung der Impfstoffe. Bei der Fermentation werden aufwendige Minimalmedien benötigt, denen die Komplementationsstoffwechselsubstanz fehlt, da es anderenfalls zum Plasmidverlust kommt (Garmory, Leckenby et al. 2005).

Außerdem muss sichergestellt sein, dass das Stoffwechselprodukt dessen Gencodes auf dem Komplementationsplasmid lokalisiert sind im Wirtsorganismus des Bakteriums nicht verfügbar ist. Ryan *et al.* deletierte das *glnA*-Gen, das für die Bildung der Aminosäure Glutamin verantwortlich ist, um ein Balanced Lethal System zu etablieren.

Glutamin kommt im Minimal-Wachstumsmedium *M9* nicht vor; deshalb ist das Komplementationsplasmid mit dem *gln*-Gen in diesem Medium *in vitro* essenziell. Bei Versuchen im Mausmodell überlebten jedoch Bakterien, die das Komplementationsplasmid nicht trugen. Grund hierfür war die ausreichende Menge an Glutamin im Magen-Darm-Trakt der Versuchstiere. Die Aminosäure wurde von den Bakterien aus der Umgebung aufgenommen und somit war die Beibehaltung des Komplementationsplasmides nicht mehr Voraussetzung für das Überleben der Vibrionen (Ryan, Crean et al. 2000).

Die Wahl des zu deletierenden Gens kann die Aufnahme des Genprodukts aus der Umgebung der Bakterien verhindern. Es muss sich um ein essenzielles Gen handeln, beispielsweise um ein essenzielles Gen der Proteinbiosynthese. Dies gelang 2003 als Pilgrim *et al.* ein *trpS*-basiertes Balanced Lethal System etablierten. Das *trpS*-Gen codiert für die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase und wurde aus dem Genom von *Listeria monocytogenes* deletiert und auf einem

DNA-delivery Plasmid komplementiert. Das System zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stabil (Pilgrim, Stritzker et al. 2003).

Ein *trpS*-basiertes Balanced Lethal System in *Salmonella typhi* wäre extrem schwierig zu etablieren, da das *trpS*-Gen mehrfach im Salmonellen-Genom vorkommt und daher mehrere chromosomale Deletionen durchgeführt werden müssten (Deng, Liou et al. 2003).

In der Vorgängerarbeit konstruierte man ein Balanced Lethal System in *Salmonella typhi* Ty21a, einem Stamm, der bereits Anwendung in der Vakzinierung gegen Typhus findet. Angriffspunkt stellte das essenzielle *tyrS*-Gen dar, das für das Enzym Tyrosyl-Aminoacyl-tRNA-Synthetase codiert. Die chromosomale *tyrS*-Sequenz wurde deletiert und mit Hilfe eines Antigenelivery-Plasmids komplementiert (Diessner 2010). Somit ist das Plasmid essenziell für das Bakterium: geht das Plasmid verloren, stirbt der Erreger. Dieses System hat folgende Vorteile. Zum einen garantiert die Vorgehensweise eine hundertprozentige Plasmidstabilität, zum anderen kann auf Antibiotikumresistenzgene zur Plasmidstabilisierung verzichtet werden. Gerade zweiteres ist von großem Vorteil, da sowohl therapeutisch als auch zur Impfung applizierte Bakterien über keine Antibiotikaresistenzen verfügen sollten. Diese Resistenzen stellten einen zusätzlichen Virulenzfaktor dar, der möglicherweise mit einer Steigerung der Pathogenität des Erregers einherginge. Käme es also zu einer entzündlichen Reaktion infolge der Applikation des Impfstammes als Zeichen einer pathologischen Infektion, die eine antimikrobielle Therapie erforderlich machen würde, so wäre die Auswahl des Medikaments von vorneherein eingeschränkt aufgrund der vorliegenden Resistenzlage des Erregers.

Die Sekretion des Fusionsproteins von *S. typhi*  $\Delta tyrS$  + pMO-CTX-PSA-*tyrS*-HisTag ist massiv beeinträchtigt bis nicht nachweisbar. Dieser Stamm verfügt weder über eine chromosomale noch über eine plasmidcodierte Antibiotikumresistenz. Beide Resistenzkassetten wurden mithilfe der von Diessner modifizierten Exzessionsmethode nach Datsenko und Wanner

entfernt (siehe 3.2.10.). Der entsprechende Salmonellenstamm mit gleichem Plasmid (pMO-CTX-PSA-tyrS-HisTag) und beiden Antibiotikaresistenzen (Chloramphenicol und Kanamycin) hingegen zeigt eine vielfach höhere Antigensekretion im Vergleich zum deletierten Stamm. Man vermutet eine toxische Wirkung durch Überexpression des *tyrS*-Gens und erwägt eine Änderung der Schnittstelle zur Einfügung der *tyrS*-HisTag-Kassette in das pMO-Plasmid, bzw. den Austausch des wildtypischen Promotors durch einen schwächeren. Beide Modifikationen sollen die Proteinbiosynthese von TyrS vermindern (Diessner 2010).

Das Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Antigensekretion in *Salmonella typhi* Ty21a.

