

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

Vorstand: Professor Dr. med. Ulf Rapp

Konstruktion eines Balanced lethal Systems für *Salmonella typhi* Ty21a

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ernst Joachim Diessner

aus Bad Windsheim

Würzburg, Mai 2009

Referent: Professor Dr. med. U. Rapp

Korreferent: Professor Dr. rer. nat. T. Hünig

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

28. September 2010

Der Promovend ist Arzt

Meinem Vater Dr. rer. pol. Reinhard Diessner

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite	1
1.1	Krebs		1
1.1.1	Krebs – eine häufige Erkrankung		1
1.1.2	Therapieansätze		2
1.1.2.1	Konventionelle Methoden		2
1.1.2.2	Immuntherapien		3
1.1.2.2.1	Allgemeine Prinzipien		3
1.1.2.2.2	Mikrobielle Immuntherapie		5
1.2	<i>Salmonellen</i> als bakterielle Tumorstoffe		6
1.2.1	Charakterisierung von <i>Salmonellen</i>		6
1.2.2	<i>Salmonella</i> -Stämme als Vakzine in der Arbeitsgruppe		9
1.2.2.1	Hämolysin- α -Sekretionssystem		9
1.2.2.2	Antigendelivery Plasmid pMO		12
1.2.3	Stabilisierung von Plasmiden		14

1.2.3.1	Mit Antibiotikaresistenzen	14
1.2.3.2	Mit Balanced lethal Systemen	15
1.2.3.2.1	Allgemeine Prinzipien	15
1.2.3.2.2	Verwendung des <i>tyrS</i> -Gens	17
1.2.3.2.3	Chromosomale Deletion nach Datsenko und Wanner	20
1.3	Ziel der Arbeit	23
2.	Material	Seite 24
2.1	Geräte	24
2.2	Verbrauchsmaterialien	26
2.3	Bakterienstämme	27
2.4	Plasmide	28
2.5	Oligonukleotide	31
2.6	Enzyme und Antikörper	35
2.7	Medien, Medienzusätze und Kulturplatten	36

2.8	Verwendete Chemikalien	37
2.9	Verwendete Kits	40
3.	Methoden	Seite 41
3.1	Allgemeine Arbeiten mit Bakterien	41
3.1.1	Sterilisation von Medien und Geräten	41
3.1.2	Herstellung von Glyzerinstocks	41
3.1.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> - und <i>Salmonella</i> - Stämmen in Flüssigmedien	42
3.1.4	Kultivierung von <i>E. coli</i> - und <i>Salmonella</i> - Stämmen auf Kulturplatten	42
3.1.5	Erzeugung elektrokompetenter Zellen	42
3.2	Molekulargenetische Arbeiten	44
3.2.1	Isolation von Plasmid-DNA	44
3.2.1.1	Mit Miniprep	44
3.2.1.2	Mit Midiprep	47
3.2.2	Isolation von genomischer DNA aus Bakterien	49
3.2.3	Aufreinigung von DNA	51

3.2.3.1	Aus dem PCR-Ansatz	51
3.2.3.2	Aus der Gelelektrophorese	53
3.2.3.3	Von QuikChange [®] -Produkten	54
3.2.4	Elektrophoretische DNA-Auftrennung	55
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	58
3.2.5.1	Allgemeine Verfahrensprinzipien	58
3.2.5.2	Herstellung eines Bakterien- schnelllysats für PCR	61
3.2.5.3	Klonierungs PCR	62
3.2.5.4	QuikChange [®] - PCR	63
3.2.5.5	Screening PCR	65
3.2.5.6	Multiplex PCR	66
3.2.6	Restriktionsverdau von DNA-Sequenzen	68
3.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	69
3.2.8	Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen	71
3.2.9	Photometrische Messungen	72

3.2.9.1	Von DNA-Konzentrationen	72
3.2.9.2	Von Bakterienkulturdichte	73
3.2.10	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	74
3.3	Proteinanalytische Methoden	74
3.3.1	Proteinisolierung aus dem Bakterienpellet	74
3.3.2	Proteinisolierung aus dem Bakterienüberstand	75
3.3.3	SDS-Gelelektrophorese	77
3.3.4	Western Blot Analyse	78
3.4	Arbeiten unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften	81
3.5	Synchrone Excision des <i>tyrS-cat</i> -Fragments aus dem Genom und Deletion der Kanamycin- Kassette aus dem pMO-Plasmid	82

4.	Ergebnisse	Seite	84
4.1	Übersichtsplan durchgeführter Klonierungen	84	
4.2	Herstellung des <i>tyrS</i> bzw. <i>tyrS</i> -HisTag-Fragments	86	
4.3	Modifikationen am pKD3-Plasmid	88	
4.3.1	Einfügen von <i>SpeI</i> -Schnittstelle und Integration von <i>tyrS</i> bzw. <i>tyrS</i> -HisTag	88	
4.3.2	Erstellung von Wachstumskurven	92	
4.3.3	Proteinexpressionstests	94	
4.4	Modifikationen am pMO-Plasmid	96	
4.4.1	Deletion von <i>IS2</i> -like-Element und Integration von <i>tyrS</i> bzw. <i>tyrS</i> -HisTag	96	
4.4.2	Erstellung von Wachstumskurven	104	
4.4.3	Proteinexpressionstests	105	
4.5	Der chromosomale Knockout der <i>tyrS</i> -Kassette und dessen Komplementierung	110	
4.5.1	Amplifizierung des <i>tyrS</i> -HisTag- <i>cat</i> -Fragments	111	
4.5.2	Integration des <i>tyrS</i> -HisTag- <i>cat</i> -Fragments in das <i>Salmonella typhi</i> Ty21a Genom	114	

4.5.3	Excision des <i>tyrS</i> -HisTag- <i>cat</i> -Fragments	117
4.6	Charakterisierung des Knockout-Stammes	121
4.6.1	Wachstumskurven von <i>Salmonella typhi</i> Ty21a Stämmen	121
4.6.2	Plasmidstabilitätstests	121
4.6.3	Proteinexpressionstests	123
5.	Diskussion und Ausblicke	Seite 127
6.	Zusammenfassung	Seite 141
7.	Literatur-, Buch- und Bildnachweis	Seite 144
8.	Abkürzungen und DNA-Leiter	Seite 156
9.	Danksagung und Lebenslauf	Seite 160

1. Einleitung

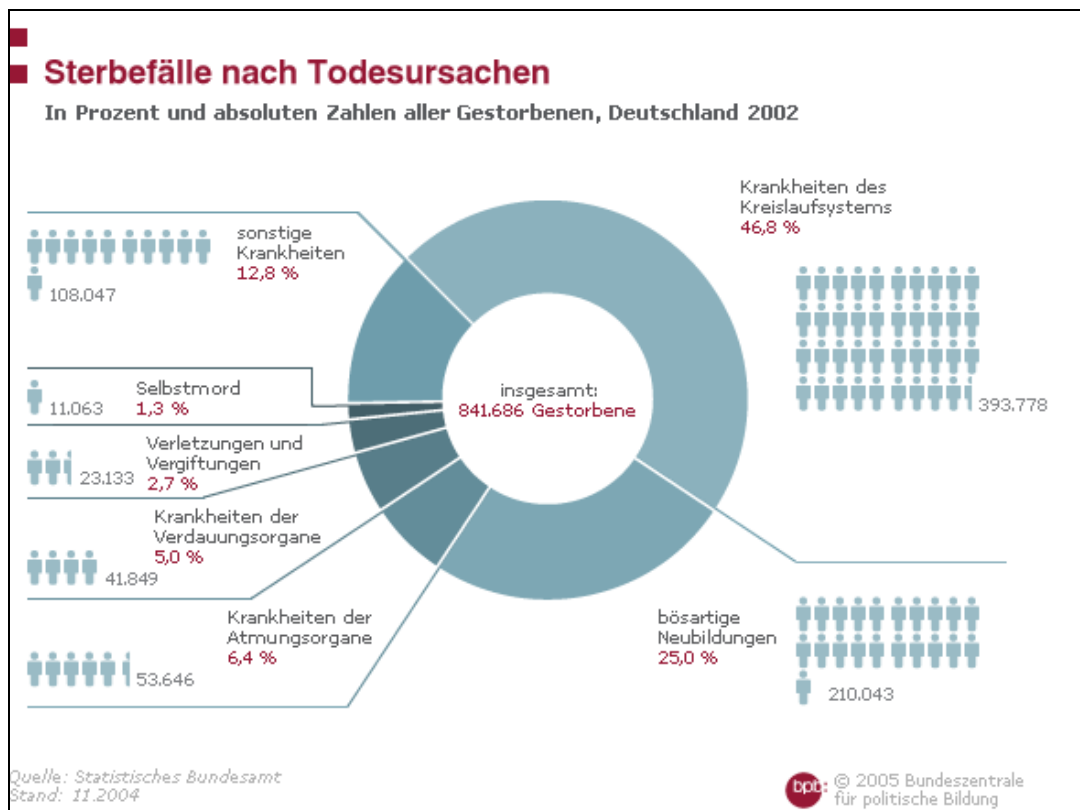
1.1 Krebs

1.1.1 Krebs – eine häufige Erkrankung

Krebs bezeichnet in der Medizin einen malignen, mesenchymalen bzw. epithelialen Tumor.

Jedes Organ des menschlichen Körpers kann prinzipiell von Krebs befallen werden; es gibt jedoch Häufigkeitsunterschiede nach Alter, Geschlecht, geographischer Region, Lebensumständen usw. (Böcker *et al.* 2004)

Wie die Grafik des Statistischen Bundesamtes zeigt, sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Jeder Vierte stirbt an einer Form der unbegrenzten Proliferation eigener Körperzellen.



(Abbildung: 1; Sterbestatistik)

Bei malignen Zellen ist die Abstimmung der Teilungs- bzw. Apoptoserate im Zellverband außer Kraft gesetzt. Aufgrund eines Defektes im genetischen Code werden regulierende Signale nicht mehr erkannt, und die Zelle beginnt sich ungehemmt zu teilen. Die Ursachen für die Schäden des Gen-Materials liegen entweder kongenital oder wurden im Lauf des Lebens durch verschiedenste Noxen erworben. (Böcker *et al.* 2004)

Durch die Entartung des Gewebes entstehen häufig neue Zelleigenschaften wie z.B. das Wachstum unter Sauerstoffmangel, der Aufbau eines eigenen Blutversorgungssystems und die Fähigkeit den Gewebeverband zu verlassen. (Alberts *et al.* 2003; Kuby *et al.* 2003)

Erst durch letztere Eigenschaft erlangt der Krebs seine tödliche Potenz. Die meisten Patienten sterben nicht am Primärtumor, sondern an der Absiedelung von Metastasen überall im Körper. (Classen *et al.* 2004)

Das Immunsystem versucht zwar die entarteten Zellen zu vernichten, da diese jedoch den „gesunden“ Körperzellen stark ähneln, fällt die Immunreaktion meist zu gering aus um die Krebs-Zellen zu vernichten.

(Böcker *et al.* 2004; Classen *et al.* 2004)

1.1.2 Therapieansätze

Trotz immer neuer Erfolge bei der Krebsdiagnostik, ist es auf dem Gebiet der Tumortherapie noch selten gelungen nebenwirkungsarme Arzneimittel zu finden die entartete Zellen selektiv bekämpfen. Deshalb sind verschiedenste Formen der Krebstherapie das Objekt intensiver medizinischer Forschung.

1.1.2.1 Konventionelle Methoden

Die vollständige chirurgische Entfernung von Primärtumoren (R0-Resektion) stellt häufig noch immer das effizienteste Verfahren zur Heilung eines krebserkrankten Patienten da. Die rein operative Herangehensweise kann jedoch

nur dann erfolgversprechend sein, wenn der Tumor nicht gestreut hat und eine komplette Entfernung möglich ist. (Böcker *et al.* 2004)

Häufig wird die Krebserkrankung jedoch erst zu einem Zeitpunkt erkannt, wenn bereits verschiedene Organsysteme befallen sind.

Neben einer Operation ist die Radiotherapie eine weitverbreitete Therapieoption. Durch Applikation von radioaktiven Stoffen bzw. den „Beschuss“ eines Tumors mit verschiedenen hochenergetischen Strahlen wird versucht die entarteten Gewebe zu zerstören. Meist kann durch die Radiotherapie jedoch lediglich eine Reduktion der Tumormasse erzielt werden, da sich einige maligne Zellen als strahlenresistent erweisen. Eine wichtige Rolle spielen die radiologischen Verfahren jedoch bei der adjuvanten bzw. neoadjuvanten Therapie. (Classen *et al.* 2004)

Bei den verschiedenen Formen der Leukämie und bei bereits metastasierten Tumoren nimmt die Medikamentenbehandlung eine wichtige Rolle ein. Die Zytostatika haben dabei die Aufgabe die Krebszellen an ihrer Vermehrung zu hindern, bzw. diese zu stoppen. Die Chemotherapeutika sind jedoch wenig spezifisch und schädigen auch „gesunde“ Zellen, was zu massiven Nebenwirkungen führt. (Classen *et al.* 2004)

1.1.2.2 Immuntherapien

1.1.2.2.1 Allgemeine Prinzipien

Immuntherapie im Allgemeinen bezeichnet die Beeinflussung des Immunsystems.

Immuntherapeutische Verfahren werden in vielen Bereichen der Medizin erprobt und angewendet. Exemplarisch sei hier die Behandlung von Allergien, Infektions- und Autoimmunkrankheiten genannt.

Auch im Kampf gegen Krebs stellt die Immuntherapie einen vielversprechenden Ansatzpunkt da. (Huber *et al.* 2008)

Die Erkenntnis ist dabei nicht neu, dass das aktivierte Immunsystem zur rückläufigen Entwicklung von Tumorherden beiträgt. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts beschreibt *Dr. William Coley* den Fall eines Patienten mit einem Sarkom im Bereich der linken Wange:

Nach dem erfolglosen Versuch der operativen Entfernung des Tumors kam es zu einer Infektion der Wunde mit *Streptokokkus pyogenens* und sehr hohen Fieberschüben. Erstaunlich war jedoch, dass bei jedem Fieberschub eine Verkleinerung des Tumors festzustellen war. Es kam bei dem Patienten zu einer kompletten Ausheilung des Sarkoms.

(Hopton Cann *et al.* 2003)

Die onkologische Immuntherapie basiert heute in vielen Bereichen auf der Entdeckung von tumorspezifischen Antigenstrukturen.

1991 gelang Bruggen *et al.* die Identifizierung von Antigen (M22-E) auf humanen Melanomzellen, das für diese mutierten Zellen spezifisch ist.

(van der Bruggen *et al.* 1991)

Veränderungen der präsentierten Polypeptide durch die Zelle können auf struktureller Ebene stattfinden. Ebenso können die Proteine in unphysiologisch hohem Maße sezerniert werden oder ihre Sekretion ist ektopisch lokalisiert. Die selbstständige Aktivierung des adaptiven Immunsystems kann jeweils eine mögliche Folge sein. Die ausgelöste Immunreaktion ist jedoch meist insuffizient und die Immuntoleranz des Abwehrsystems gegen körpereigene Zellen verhindert eine nachhaltige Zerstörung des entarteten Gewebes.

(van der Bruggen *et al.* 1991; Lonchay *et al.* 2004;)

Die gezielte Nutzung tumorspezifischer Antigene bietet die Möglichkeit eine Reaktion des Immunsystems gegen Krebsarten mit definierten

Antigenstrukturen zu triggern. (Kobayashi *et al.* 2003; Ottaviani *et al.* 2005)

Renkvist *et al.* hat eine Übersicht über bekannte humane Tumorantigene und deren T-Zellepitope zusammengestellt:

Castelli *et al.* 2000; Renkvist *et al.* 2001; Graham *et al.* 2006; Ottaviani *et al.* 2006; van der Bruggen *et al.* 2006; Graham *et al.* 2007.

Neben tumorspezifischen Antigenen kommen auch andere immunmodulierende Substanzen in der onkologischen Therapie zum Einsatz. Als Beispiel sei hier die Substanz *Imiquimod* genannt, die eine lokale Immunreaktion auslöst und in der Dermatologie zur Therapie von Basalzellkarzinomen verwendet wird. (Fritsch *et al.* 2003)

1.1.2.2 Mikrobielle Immuntherapie

Um mit Hilfe der tumorspezifischen Antigene eine gezielte Immunreaktion auslösen zu können, müssen die spezifischen Proteine durch antigentragenden Makrophagen bzw. dendritische Zellen gegenüber dem T-Zell System präsentiert werden. (Gentschev *et al.* 2000; Spreng *et al.* 2000)

Bakterien oder Viren können hierbei die Aufgabe der „Beladung“ der antigenpräsentierenden Zellen mit spezifischen Proteinen übernehmen. (Dietrich *et al.* 2001) Intrazelluläre Bakterien wie *Salmonellen* oder *Listerien* in die tumorspezifische Antigene integriert wurden, können von Zellen des monozytären Phagozytensystems aufgenommen werden. Verfügen die absorbierten Bakterien über ein Sekretionssystem können sie das spezifische Antigen an das Zytosol der antigenpräsentierenden Zelle abgeben.