Der Abstand zwischen der *hlyR*- und der *hlyC*-Sequenz auf dem pMO-Plasmid ist von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität des  $\alpha$ -Hämolysin-Sekretionssystems (Vogel 1988). Zwischen den beiden Sequenzen befindet sich das IS2-like-Element. Dieses wurde deletiert und durch die *tyrS*-Kassette ersetzt, die ähnlich viele Basenpaare besitzt wie das IS2-like-Element. Der Abstand zwischen *hlyR* und *hlyC* wurde somit gewahrt. Es wurde gezeigt, dass der Austausch des IS2-Elements durch den *tyrS*-HisTag-Komplex zu einer vergleichbaren Antigensekretion in *Escherichia coli*, jedoch zu einer signifikanten Verschlechterung in *Salmonella typhi* führt (Diessner 2010).

Ein erster Versuch zur Verbesserung bestand in der Wahl einer anderen Schnittstelle. Die *Spel*-Site wurde unverändert gelassen. Das IS2-like-Element wurde nicht deletiert. Als alternative Schnittstelle bot sich die *Sall*-Site an. Der Salmonellenstamm mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-*Sall*-*tyrS*-HisTag-sense zeigt in der Western-Blot Analyse eine Sekretion des Fusionsantigens, die der der Positivkontrolle entspricht. Wird jedoch das Plasmid nicht mit Hilfe der Kanamycinresistenz, sondern per chromosomaler Deletion der *tyrS*-Cm-Kassette stabilisiert, der Stamm also zum  $\Delta$ *tyrS*-Stamm gemacht, reduziert sich die Antigensekretion auf eine nicht nachweisbare Menge.

Die Ergebnisse aus der Klonierung mit der Sall-Schnittstelle lassen vermuten, dass mit der Deletion des genomischen *tyrS*-Gens die Plasmidkopienzahl deutlich sinkt. Das ist insofern nicht verwunderlich, da prinzipiell ein Plasmid reicht, um den chromosomalen Verlust zu kompensieren. Eine Möglichkeit, die Anzahl der Plasmide zu steigern besteht im Austausch des Promotors für das *tyrS*-Gen. Wird der wildtypische Promotor durch einen schwächeren ersetzt benötigt das Bakterium mehr pMO-Plasmide, um die gleiche Menge an Tyrosyl-Aminoacyl-tRNA-Synthetase herzustellen. Es wurde der lacI-Promotor aus dem lac-Operon gewählt, ein konstant-schwacher Promotor. Für die Insertion in das pMO-Plasmid wurde erneut die SpeI-Site gewählt, da eine Deletion des IS2-Elements wünschenswert ist.

*S. typhi* Ty21a mit dem Plasmid pMO-CTX-PSA-SpeI-lacI-*tyrS*-HisTag (sense) ist der erste Stamm, der mit chromosomaler Deletion von *tyrS* eine Sekretion des Fusionsproteins CtxB-PSA-Hly<sub>A</sub><sup>signal</sup> nachweisen lässt. Im Vergleich zur Positivkontrolle (*S. typhi* mit pMO-CTX-PSA) ist die, im Western-Blot detektierte, Menge etwa halb so groß.

Die Ergebnisse der Real Time PCR (RT-PCR) zeigen, dass bei allen getesteten Stämmen die Plasmidkopienzahl mit dem chromosomalen Verlust von *tyrS* steigt. Das dies nicht immer zu einer höheren Sekretion des Fusionsantigens führt zeigen die Stämme mit den Plasmiden pMO-CTX-PSA-SpeI-P(wt)-*tyrS*-HisTag und pMO-CTX-PSA-Sall-P(wt)-*tyrS*-HisTag. Beide Stämme verfügen in der  $\Delta$ *tyrS*-Form über mehr Plasmide als mit chromosomalem *tyrS*. Trotzdem sinkt in beiden Fällen die Antigensekretion auf einen nicht nachweisbaren Wert.

Eine mögliche Erklärung besteht in der gesteigerten Biosynthese der Tyrosyl-tRNA-Synthetase. Bedouelle *et al.* wies nach, dass eine Überproduktion dieses Enzyms eine toxische Auswirkung auf *Escherichia coli* hat (Bedouelle H 1990). Vielleicht besteht diese Toxizität auch für *Salmonella typhi*. Tatsache ist, dass mit einer erhöhten Plasmidkopienzahl nicht nur die Sequenzen für die



Antigenexpression und -sekretion, sondern auch das Gen für die Synthese der Tyrosyl-tRNA-Synthetase vervielfacht wird.

Ein weiterer Hinweis auf die negative Auswirkung von einer gesteigerten *tyrS*-Expression ist der Vergleich der Stämme *S. typhi* mit pMO-CTX-PSA-Spel-P(lacI)-*tyrS*-HisTag (sense) und *S. typhi* mit pMO-CTX-PSA-Sall-P(wt)-*tyrS*-HisTag (sense). Der Stamm mit dem lacI-Promotor verfügt über die signifikant höhere Anzahl an Plasmidkopien (siehe 4.5.2.) und müsste somit auch deutlicher an der toxischen Wirkung der *tyrS*-Überexpression leiden. In der Proteinanalyse zeigt sich jedoch, dass der Stamm mit dem wildtypischen Promotor etwa doppelt soviel Tyrosyl-tRNA-Synthetase exprimiert wie der Stamm mit dem schwachen lacI-Promotor, der dem *tyrS*-Gen vorgeschaltet ist (siehe 4.2.2.).