Makrophagen und dendritische Zellen sind daraufhin in der Lage das tumorspezifische Antigen auf MHC I und MHC II Molekülen zu präsentieren.

Über die Bindung mit CD4 bzw. CD8 Komplexen von T-Helfer bzw. zytotoxischen T-Zellen kommt es zu deren Aktivierung.

Die Ausschaltung der Toleranz des Immunsystems gegenüber entarteten Zellen und die gezielte Stimulierung von humoraler und zellulärer Immunantwort bieten völlig neue Chancen in der Krebstherapie. (Gentschev *et al.* 2002; Gentschev *et al.* 2005)

Neben der Modulation des Immunsystems können Bakterien aber auch als Marker von Tumoren oder als Aktivator von toxischen Medikamenten in der Krebstherapie in Zukunft eine wichtige Rolle spielen.

(Rapp *et al.* 2005) (Springer *et al.* 2005)

Die Literatur zeigt hierzu zahlreiche interessante Perspektiven:

Tjuvajev *et al.* 2001; Wang *et al.* 2002; Yu *et al.* 2004; Yu *et al.* 2003; Belas *et al.* 1982; Kasinskas *et al.* 2006; Belas *et al.* 1982; de Wet *et al.* 1987; Yu *et al.* 2004; Cunningham *et al.* 2001; Pawelek *et al.* 2003; Liu *et al.* 2002.

1.2 Salmonellen als bakterielle Tumorstoffe

1.2.1 Charakterisierung von Salmonellen

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Salmonella typhi* Ty21a Stamm handelt es sich um eine Subspezies der *Salmonella*-Enterobakterien.

Salmonellen sind Gram-negative, 2-3 µm große, sporenlose, bewegliche, fakultativ anaerob lebende, nicht-Lactose fermentierende Stäbchenbakterien, die zur Familie der Enterobacteriaceae gezählt werden. (Köhler *et al.* 2001)

Salmonellen gehören zu den Zoonosen, die auf fäkal-oralem Weg sowohl Menschen als auch Tiere infizieren können.

Aufgrund verschiedener Antigenstrukturen (O-Antigen – Oberflächenantigen, H-Antigen – Geißelantigen, K-Antigen – Kapselantigen) lassen sich nach dem Kaufmann-White-Schema rund 2200 verschiedene Serovaren abgrenzen.

Nimmt man die Epidemiologie als Grundlage der Einteilung, lassen sich humanpathogene *Salmonellen*, tierpathogene *Salmonellen* und *Salmonellen* ohne spezielle Wirtsanpassung unterscheiden.

(Mastroeni, *et al.* 2001; Chabalgoity *et al.* 2002) (Köhler *et al.* 2001)

Salmonella typhi Ty21a ist eine attenuierte Mutante des pathogenen Stammes *Salmonella typhi*, Erreger des Typhus abdominalis. *Salmonella typhi* Ty21a weist unter anderem aufgrund einer Mutation im *galE*-Gen einen Defekt im Galaktosidasstoffwechsel auf. Ein Hauptmerkmal dieser attenuierten *Salmonella*-Mutante ist der Mangel des Enzyms UDP-Galaktose-4-Epimerase. Dadurch kommt es - in Gegenwart von Galaktose - bei der Synthese der Zellwand-Lipopolysaccharide zur Akkumulation von toxischen Mengen an

Galaktose-1-Phosphat und UDP-Galaktose, was zur Inaktivierung und Lyse des Bakteriums führt. (Germanier *et al.* 1975)

Die Infektion des Menschen mit *Salmonella typhi* Ty21a erzeugt eine Immunität gegen *Salmonella typhi*, den Auslöser des *Typhus abdominalis*.

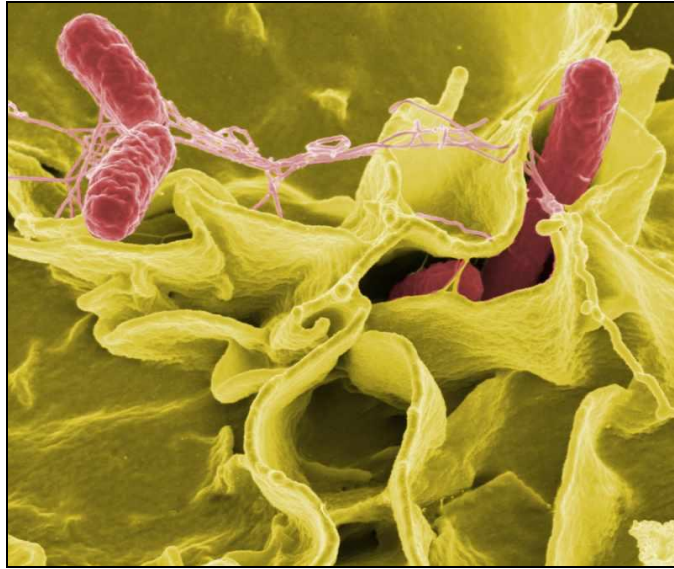
Da sich *Salmonella typhi* Ty21a nach wenigen Tagen selbst lysiert, wird keine Typhus-Infektion hervorgerufen. (Germanier *et al.* 1975; Hornick *et al.* 1976; Gilman *et al.* 1977)

Salmonella typhi Ty21a wird über die Mukosa des Magen-Darmtrakts aufgenommen, wobei die Haupteintrittspforte die Peyer'schen Plaques (Ansammlung von Lymphfollikeln) des Ileums darstellen. Der direkte Kontakt mit dem mucosa-associated-lymphoid-tissue (MALT) ermöglicht eine intensive Immunreaktion. (Germanier *et al.* 1975)

Wegen der hohen Immunogenität und der einfachen Applikation der *Salmonellen* werden diese attenuierten Enterobacteriaceae nicht nur als Impfstoff gegen *Salmonella typhi* Infektionen benutzt; sondern sie dienen auch zur Immunisierung gegen zahlreiche Antigene verschiedener Herkunft.

Die Literatur zeigt hierfür viele Beispiele:

Chatfield *et al.* 1993; Chatfield *et al.* 1994; Mastroeni *et al.* 2001; Ohl *et al.* 2001; Chabalgoity *et al.* 2002; Pasetti *et al.* 2000; Pickett *et al.* 2000; Chabalgoity *et al.* 1995; Vrtala *et al.* 1995; Srinivasan *et al.* 1995.



(Abbildung: 2; kolorierte EM-Aufnahme von Salmonellen *typhi*)

Das Grundprinzip des Einsatzes von *Salmonella*-Stämmen als Impfstoffe gegen verschiedene Antigene basiert auf der effektiven Präsentation und Sekretion von Antigenen gegenüber dem Immunsystem und der Induktion einer humoralen und zellulären Immunreaktion. (Gentshev *et al.* 2000)

Häufig auftretende Schwierigkeiten sind:

Die Instabilität des antigentragenden Plasmids; die Toxizität des präsentierten Antigens für den Impfstamm und die strukturelle Modifikation des zu präsentierenden Antigens durch das Bakterium.

(Mastroeni *et al.* 2001)

Gegen diese Probleme sind Lösungsstrategien entwickelt worden:

Um die Plasmidstabilität *in vivo* zu erhöhen werden Balanced lethal Systeme eingesetzt. (siehe Kapitel 1.2.3)

Die Verwendung des *E. coli* Hämolysin- α -Sekretionssystem verhindert die Modifikationen des zu präsentierenden Antigens. (siehe Kapitel 1.2.2.1)

Um die Toxizität des Antigenprodukts für das Bakterium zu senken, sollte die Kopienzahl des Antigens im Wirtsbakterium das nötige Maß, um eine Immunreaktion im Zielorganismus zu erzielen, nicht übersteigen.

In der Literatur sind jedoch Beispiele beschrieben, laut derer high-copy Plasmide einen höheren Grad an Immunantwort erzielen.

Häufig erhält man jedoch mit low-copy Plasmiden eine größere Stabilität des Plasmidsystems im Impfstamm.

Es muss deshalb immer ein Gleichgewicht zwischen nötiger Kopienzahl des Antigens für die Induktion einer Immunreaktion und der Toxizität des Antigens für den Wirtsstamm herrschen.

(Molina *et al.* 1990; Doggett *et al.* 1993; Covone *et al.* 1998)

Der Einsatz der vielseitigen *Salmonella*-Stämme als Antigeneträger von Tumorantigenen wurde 1998 von Paglia *et al.* durchgeführt.

Im Rahmen von DNA-delivery wurde der attenuierter *Salmonella typhimurium* AroA (SL 7207)-Stamm dazu genutzt das beta-Galaktosidase (*beta-gal*)-Gen unter der Steuerung eines prokaryontischen *Cytomegalievirus* Promotors zu exprimieren. Das *beta-gal*-Gen ist ein tumor-assoziiertes Antigen des Fibrosarkoms. Durch die Applikation des Impfstammes konnte eine zelluläre und humorale Immunantwort im Mausmodell induziert werden. (Paglia *et al.* 1998; Medina *et al.* 1999; Medina *et al.* 2000)

1.2.2 *Salmonella*-Stämme als Vakzine in der Arbeitsgruppe

Aufgrund der im Kapitel 1.2.1 beschriebenen Eigenschaften der Salmonellen eignet sich dieser Enterobakterien-Stamm besonders für die Entwicklung von Bakterien gestützten Tumorimpfstoffen.

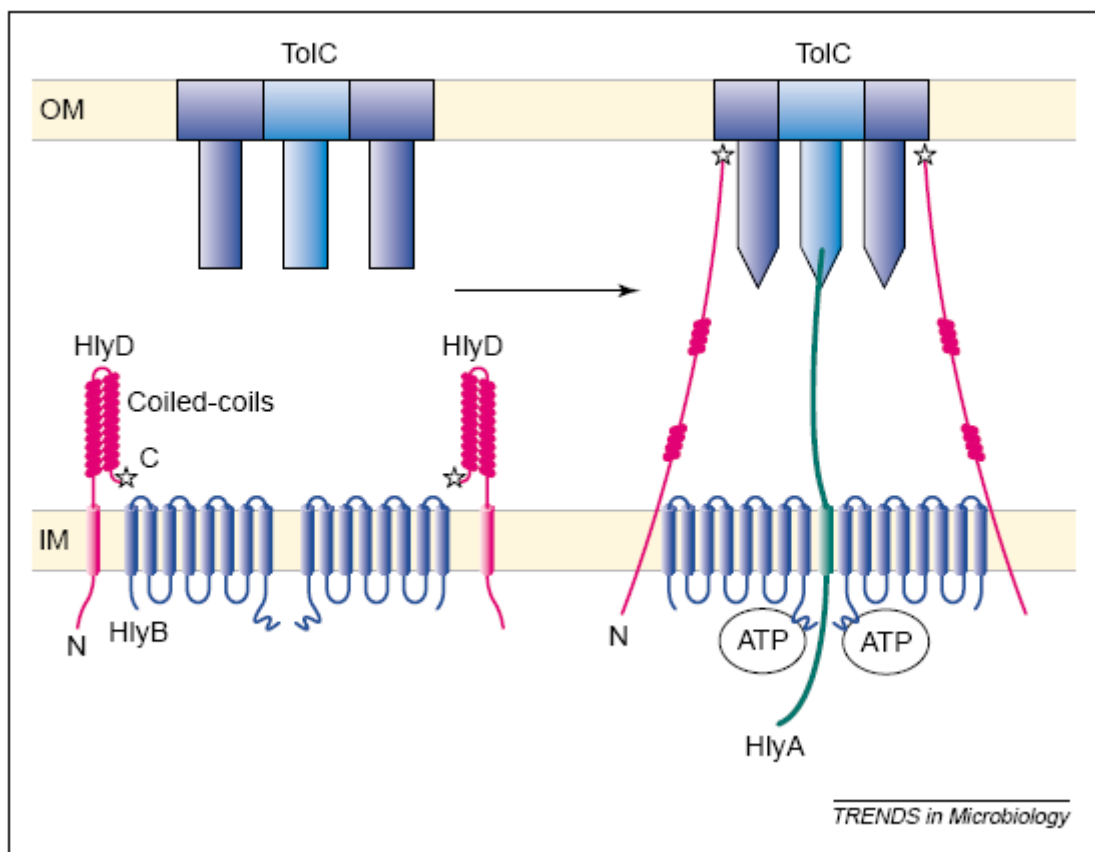
1.2.2.1 Hämolyisin- α -Sekretionssystem

Gram-negative Bakterien sezernieren eine große Bandbreite verschiedenster Proteine. Dafür stehen ihnen im Wesentlichen vier Sekretionssysteme zur Verfügung.

(Filloux *et al.* 2002; Ize *et al.* 2002; Hueck 1998)

Prototyp des Typ I Sekretionsmechanismus ist das *Escherichia coli* Hämolyysin-Transportsystem das z.B. in den uropathogenen *Escherichia coli*-Stämmen vorkommt.

Die eigentliche Aufgabe dieses Typ I Exportsystems ist die Sekretion des Hämolyysin- α -Proteins, das für die Lyse von eukaryontischen Zellen und Erythrozyten verantwortlich ist. (Gentschev *et al.* 2002)



(Abbildung: 3; Hämolyysin- α -Sekretionssystem)

Dabei unterscheidet sich dieses Typ I System von den anderen Exportmechanismen in wesentlichen Punkten:

1. Es besteht aus nur drei Proteinkomponenten: HlyB und HlyD, welche in der inneren Membran liegen, und das TolC-Protein, das eine multifunktionale Pore in der äußeren Membran bildet.
2. Die drei Einzelkomponenten bilden eine direkte Verbindung der inneren und äußeren Zellmembran und ermöglichen eine direkte, Sec-unabhängige Proteinausschleusung ohne die Bildung von Zwischenprodukten.

3. Verschiedenste Proteinprodukte, die an ihrem C-terminalen Ende mit einer 50 bis 60 Aminosäuren langen Signalsequenz (HlyA_S) verbunden sind, werden durch das HlyA-Sekretionssystem erkannt und aus der Bakterienzelle ausgeschleust.
 4. Die durch das System exportierten Proteine können in ihrer Größe von 20 bis über 1000 Aminosäuren variieren und sowohl eukaryontischen als auch prokaryontischen Ursprungs sein.
 5. Die Gensequenzen für die einzelnen Komponenten des Exportsystems können auf Plasmiden lokalisiert sein und sind somit für Modifikationen leicht zugänglich.
- (Spreng *et al.* 1999; Gentschev *et al.* 2002; Gentschev *et al.* 2004)

Aufgrund der geringen Spezifität des Hämolyisin- α -Sekretionssystem bzgl. der zu sezernierenden Proteine, der möglichen Lokalisation auf Plasmiden und des einfachen Aufbaus, bietet das *E. coli* Sekretionssystem die Möglichkeit der verschiedenartigen Verwendung. (Dobereiner *et al.* 1996)

Im Rahmen des Projekts „Bakterielle Tumorthherapie“ wird das Hämolyisin- α -Sekretionssystem dazu benutzt, tumorspezifische Antigene wie z.B. das C-Raf-Protein (Vorkommen bei Lungentumoren bzw. Melanomen) oder PSA (vermehrtes Vorkommen bei Prostataatumoren) durch Salmonellen zu sezernieren.