Desweiteren ist den RT-PCR-Versuchen zu entnehmen, dass auch die Wahl der Schnittstelle einen Einfluss auf die Plasmidkopienzahl nimmt. Der Test von zwei Stämmen mit demselben Promotor in zwei verschiedenen Schnittstellen ergibt, dass die Wahl der Spel-Site zu einer höheren Plasmidkopienzahl als die Sall-Site führt (siehe 4.5.2.).

Eine Verbesserung der Antigensekretion kann durch die Komplementierung des Sigmafaktors *rpoS* erreicht werden. Das *rpoS*-Gen codiert einen RNA-Polymerase-Sigmafaktor, der die bakterielle Proteinsekretion reguliert. Dieses Gen ist bei dem attenuierten Ty21a-Stamm inaktiviert. Es wird diskutiert, inwiefern *rpoS* als Virulenzfaktor zu erachten ist (Hotz, Fensterle et al. 2009). Eine *rpoS*-Komplementierung mittels dem Plasmid pRpoS steigert in *S. typhi* mit pMO-CTX-PSA-Sall-TyrS-HisTag die Antigensekretion auf das Niveau von *S. typhi* mit pMO-CTX-PSA (Positivkontrolle) (siehe 4.3.1.). Dies ist bemerkenswert und erklärt vielleicht warum die entsprechenden *E. coli* Stämme keine Beeinträchtigung durch die chromosomale Deletion von *tyrS* erfahren. Möglicherweise besteht in der Komplementierung von *rpoS* eine Verbesserung des Balanced Lethal Systems. Es gilt jedoch vorher genau zu untersuchen ob

der Sigmafaktor zu einer Steigerung der Virulenz bei *Salmonella typhi* Ty21a führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass es sich bei der Expression, bzw. Sekretion des Fusionsantigens in *Salmonella typhi* Ty21a um einen multifaktoriellen Vorgang handelt.

Einfluss auf Proteinbiosynthese des Tumorantigens und dessen Ausschleusung nehmen:

- der Abstand zwischen hlyR und hlyC
- die Wahl der Schnittstelle zur Integration der *tyrS*-Cm-Kassette
- der Promotor für die Expression der Tyrosyl-tRNA-Synthetase
- eine Komplementierung des Sigmafaktors RpoS

Eine Überexpression der Tyrosyl-tRNA-Synthetase vermindert die Antigensekretion der Bakterien. Möglicherweise nehmen noch weitere Faktoren Einfluss auf den Prozess.

Diessner konnte zeigen, dass das von ihm entwickelte Balanced Lethal System 100% Plasmidstabilität *in vitro* aufweist (Diessner 2010). Um die Plasmidstabilität *in vivo*, sprich im Mausmodell, zu testen, muss das System in *Salmonella typhimurium* SL7207 *aroA* etabliert werden.

Es sei hier nochmals auf die Schwierigkeiten dieser Klonierung hingewiesen. Im ersten Schritt gilt es ein essenzielles Gen aus dem bakteriellen Chromosom zu entfernen, indem es durch eine *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette ersetzt wird. Während dieser Arbeit ist die chromosomale Integration der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette zwar mehrfach gelungen, allerdings befand sie sich an einer falschen Stelle im Genom. Das ursprüngliche *tyrS*-Gen wurde nicht ausgetauscht.

Um die Weiterentwicklung dieses Projekts voran zu treiben muss nun die Charakterisierung von *S. typhi* mit pMO-CTX-PSA-Spel-lacI-*tyrS*-HisTag (sense) mit *tyrS*-Cm- und Kan<sup>R</sup>-Deletion abgeschlossen werden. Das Plasmid sollte in *Salmonella typhimurium* SL7207 *aroA* transferiert werden, um

Versuche im Mausmodell zu ermöglichen. Parallel besteht die Möglichkeit durch neue Kombinationen von Insertionsstelle auf dem Plasmid für die *tyrS*-Cm-Kassette und verschiedenen *tyrS*-Promotoren eine Verbesserung der Antigensekretion der Bakterien zu erreichen. Das Ziel ist die Etablierung eines zu 100% in vivo stabilen Systems mit effizienter Immunisierung durch ausreichende Antigensekretion. Vorrangig sind momentan allerdings die Untersuchung der jetzigen Stämme im Tierversuch.

Der optimierte plasmidstabilisierte Vakzinestamm soll Anwendung im Menschen finden. Hierbei ist an einen Einsatz in der Krebstherapie zu denken bei dem die Immunabwehr des Patienten stimuliert werden soll die Antigentragenden Zellen anzugreifen. Zum anderen ist eine Anwendung in der Primärprophylaxe im Sinne einer Impfung anzudenken.

Das Balanced Lethal System in *Salmonella typhi Ty21a* bietet den Vorteil der einfachen Austauschbarkeit des spezifischen Tumorantigens durch Modifikation des pMO-Plasmids. So könnte der Impfstamm sein Einsatzgebiet auf zahlreiche verschiedene Tumorarten ausdehnen.