In vivo wurden tumortragende Mäuse mit den *Salmonella*-Vakzinstämmen infiziert. Es konnten C-Raf-Antikörper und eine T-Zell Immunantwort gegen das tumorspezifische Antigen festgestellt werden. Ebenfalls manifestierte sich eine Wachstumsreduktion von Lungentumoren bei den infizierten Tumormäusen. (Gentschev *et al.* 2005)

1.2.2.2 Antigenelivery Plasmid pMO

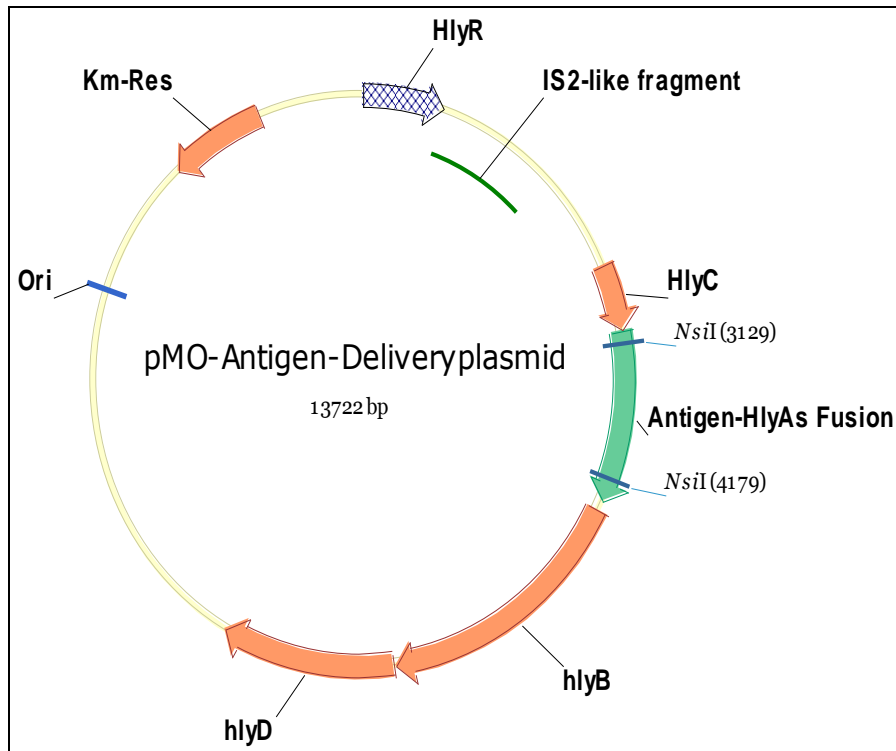
Das beschriebene Hämolysin- α -Sekretionssystem und das tumorspezifische Antigen (z.B. PSA oder C-Raf) sind auf dem ca. 14000 bp großen Plasmid pMO-hly1 lokalisiert. (Gentschev *et al.* 2005) Da das pMO-Plasmid im Bakterium mehrfach vorhanden ist, werden insgesamt höhere Antigenpräsentationsraten erzielt, als wenn beide Komponenten in lediglich einer Kopie auf dem Bakteriengenom kodiert wären. Durch das gesteigerte Antigenexpressionslevel kann im Zielorganismus deshalb eine stärkere Immunantwort erreicht werden.

(Mastroeni *et al.* 2001; Chabalgoity *et al.* 2002; Curtiss 2002)

Zur Stabilisierung des Antigenelivery Plasmids im *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Trägerstamm enthielt es ein Antibiotikaresistenzgen das, durch Expression von Betalaktamase, eine Unempfindlichkeit gegenüber Ampicillin erzeugte. (Gentschev *et al.* 2004)

Seitens der Behörden wird die Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in Impfstoffen zunehmend restriktiv gehandhabt. Da der Einsatz von Ampicillin-Resistenzen in Form des Betalaktamase-Resistenzgens (*bla*-Gen) in bakteriellen Impfstämmen verboten wurde, wurde dieses Resistenzgen gegen eine Kanamycinresistenzkassette ausgetauscht, welche von Flipase-Recognitions-Sites begrenzt wird.

Dieser Austausch hat sich für die Entwicklung des Balanced lethal Systems als sehr nützlich erwiesen.



(Abbildung 4; pMOhly1-Antigendelivery Plasmid Karte)

Km-Res: Kanamycinresistenzgen (*nptII*-Gen)

HlyC: Acyltransferase zur Aktivierung von HlyA (Stanley *et al.* 1998)

HlyB/D : Bildung des Sekretionsapparats mit TolC (Gentschev *et al.* 2002)

HlyR : Verstärkt die Bildung von α -Hämolsin (Vogel *et al.* 1988)

Antigen-: Integrationsite zur Integration von tumorspezifischen

HlyAs- Antigenen über NsiI-Schnittstellen(z.B. PSA)

Fusion:

IS2-like: Sequenzen, die die Rekombination zwischen homologen

fragment Sequenzen auf Chromosomen und Plasmiden erleichtert

(Rijavec *et al.* 2007) Dies birgt jedoch die Gefahr der Rekombination mit dem humanen Genom bei späteren Anwendung im Menschen.

NsiI: Schnittstelle

1.2.3 Stabilisierung von Plasmiden

Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien können extrachromosomale Replikons, so genannte Plasmide, enthalten, die stark in ihrer Größe und Kopienzahl variieren. Für die Gentechnik bieten Plasmide die Möglichkeit ohne großen Aufwand genetische Modifikationen eines Bakteriums vornehmen zu können. Da die Plasmide im Gegensatz zum Chromosom keine essentiellen Gene für das Bakterium enthalten, können sie bei der Zellteilung verloren gehen.

Plasmide werden nur dann über Bakteriengenerationen konstant repliziert, wenn sie einen Selektionsvorteil für das Bakterium enthalten. Es wurden deshalb verschiedene Arten von Plasmidstabilisierungssystemen entwickelt. (del Solar *et al.* 1998; del Solar *et al.* 2000)

Im Rahmen des Forschungsprojektes „Bakterielle Tumorthherapie“ werden *Salmonella*-Stämme mit dem beschriebenen Antigendelivery Plasmid pMO dazu benutzt tumorspezifische Antigene zu produzieren und zu sezernieren. Die Stabilität des pMO-Plasmids ist dabei von größter Bedeutung für die effiziente Produktion und Sekretion des tumorspezifischen Antigens. (Curtiss *et al.* 2002; Gentshev *et al.* 2005)

1.2.3.1 Mit Antibiotikaresistenzen

Eine Möglichkeit der Stabilisierung von Plasmiden *in vitro* ist die Integration von Antibiotikaresistenzgenen. Wird der Bakterienstamm unter Antibiotikaselektionsdruck fermentiert, so können nur diejenigen Bakterien überleben, die das Plasmid mit dem Resistenzmarker enthalten.

In vivo ist die Möglichkeit einen konstanten Antibiotikaselektionsdruck auf die Bakterien auszuüben nicht gegeben. Zudem wird der Einsatz von bakteriellen Impfstoffen mit Antibiotikaresistenzgenen seitens der Behörden zunehmend restriktiv behandelt.

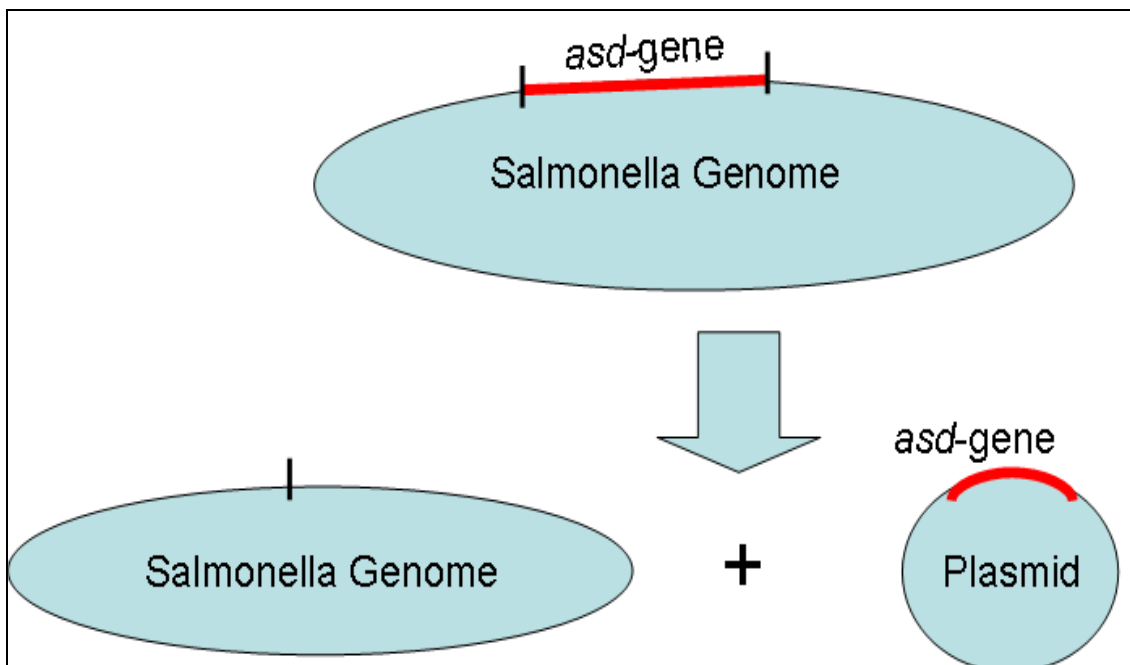
1.2.3.2 Mit Balanced lethal Systemen

Um die Anwendung von Antibiotika stabilisierten Plasmidsystemen zu umgehen, wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von Alternativen entwickelt.

1.2.3.2.1 Allgemeine Prinzipien

Eine Möglichkeit die Plasmidstabilität ohne Antibiotikaresistenzgene zu sichern, bieten aktive und passive Balanced lethal Systeme. (Curtiss *et al.* 1990)

Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre entwarfen Nakayama und Curtiss ein Plasmidstabilitätssystem auf der Basis des *asd*-Gens, das die Aspartat- β -Semialdehyd-Dehydrogenase kodiert. Das Enzym ist bei der Bildung der Pimelinsäure (Heptandisäure) beteiligt, die einen wichtigen Bestandteil der Peptidoglykanschicht Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien darstellt.



(Abbildung: 5; Prinzip der Plasmidstabilisierung nach Curtiss *et al.*)

Das Gen wurde aus dem Bakterienchromosom deletiert und auf einem Plasmid komplementiert.

Da die Pimelinsäure (Heptandisäure) in tierischem Gewebe nicht vorkommt, ist die Fähigkeit diesen Peptidoglykanschicht-Bestandteil synthetisieren zu können für das Überleben der Bakterien essentiell. Der Verlust des Plasmids mit dem darauf kodierten *asd*-Gen führt zum raschen Absterben des Bakteriums.

(Curtiss *et al.* 1990; Tacket *et al.* 1997; Spreng *et al.* 2005)

Neben dem beschriebenen passiven Balanced lethal System existieren auch aktive Mechanismen, die auf einem Toxin-Antitoxin-System basieren. Franch *et al.* beschreibt ein zwei Komponenten-System (hoc/soc-System), welches die Plasmidstabilität in Bakterien erhöht.

(Franch *et al.* 1999; Galen *et al.* 1999; Spreng *et al.* 2005)

Pilgrim *et al.* entwickelte in Listerien ein Stabilisierungssystem auf der Basis eines essentiellen Gens der Proteinbiosynthese.

Pilgrim deletierte das *trpS*-Gen, das die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase kodiert, aus dem Chromosom von *Listeria monocytogenes* und komplementierte es auf einem DNA-delivery Plasmid. Das Balanced lethal System konnte das Komplementationsplasmid sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stabilisieren.

Zudem ist das System unabhängig von Zusätzen im Nährmedium und kann nicht durch das zufällige Vorhandensein der Komplementationssubstanz in der Umgebung umgangen werden

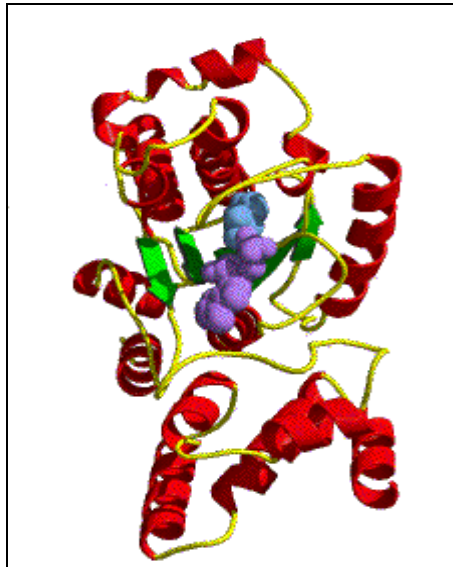
(Pilgrim *et al.* 2003).

Für die Erhöhung der Plasmidstabilität in *Salmonella*-Stämmen ist die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase jedoch ungeeignet, da das *trpS*-Gen mehrfach auf dem Bakterienchromosom vorhanden ist und somit nicht einfach chromosomal deletiert werden kann.

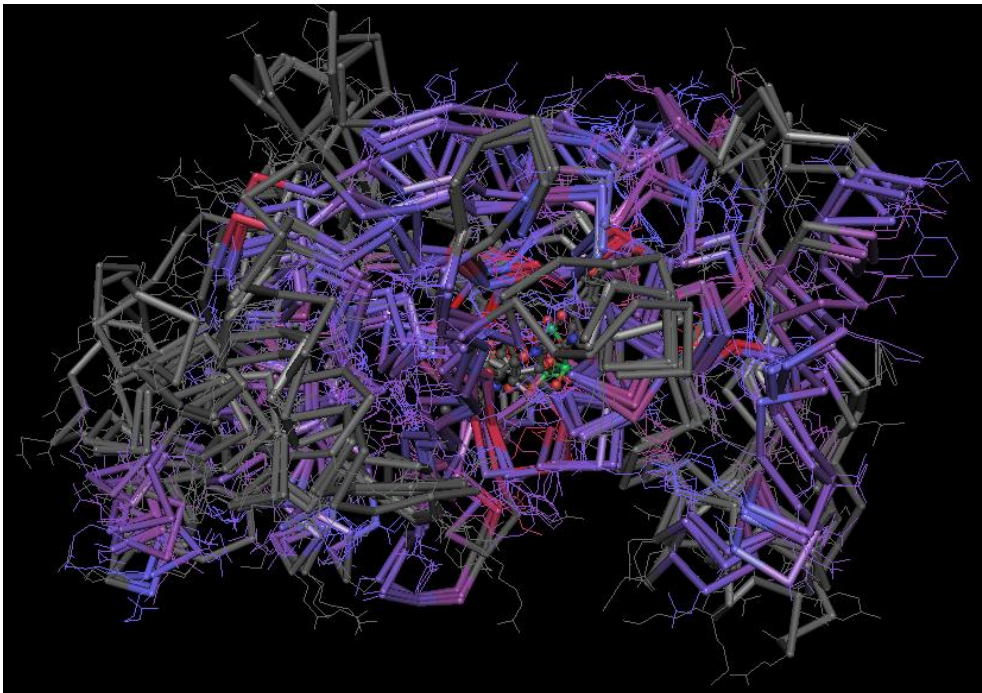
Bei der Entwicklung eines Systems, um das Antigen-delivery Plasmid pMOhly1 (Gentschev *et al.* 1996) zu stabilisieren, muss deshalb ein anderes essentielles Gen benutzt werden, das im *Salmonella*-Genom nur in einer Kopie vorkommt.

1.2.3.2.2 Verwendung des *tyrS*-Gens

Für die Stabilisierung des Antigendelivery Plasmids pMO im *Salmonella*-Impfstamm, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Balanced lethal System auf der Basis des vermutlich essentiellen Tyrosyl-tRNA-Synthetas-Gens (Wakasugi *et al.* 1998; Woese, *et al.* 2000; Gerdes *et al.* 2003) entwickelt.



(Abbildung: 6; Funktionsmodell der Tyrosyl-tRNA-Synthetase)



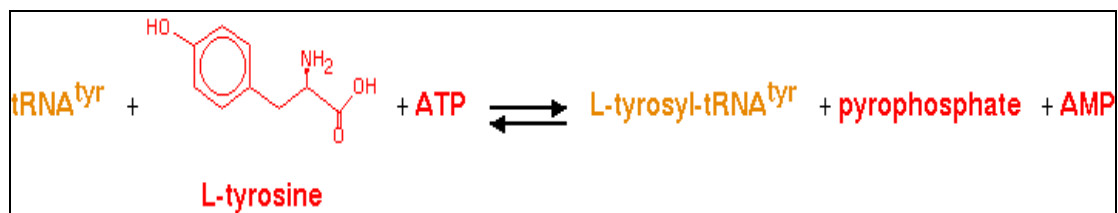
(Abbildung: 7; 3D-Modell der Tyrosyl-tRNA-Synthetase)

Das essentielle Enzym (Wakasugi *et al.* 1998) katalysiert in zwei Schritten die Verbindung der Tyrosin-Aminosäure mit seiner spezifischen tRNA:

1. Aktivierung der Aminosäure: Unter Abspaltung von Pyrophosphat kommt es zu einer Verbindung der Carboxylgruppe von Tyrosin mit dem Adenosinmonophosphatrest von ATP. Es entsteht ein Aminosäure-Adenylsäure-Anhydrid.