## 6. Zusammenfassung

Es konnte in der Vorgängerarbeit von Diessner ein Balanced Lethal System für *Salmonella typhi* Ty21a auf Grundlage des *tyrS*-Gens erstellt werden. Dazu wurde das essenzielle Gen *tyrS*, das für das Enzym Tyrosyl-Aminoacyl-tRNA-Synthetase codiert, auf dem *Salmonella*-Genom deletiert. Der chromosomale Verlust wurde gleichzeitig durch eine plasmidcodierte *tyrS*-Expressionskassette komplementiert. Die chromosomale Deletion soll eine hundertprozentige Plasmidstabilität garantieren, da der Verlust des Plasmids das Absterben des Bakteriums bedingen würde. Der Bakterienstamm kann ohne antibakteriellen Selektionsdruck angezüchtet werden und besitzt keine Antibiotikumresistenz, eine entscheidende Voraussetzung für die Anwendung im Menschen.

Das durch dieses System stabilisierte pMO-Antigendelivery-Plasmid enthält eine Expressionskassette die für das  $\alpha$ -Hämolyisin-Sekretionssystem codiert mit dessen Hilfe das Bakterium das tumorspezifische Antigen PSA (Prostata spezifisches Antigen) sekretiert, das ebenfalls auf dem pMO-Plasmid codiert ist. Es konnte in Studien bereits gezeigt werden, dass von Bakterien sezernierte tumorspezifische Antigenstrukturen spezifische Reaktionen des Immunsystems gegen das präsentierte Antigen hervorrufen können. Im Mausmodell konnte sowohl eine humorale, als auch eine zelluläre Immunantwort nach Gabe von Impfstämmen gemessen werden.

Das Projekt „Balanced Lethal System in *Salmonella typhi* Ty21a“ der AG Bakterielle Tumorthherapie des MSZ zielt auf die Entwicklung eines Vakzinstammes, der in der humanen Krebstherapie zum Einsatz kommen soll. Ziel dieser Arbeit war das zuvor etablierte Balanced Lethal System in *Salmonella typhi* Ty21a zu optimieren.

Es konnte eine höhere Antigensekretion durch Veränderungen am Antigendelivery-Plasmids pMO erzielt werden. In der ersten Klonierung wurden verschiedene Schnittstellen im Komplementationsplasmid untersucht. Die Wahl

der Sall-Schnittstelle führte in den Ausgangsstämmen zu einer signifikant höheren Antigensekretion im Vergleich zu Bakterien deren Plasmide die SpeI-Site als Insertionsstelle für die *tyrS*-HisTag-Kassette verwenden.

Die entscheidende Verbesserung des Balanced Lethal Systems bestand im Austausch des Promotors, der die Expression des *tyrS*-Gens reguliert. Der wildtypische Promotor wurde durch den *lacI*-Promotor ersetzt. Diese Modifizierung führte zur erstmaligen Sekretion des Fusionsantigens CtxB-PSA-HlyA<sub>signal</sub> durch einen *tyrS*-deletierten *Salmonella*-Stamm.

Zusätzlich wurden Stämme mit Rekonstitution des Sigmafaktors RpoS kloniert. Anschließend konnte bei Bakterien eine Sekretion des Fusionsproteins nachgewiesen werden, bei denen zuvor kein Antigen im Überstand detektierbar war.

In der Weiterentwicklung des *tyrS*-basierten Balanced Lethal System steht die Etablierung des Systems in *Salmonella typhimurium* an erster Stelle um *in vivo* Versuche um Mausmodell zu ermöglichen.

Eine zweite Aufgabe besteht in der Charakterisierung der in dieser Arbeit klonierten Stämme.

## 7. Literatur- und Bildnachweis

### 7.1. Literaturnachweis

Arlen, P. M., H. L. Kaufman, et al. (2005). "Pox Viral Vaccine Approaches." Seminars in oncology 32(6): 549-555.

Bedouelle H, G. V., Vidal-Cros A, Hermann M (1990). "Overproduction of Tyrosyl-tRNA Synthetase Is Toxic to *Escherichia coli*: a Genetic Analysis." Journal of Bacteriology 172(7): 3940-3945.

Boon T, C. P., Van den Eynde B. (1997). "Tumor antigens recognized by T cells." Immunology today 18(6): 267-268.

Bühling, K. J., J. Lepenies, et al. (2004). Intensivkurs - Allgemeine und spezielle Pathologie. München, Urban & Fischer.

Chiara Castelli, L. R., Giovanna Andreola, Matteo Carrabba, Nicolina Renkvist, Giorgio Parmiani, (2000). "T-cell recognition of melanoma-associated antigens." Journal of Cellular Physiology 182(3): 323-331.

Coulie PG, V. d. E. B., van der Bruggen P, Van Pel A, Boon T. (1997). "Antigens recognized by T-lymphocytes on human tumours." Biochemical Society transactions 25(2): 544-548.

Coynault, C., V. Robbe-Saule, et al. (1996). "Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS regulon  
doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02664.x." Molecular Microbiology 22(1): 149-160.

Curtiss, R., J. E. Galan, et al. (1990). "Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo." Research in Microbiology 141(7-8): 797-805.

Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products 10.1073/pnas.120163297." Proceedings of the National Academy of Sciences 97(12): 6640-6645.

Deng, W., S.-R. Liou, et al. (2003). "Comparative Genomics of Salmonella enterica Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18 10.1128/JB.185.7.2330-2337.2003." J. Bacteriol. 185(7): 2330-2337.

Diefenbach, A., A. M. Jamieson, et al. (2000). "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages." 1(2): 119-126.

Diessner, E.-J. (2010). Konstruktion eines Balanced lethal Systems für Salmonella typhi Ty21a. Würzburg.

Dietrich, G., M. Griot-Wenk, et al. (2003). "Experience with registered mucosal vaccines." Vaccine 21(7-8): 678-683.

Drake, C. G. (2010). "Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy." 10(8): 580-593.

Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting." 21(2): 137-148.

Ehrlich, P. (1909). "Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung." Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie: 117-164.

El Hage F, A.-R. S., Meslin F, Mami-Chouaib F, Chouaib S (2008). "Réponse immune et cancer." Bulletin du Cancer 95: 57-67.

Engelbart, K. and D. Gericke (1964). "Oncolysis by Clostridia: V. Transplanted Tumors of the Hamster." Cancer Res 24(2\_Part\_1): 239-243.

Engels, E. A., M. E. Falagas, et al. (1998). "Typhoid fever vaccines: a meta-analysis of studies on efficacy and toxicity." BMJ 316(7125): 110-116.

Filloux, A., R. Voulhoux, et al. (2002). "Use of colicin-based genetic tools for studying bacterial protein transport." Biochimie 84(5-6): 489-497.

Finn, O. J. (2003). "Cancer vaccines: between the idea and the reality." 3(8): 630-641.

Fox ME, L. M., Mauchline ML, Davis TO, Giaccia AJ, Minton NP, Brown JM (1996). "Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia." Gene Therapy(3): 173-178.

Galán, J. E., K. Nakayama, et al. (1990). "Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains." Gene 94(1): 29-35.

Gao, Y., W. Yang, et al. (2003). "CD4<sup>+</sup> T Cells Provide an Early Source of Interferon  $\gamma$  in Tumor Immunity  
10.1084/jem.20030584." The Journal of Experimental Medicine 198(3): 433-442.



Garmory, H. S., M. W. Leckenby, et al. (2005). "Antibiotic-Free Plasmid Stabilization by Operator-Repressor Titration for Vaccine Delivery by Using Live *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium 10.1128/IAI.73.4.2005-2011.2005." Infect. Immun. 73(4): 2005-2011.

Gentschev, I., G. Dietrich, et al. (2002). "The *E. coli* [alpha]-hemolysin secretion system and its use in vaccine development." Trends in Microbiology 10(1): 39-45.

Gentschev, I., J. Fensterle, et al. (2005). "Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice." BMC Cancer 5(1): 15.

Gentschev, I., H. Mollenkopf, et al. (1996). "Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway." Gene 179(1): 133-140.

Gentschev, I., S. Spreng, et al. (2007). "Vivotif® -- A 'Magic Shield' for Protection against Typhoid Fever and Delivery of Heterologous Antigens." Chemotherapy 53(3): 177-180.

Georges Vassaux, J. N., Sarah Jezzard, Nick R Lemoine, (2006). "Bacterial gene therapy strategies." The Journal of Pathology 208(2): 290-298.

Germanier, R. and E. Furer (1971). "Immunity in Experimental Salmonellosis II. Basis for the Avirulence and Protective Capacity of gal E Mutants of *Salmonella typhimurium*." Infect. Immun. 4(6): 663-673.

Gilman, R. H., R. Hornick, W. Woodard, H. Dupont, M. Snyder, M. M. Levine, J. P. Libonati (1977). "Evaluation of UDP-glucose-4-epimerase-less mutant of *Salmonella typhi* as a live oral vaccine." The Journal of Infectious Diseases 136: 717-723.

Groh, V., J. Wu, et al. (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." 419(6908): 734-738.

Grulich, A. E., M. T. van Leeuwen, et al. (2007). "Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis." The Lancet 370(9581): 59-67.

Guerder S, M. P. (1992). "A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance." The Journal of experimental medicine 176(2): 553-564.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The Hallmarks of Cancer." Cell 100(1): 57-70.

Henkart, P. (1994). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules." Immunity 1(5): 343-346.

Herrington, D. A., L. Van De Verg, et al. (1990). "Studies in volunteers to evaluate candidate Shigella vaccines: further experience with a bivalent Salmonella typhi-Shigella sonnei vaccine and protection conferred by previous Shigella sonnei disease." Vaccine 8(4): 353-357.

Higano, C. S., P. F. Schellhammer, et al. (2009). "Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer." Cancer 115(16): 3670-3679.

Hone, D., S. Attridge, et al. (1988). "A chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in Salmonella based vaccine strains." Microbial Pathogenesis 5(6): 407-418.

Hotz, C., J. Fensterle, et al. (2009). "Improvement of the live vaccine strain

Jinushi, M., T. Takehara, et al. (2003). "Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid." International Journal of Cancer 104(3): 354-361.

Kaech, S. M. and R. Ahmed (2003). "IMMUNOLOGY: CD8 T Cells Remember with a Little Help  
10.1126/science.1084511." Science 300(5617): 263-265.

Kang, H. Y., J. Srinivasan, et al. (2002). "Immune Responses to Recombinant Pneumococcal PspA Antigen Delivered by Live Attenuated Salmonella enterica Serovar Typhimurium Vaccine  
10.1128/IAI.70.4.1739-1749.2002." Infect. Immun. 70(4): 1739-1749.

Kantele, A., J. Kantele, et al. (1997). "Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut." J Immunol 158(2): 574-579.

Kantele, A., J. Zivny, et al. (1999). "Differential Homing Commitments of Antigen-Specific T Cells After Oral or Parenteral Immunization in Humans." J Immunol 162(9): 5173-5177.

Kubista, M., J. M. Andrade, et al. "The real-time polymerase chain reaction." Molecular Aspects of Medicine  
Real-time Polymerase Chain Reaction 27(2-3): 95-125.

Lee, C.-H., C.-L. Wu, et al. (2005). "Systemic administration of attenuated Salmonella choleraesuis in combination with cisplatin for cancer therapy." 11(5): 707-716.

Lemmon MJ, v. Z. P., Fox ME, Mauchline ML, Giaccia AJ, Minton NP, Brown JM (1997). "Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment." Gene Therapy(4): 791-796.

Levine, M. M., C. Ferreccio, et al. (1999). "Duration of efficacy of Ty21a, attenuated Salmonella typhi live oral vaccine." Vaccine 17(Supplement 2): S22-S27.

Levine, M. M., D. Hone, et al. (1990). "Clinical and field trials with attenuated Salmonella typhi as live oral vaccines and as "carrier" vaccines." Research in Microbiology 141(7-8): 807-816.

Liu SC, M. N., Giaccia AJ, Brown JM (2002). "Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis." Gene Therapy(9): 291-296.

Lu, B. and O. J. Finn (2007). "T-cell death and cancer immune tolerance." 15(1): 70-79.

Luo X, L. Z., Lin S, Le T, Ittensohn M, Bermudes D, Runyab JD, Shen SY, Chen J, King IC, Zheng LM (2001). "Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models." Oncology Research 12(11-12): 501-508.

Luo, Y., H. Zhou, et al. (2003). "Transcription factor Fos-related antigen 1 is an effective target for a breast cancer vaccine  
10.1073/pnas.1033132100." Proceedings of the National Academy of Sciences 100(15): 8850-8855.

McCann (1999). "Can skin cancers be minimized or prevented in organ transplant patients?" J Natl Cancer Inst 91: 911-913.

Minton, N. P. (2003). "Clostridia in cancer therapy." 1(3): 237-242.

Mose, J. R. and G. Mose (1964). "Oncolysis by Clostridia. I. Activity of Clostridium Butyricum (M-55) and Other Nonpathogenic Clostridia against the Ehrlich Carcinoma." Cancer Res 24(2\_Part\_1): 212-216.

Mullis K, F. F., Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Biotechnology (Reading, Mass.) 24: 17-27.

Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor 10.1126/science.7533326." Science 267(5203): 1449-1456.

Nakayama K., S. M. K., R. Curtiss (1988). "Construction of an Asd+ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a Salmonella vaccine strain." Biotechnology 6: 693-697.

Nardelli-Haefliger, D., J. Kraehenbuhl, et al. (1996). "Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated Salmonella typhi vaccine strain." Infect. Immun. 64(12): 5219-5224.

Niethammer, A. G., R. Xiang, et al. (2002). "A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth." 8(12): 1369-1375.

Nikaido, H. (1961). "Galactose-sensitive mutants of Salmonella I. Metabolism of galactose." Biochimica et Biophysica Acta 48(3): 460-469.

Oberholzer, M. J. (2001). Pathologie verstehen - Molekulare Grundlagen der allgemeinen Pathologie. Stuttgart, Thieme.

Overwijk, W. W., M. R. Theoret, et al. (2003). "Tumor Regression and Autoimmunity after Reversal of a Functionally Tolerant State of Self-reactive CD8+ T Cells  
10.1084/jem.20030590." The Journal of Experimental Medicine 198(4): 569-580.

Pawelek, J. M., K. B. Low, et al. (1997). "Tumor-targeted Salmonella as a Novel Anticancer Vector." Cancer Res 57(20): 4537-4544.

Pilgrim, S., J. Stritzker, et al. (2003). "Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery." 10(24): 2036-2045.

Platt, J., S. Sodi, et al. (2000). "Antitumour effects of genetically engineered Salmonella in combination with radiation." European Journal of Cancer 36(18): 2397-2402.

Rijavec, M., M. Budic, et al. (2007). "Prevalence of ColE1-Like Plasmids and Colicin K Production among Uropathogenic *Escherichia coli* Strains and Quantification of Inhibitory Activity of Colicin K  
10.1128/AEM.01780-06." Appl. Environ. Microbiol. 73(3): 1029-1032.

Robbe-saule, V., C. Coynault, et al. (1995). "The live oral typhoid vaccine Ty21a is a *rpoS* mutant and is susceptible to various environmental stresses." FEMS Microbiology Letters 126(2): 171-176.