2. Bindung an die tRNA: In einem zweiten Schritt wird innerhalb des Aminoacyl-tRNA-Synthetaseenzym die AMP-gebundenen Carboxylgruppe von Tyrosin auf die Hydroxylgruppe des 3'- Endes der tRNA übertragen. Es kommt dadurch zur Ausbildung einer Esterbindung zwischen der Hydroxylgruppe der Ribose des 3'-Endes der tRNA und der Carboxylgruppe der Aminosäure.

Danach löst sich das Aminoacyl-tRNA Molekül und der AMP-Rest vom Tyrosyl-tRNA-Synthetase-Enzym ab. (Alberts *et al.* 2003)



(Abbildung: 8, Reaktionszyklus)

Das in *E. coli* untersuchte *tyrS*-Gen liegt auf dem Bakteriengenom zwischen dem *pdxH*-Gen, das die Pyridoxin-Phosphat-Oxidase kodiert und dem *pdxY*-Gen, das die Gensequenz des Pyridoxalkinase-2-Proteins bzw. des Pyridoxin-Kinase-Proteins enthält.

An das *pdxY*-Gen schließt sich das *gst*-Gen an, das die Glutathion S-transferase kodiert.

Lam und Winkler konnten in *E. coli* zeigen, dass das *tyrS*-Gen, das *pdxH*-Gen und das *pdxY*-Gen ein komplexes Operon bilden. So wird ein kleiner Teil der *tyrS*-Transkriptionen durch den *pdxH*-Promotor initiiert, wohingegen der Großteil der Tyrosyl-tRNA-Synthetase-Produktion durch den *tyrS*-Promotor ausgelöst wird. Es folgert daraus, dass das *pdxH*-Gen ausschließlich zusammen mit dem *tyrS*-Gen abgelesen wird.

Die relative Stärke des *tyrS*-Promotors könnte zweierlei Ursachen haben:
Die AT-reiche Sequenz und die Fis-Protein-Bindungs-Regionen oberhalb des *tyrS*-Promotors. (Lam *et al.* 1992)

Weiterhin wurde kein unabhängiger Promotor für das *pdxY*-Gen nachgewiesen, weshalb das *pdxY*-Gen vermutlich immer mit dem *tyrS*-Gen zusammen transkribiert wird. Promotor für die Transkription des *pdxY*-Gens ist somit entweder der *tyrS*- oder der *pdxH*-Promotor.

Zwischen den *pdxH*-, *tyrS*-, *pdxY*- und *gst*-Regionen konnte kein *Rho*-Faktor unabhängiger Terminator identifiziert werden.

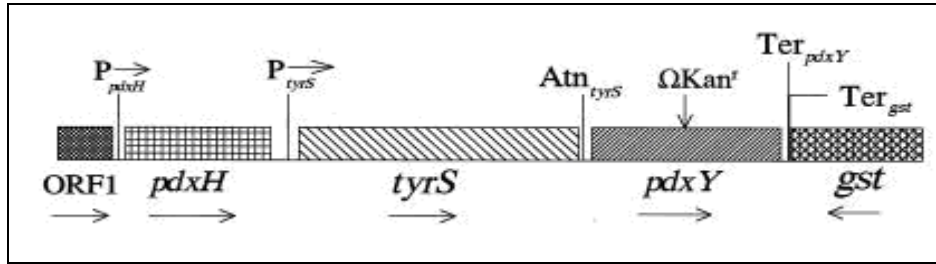
(Shigesada *et al.* 1984; Matsumoto *et al.* 1986; Hinde *et al.* 2005)

Die Tatsache, dass das *pdxY*-Gen immer mit dem *tyrS*-Gen zusammen abgelesen wird, der überwiegende Teil der *tyrS*-Transkriptionen aber in dem Gebiet zwischen dem *tyrS*- und dem *pdxY*-Gen enden, konnte durch einen *Rho*-Faktor-abhängigen Attenuator (*Atn_{tyrS}*) erklärt werden. Dieser ist zwischen den beiden Genen lokalisiert. Die Aufgabe dieser *Atn_{tyrS}* Sequenz scheint es zu sein, die Transkription des *pdxY*-Gens relativ zum *tyrS*-Gen zu senken.

Das *tyrS-pdxY*-Kotranskript endet an einem Terminator zwischen dem *pdxY*- und dem *gst*-Gen: *Ter_{pdxY}*.

Der Terminator des *gst*-Gens (*Ter_{gst}*), das in entgegengesetzter Richtung abgelesen wird, liegt ebenfalls in der Region zwischen dem *pdxY*- und dem *gst*-Gen. Manchmal enden die *gst*-Gen Transkriptionen jedoch nicht an dem *gst* Terminator, sondern führen zu einer Ablesung des *tyrS*-Gens in entgegengesetzter Richtung. Diese Ablesung bricht jedoch nach kurzer Zeit im *pdxY*-Gen ab.

Die Regulation der Expression des *tyrS*-Gens ist nicht genau bekannt. Erkenntnisse von anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetase Enzymen zeigen, dass Wachstumsraten und die vorhandene Aminosäurekonzentration beeinflussende Faktoren sind.



(Abbildung: 9; *tyrS*-Region in *E. coli*)

- P_{pdxH} : Promotor für *pdxH*-Gen, außerdem für *tyrS*-Gen, *pdxY*-Gen
- P_{tyrS} : Promotor für *tyrS*-Gen, außerdem für *pdxY*-Gen
- Atn_{tyrS} : Attenuator für *tyrS*-Transkription
- Ter_{pdxY} : Terminator für *pdxY*-Gen, außerdem für *pdxH*-Gen, *tyrS*-Gen
- Ter_{gst} : Terminator für *gst*-Gen

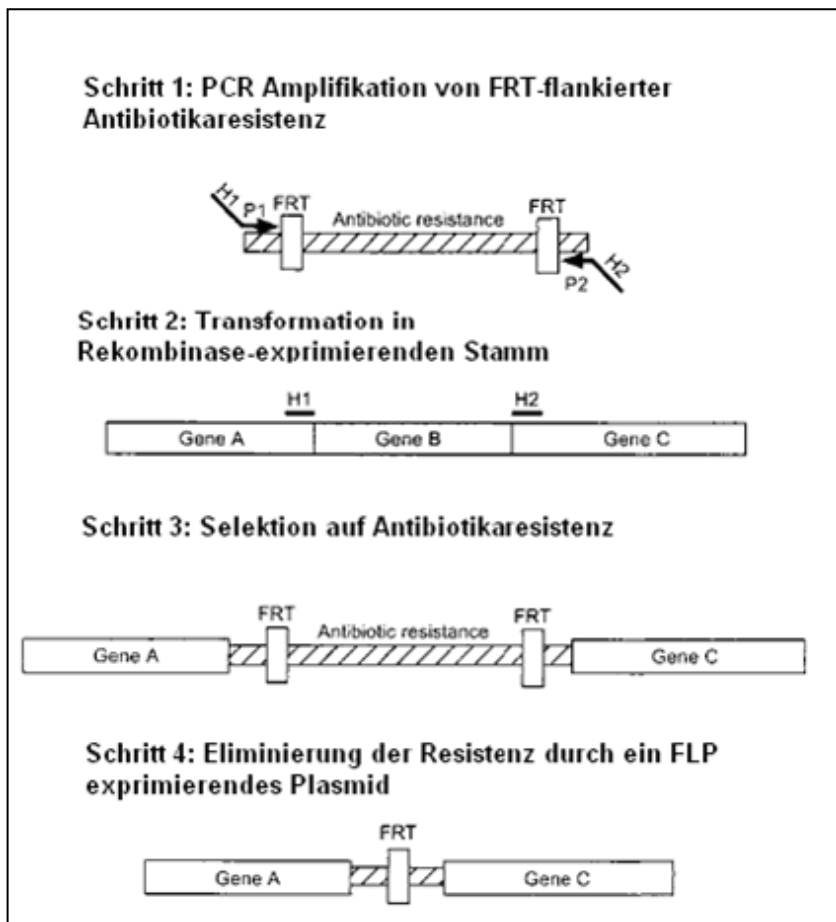
(Shigesada *et al.* 1984; Matsumoto *et al.* 1986; Lam *et al.* 1992; Di Salvo *et al.* 1998; Yang *et al.* 1998; Putzer *et al.* 2003)

1.2.3.2.3 Chromosomale Deletion nach Datsenko und Wanner

Zur Entwicklung eines Balanced lethal Systems für *Salmonella typhi* Ty21a wurde das Verfahren von Datsenko und Wanner „One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products“ (Datsenko *et al.* 2000) modifiziert.