Ruiz, M. (2010). "Lung Cancer in HIV-Infected Patients: The Experience of an Urban Clinic." Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care 9(4): 214-217.

Ryan, E. T., T. I. Crean, et al. (2000). "Development of a Delta glnA Balanced Lethal Plasmid System for Expression of Heterologous Antigens by Attenuated Vaccine Vector Strains of *Vibrio cholerae* 10.1128/IAI.68.1.221-226.2000." Infect. Immun. 68(1): 221-226.

Saiki, R., D. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase 10.1126/science.2448875." Science 239(4839): 487-491.

Salerno-Goncalves, R. n. and M. B. Szein (2009). "Priming of *Salmonella enterica* Serovar Typhi-Specific CD8+ T Cells by Suicide Dendritic Cell Cross-Presentation in Humans." PLoS ONE 4(6): e5879.

Salgaller, M. L. and P. A. Lodge (1998). "Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer." Journal of Surgical Oncology 68(2): 122-138.

Schuster, M., A. Nechansky, et al. (2006). "Cancer immunotherapy." Biotechnology Journal 1(2): 138-147.

Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN[gamma] and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." 410(6832): 1107-1111.

Shebl FM, E. E., Goedert JJ, Chaturvedi AK (2010). "Pulmonary Infections and Risk of Lung Cancer Among Persons With AIDS." Journal of acquired immune deficiency syndromes.

Simons, J. W. and N. Sacks (2006). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic cancer cellular immunotherapy: The GVAX® vaccine for prostate cancer." Urologic oncology 24(5): 419-424.

Smyth MJ, T. K., Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H (2003). "Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy." Immunity 18(1): 1-6.

Soghomonyan, S. A., M. Doubrovin, et al. (2004). "Positron emission tomography (PET) imaging of tumor-localized Salmonella expressing HSV1-TK." 12(1): 101-108.

Spector, N. L. and K. L. Blackwell (2009). "Understanding the Mechanisms Behind Trastuzumab Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2â€“Positive Breast Cancer 2â€“10.1200/JCO.2009.22.1507." Journal of Clinical Oncology 27(34): 5838-5847.

Speiser, D. E., R. Miranda, et al. (1997 ). "Self Antigens Expressed by Solid Tumors Do Not Efficiently Stimulate Naive or Activated T Cells: Implications for Immunotherapy 10.1084/jem.186.5.645 " The Journal of Experimental Medicine 186 (5 ): 645-653

Spreng, S., G. Dietrich, et al. (1999). "The Escherichia coli haemolysin secretion apparatus: a potential universal antigen delivery system in Gram-negative bacterial vaccine carriers doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01290.x." Molecular Microbiology 31(5): 1596-1598.

Spreng, S. and J.-F. Viret (2005). "Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines." Vaccine Vaccines and Immunisation. Based on the Fourth World Congress on Vaccines and Immunisation 23(17-18): 2060-2065.

Srinivasan, J., S. Tinge, et al. (1995). "Oral immunization with attenuated Salmonella expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract.



10.1095/biolreprod53.2.462." Biology of Reproduction 53(2): 462-471.

Su, X., L. Zhang, et al. (2010). "Immunotherapy with Cytokine-Induced Killer Cells in Metastatic Renal Cell Carcinoma  
doi:10.1089/cbr.2010.0762." Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 25(4):  
465-470.

Tacket, C., S. Kelly, et al. (1997). "Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system." Infect. Immun. 65(8): 3381-3385.

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

Thiele, E. H., R. N. Arison, et al. (1964). "Oncolysis by Clostridia. III. Effects of Clostridia and Chemotherapeutic Agents on Rodent Tumors." Cancer Res 24(2\_Part\_1): 222-233.

Tjuvajev, J., R. Blasberg, et al. (2001). "Salmonella-based tumor-targeted cancer therapy: tumor amplified protein expression therapy (TAPET(TM)) for diagnostic imaging." Journal of Controlled Release 74(1-3): 313-315.

Vajdic, C. M. and M. T. van Leeuwen (2009). "Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation." International Journal of Cancer 125(8): 1747-1754.

Vetter, C. S., V. Groh, et al. (2002). "Expression of Stress-induced MHC Class I Related Chain Molecules on Human Melanoma." 118(4): 600-605.

Viret, J.-F., D. Favre, et al. (1999). "Mucosal and Systemic Immune Responses in Humans after Primary and Booster Immunizations with Orally Administered Invasive and Noninvasive Live Attenuated Bacteria." Infect. Immun. 67(7): 3680-3685.

Vogel, H., Then, Juarez, Goebel (1988). "Characterization of a sequence (hlyR) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in *Escherichia coli*." Mol Gen Genet.

Zitvogel, L., A. Tesniere, et al. (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." 6(10): 715-727.

## 7.2. Bildnachweis

Abb. 1: Die 7 Kennzeichen von Tumorzellen nach El Hage *et al.* 2008

Abb. 2: Prinzip der Plasmidstabilisierung nach Curtiss *et al.* (Diessner 2010)

Abb. 3: University of Miami – Department of Biology  
(<http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg>)

Abb. 4: diese Arbeit

Abb. 5: Bryan Derksen ([http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction\\_enzyme](http://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_enzyme))

Abb. 6: Georgia Institute of Technology  
([http://web.chemistry.gatech.edu/~Williams/bCourse\\_Information/4581/techniques/gel\\_elect/gel.jpg](http://web.chemistry.gatech.edu/~Williams/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/gel.jpg))

Abb. 7: Queen's University Kingston – School of Environmental  
(<http://www25.brinkster.com/icequeen11/chemistry/bgp11i.gif>)

Abb. 8: The Alexander Silberman Institute of Life Science  
(<http://teachline.ls.huji.ac.il/72320/methods-tutorial/western/testwestern.jpg>)

Abb. 9-25: diese Arbeit

## 8. Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| Abb.            | Abbildung   |
| Ak              | Antikörper  |
| Amp             | Ampicillin  |
| AMP             | Adenosin Monophosphat                               |
| APC             | Antigenpräsentierende Zellen                        |
| AS              | Aminosäure  |
| <i>asd</i> -Gen | Gen für Aspartat $\beta$ -Semialdehyd Dehydrogenase |
| BLS             | Balanced Lethal System                              |
| BHI             | Brain-Heart-Infusion                                |
| bp              | Basenpaare  |
| °C              | Grad Celsius  |
| ca.             | zirka   |
| cat.            | Chloramphenicolacetyltransferase                    |
| CD              | Cluster of Differentiation                          |
| cm              | Zentimeter  |
| Cm              | Chloramphenicol                                     |
| CTX/CtxB        | Choleratoxin Subunit B                              |
| deion.          | deionisiert   |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid                                    |
| dNTPs           | Desoxynucleotidtriphosphate                         |
| <i>E. coli</i>  | <i>Escherichia coli</i>                             |
| EDTA            | Ethylendiamintetra Acetat                           |
| <i>et al.</i>   | et altera   |
| FLP             | Flipase   |
| FRT             | Flipase Recognition                                 |
| g               | Gramm   |
| IS2             | Insertionssequenz 2                                 |
| Kan             | Kanamycin   |
| KB-Leiter       | Kilo Basenleiter                                    |
| kg              | Kilo Gramm  |

|                  |  |
|------------------|--|
| kV               | Kilo Volt  |
| LB               | Luria-Bertani  |
| m                | Meter  |
| MHC              | Major Histocompatibility Complex                           |
| mm               | Milli Meter  |
| MSZ              | Medizinisches Institut für Strahlenkunde und Zellforschung |
| NK               | Natürliche Killerzelle                                     |
| P                | Promotor   |
| PCR              | Polymerase Chain Reaction                                  |
| Pfu              | Pyrococcus furiosus  |
| pH               | potenti Hydrogenii   |
| PSA              | Prostata Spezifisches Antigen                              |
| R                | Resistenz  |
| rpm              | Rounds per minute  |
| SDS S            | Sodium Dodecyl Sulfat                                      |
| <i>S. typhi</i>  | <i>Salmonella typhi</i>                                    |
| Taq              | Thermus aquaticus  |
| TBE              | TRIS-Borat-EDTA-Puffer                                     |
| Ter              | Terminator   |
| <i>tyrS</i> -Gen | Gen für Tyrosyl-tRNA-Synthetase                            |
| YT               | Yeast Extract, Tryptone                                    |
| z. B.            | zum Beispiel   |
| z. T.            | zum Teil   |
| Δ                | ohne   |

## 9. Danksagung

Ich möchte folgenden Personen recht herzlich danken:

Dr. Birgit Bergmann für die Betreuung dieser Arbeit, die Kompetenz, Hilfsbereitschaft und Geduld umfasste. Ihre sympathische und zugleich zielgerichtete Führung hat entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank.

Professor Dr. Ulf R. Rapp für die Möglichkeit an seinem Institut diese Arbeit zu machen.

Professor Dr. Ulrich Vogel für die Übernahme der Doktorvaterschaft.

Priv.-Doz. Dr. Thomas Kerkau für die Annahme der Arbeit als Koreferent.

Priv.-Doz. Dr. Ivaylo Gentshev und Dr. Joachim Fensterle für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Ihre Erfahrung und Ideen haben zum Gelingen des Projekts beigetragen.

Dr. Frank Günther für zahlreiche Anregungen und Verbesserungsvorschläge.

Professor Dr. Werner Goebel für sein Interesse und zahlreiche Anregungen.

Dr. Joachim Diessner für seine enorme Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Martin Heisig für seine exzellente Betreuung, Beratung und Hilfsbereitschaft.

Dr. Christian Hotz für seine Güte und Nachsicht.

Dr. Katharina Galmbacher, Susanne Meyer, Maureen Menning, Katharina Meder, Matthias Düchs und Raphael Reuten für ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft.

Christian Rechtenwald und Miriam Alb für die Weiterführung des Projekts.

Der gesamten Arbeitsgruppe „Bakterielle Tumorthherapie“ sage ich Danke für die heitere Arbeitsatmosphäre und die interessante Zeit im Labor.

Nadine Bräuning für ihre Unterstützung.

Nicht zuletzt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mein Studium ermöglichten. Für die Unterstützung jeglicher Art und der Anteilnahme vielen lieben Dank.