Das Datsenko und Wanner Prinzip ermöglicht den Ersatz eines nicht essentiellen, chromosomal lokalisierten Gens durch ein lineares PCR-Fragment mit Hilfe der homologen Rekombination. (Datsenko *et al.* 2000)

Das Schaubild soll das Prinzip der Methode erklären:



(Abbildung: 10, Deletion nach Datsenko und Wanner)

Plasmid

pKD3

Plasmid

pKD46

Plasmid

pCP20

Beschreibung des Datsenko und Wanner Verfahrens:

Es wird zunächst mit dem PCR-Verfahren eine Antibiotikaresistenzkassette amplifiziert. Als Template dient das Hilfsplasmid pKD3.

Die flankierenden Enden des generierten DNA-Strangs sind komplementär zu Abschnitten auf dem Bakteriengenom, die das zu deletierende Gen begrenzen. Außerdem enthält das PCR-Fragment zwei FRT-Sites (Flipase-Recognition-Sites), die durch das Enzym Flipase erkannt werden. (Datsenko *et al.* 2000)

Der Austausch des Gens auf dem Bakteriengenom gegen das PCR-Fragment geschieht durch die Rekombinase, die auf dem Hilfsplasmid pKD46 kodiert ist.

Die Antibiotikaresistenzkassette wird anschließend durch eine Flipase-Rekombinase, die in das Hilfsplasmid pCP20 integriert ist, entfernt.

(Cherepanov *et al.* 1995; Murphy *et al.* 1998; Murphy *et al.* 2000)

Dieses Enzym erkennt die FRT-Sites, die das Antibiotikaresistenzgen flankieren und induziert eine homologe Rekombination zwischen den beiden Randbereichen. Dadurch wird die Antibiotikaresistenzkassette aus dem Bakteriengenom ausgeschnitten. Es bleibt eine FRT-Narbe auf dem Bakterienchromosom zurück.

(Murphy *et al.* 2003; Hussein *et al.* 2005; Hussein *et al.* 2006)

Für den Zweck der Etablierung eines Balanced lethal Systems wurde das Verfahren von Datsenko und Wanner im Rahmen dieser Arbeit jedoch modifiziert. Da es sich bei dem *tyrS*-Gen vermutlich um essentielles Gen handelt (Gerdes *et al.* 2003), kann es nur dann aus dem Genom deletiert werden, wenn es gleichzeitig komplementiert wird, da das modifizierte Bakterium sonst nicht lebensfähig ist.

1.3 Ziel der Arbeit

Die Arbeitsgruppe „Bakterielle Tumorthherapie“ am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Universität Würzburg unter der Leitung von Dr. rer. nat. Birgit Bergmann, Dr. biol. hum. Joachim Fensterle und Professor Dr. med. Ulf Rapp beschäftigt sich mit der Entwicklung von Krebsimpfstoffen auf der Basis von Bakterien-Stämmen.

Wichtige Eigenschaften der Vakzin-Bakterien sind dabei auf dem pMO-Plasmid lokalisiert. Für die Funktionalität des Salmonella-Impfstoffes ist die Stabilität des dieses Plasmids von großer Bedeutung. Der Einsatz von Antibiotikaresistenzkassetten zur Verhinderung des Plasmidverlustes beinhaltet jedoch zahlreiche beschriebene Probleme.

Das Ziel meiner Arbeit war deshalb die Konstruktion eines Stabilisierungssystems in *Salmonella Typhi* Ty21a für das Antigen-delivery Plasmid pMO unter Vermeidung des Einsatzes von Antibiotikaresistenzgenen.

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 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

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Blottingpapier 3 mm 190 g/m ²	Schleicher und Schüll
Caps 1,5 ml	Eppendorf
Caps 2.0 ml	Eppendorf
Caps PCR	Sarstedt
Elektroporationsküvetten	Peqlab
Greinerröhrchen 2 ml	Sarstedt
Greinerröhrchen 15 ml	Sarstedt
Greinerröhrchen 50 ml	Sarstedt
Nitrocellulose 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 bzw. 25 ml	Sarstedt

2.3 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Herkunft	Verwendungszweck
<i>Escherichia coli</i> DH5 α Laborstamm	MSZ, Würzburg	Klonierungsarbeiten, Gewinnung von <i>tyrS</i> -Gen
<i>Salmonella typhi</i> Ty21a Bestandteil von Impfstamm <i>Vivotif</i> [®]	Berna Biotech Ltd., Bern, Schweiz	Entwicklung des Balanced lethal Systems
<i>E. coli</i> CC118 <i>pir</i> ⁺ Deletionsvariante von <i>E. coli</i>	MSZ, Würzburg	Klonierungsarbeiten mit pKD3-Plasmid
<i>Salmonella typhi</i> Ty21a mit <i>tyrS</i> -HisTag- <i>cat</i> - Kassette (Klon117/ 120)	Diese Arbeit	Ausgangsstamm für den chromosomale Knockout
<i>Salmonella typhi</i> Ty21a Knockout ohne <i>tyrS</i> -Gen	Diese Arbeit	Balanced lethal System

2.4 Plasmide

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

pKD46	rep (oriR 101, temperatursensitive Replikation) Ampicillin-Resistenz (<i>Amp^R</i>) enthält γ , β und <i>exo</i> Gene für homologe Rekombination	Datsenko und Wanner 2000
pCP20	rep (oriT temperatursensitive Replikation) Chloramphenicol-Resistenz (<i>Cm^R</i>) Ampicillin-Resistenz (<i>Amp^R</i>) enthält Flipase-Rekombinase-Gen Promotor (thermal induzierbar)	Datsenko und Wanner 2000
pMKhly-CtxB-PSA	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX	Fensterle <i>et al.</i> 2007
pMKhly-CtxB	Fusionsprotein Häm-CTX; <i>Kan^R</i>	
pMO-PSA-CTX- Δ IS2-Element	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX Δ IS2-Element	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 2
pMO-PSA-CTX- <i>tyrS</i> -s- Δ IS2-Element (<i>tyrS</i> in Leserichtung der Hämolyseinsek.-kassette = s)	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX Δ IS2-Element mit Komplementationskassette <i>tyrS</i> -s	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 3
pMO-PSA-CTX- <i>tyrS</i> -as- Δ IS2-Element (<i>tyrS</i> entgegen Leserichtung der Hämolyseinsekretionskassette =as)	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX Δ IS2-Element mit Komplementationskassette <i>tyrS</i> -as	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 13

pMO-PSA-CTX- <i>tyrS</i> -HisTag-s- Δ IS2-Element	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX Δ IS2-Element mit Komplementationskassette <i>tyrS</i> -HisTag-s	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 1
pMO-PSA-CTX- <i>tyrS</i> -HisTag-as- Δ IS2-Element	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX Δ IS2-Element mit Komplementationskassette <i>tyrS</i> -HisTag-as	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 2
pMO- Δ IS2- Element	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Δ IS2-Element	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 32
pMO-CTX- Δ IS2-Element	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-CTX Δ IS2-Element	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 2
pMO-CTX- <i>tyrS</i> - s- Δ IS2-Element	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-CTX Δ IS2-Element mit Komplementationskassette <i>tyrS</i> -s	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 4
pMO-CTX- <i>tyrS</i> - HisTag-s- Δ IS2- Element	Kanamycin-Resistenz (<i>Kan^R</i>) Fusionsprotein Häm-CTX Δ IS2-Element mit Komplementationskassette <i>tyrS</i> -HisTag-s	Diese Arbeit Isolation aus Klon: 16

2.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Spel-tyrS-EPK-forward (1) (= die Zahl entspricht der Benennung der Primer im Laborbuch)	5' – AAA AAA ACT AGT GTT CCC TGT ATA AAA ACC AGG GGG – 3'	Klonierung der <i>tyrS</i> -Expressionskassette und des Fragments: Spel- <i>tyrS</i> -HisTag
tyrS-EPK-Spel-reverse (2)	5' – TTT TTT ACT AGT GTA AAT TCC TGG AGC TGA AGC AGA AG – 3'	
HisTag-tyrS-forward (3)	5' - GTG ATG GTG ATG GTG ATG CAT CAA AAT CTC CAT GTA TAT AAC GAC – 3'	Klonierung des Promotors: HisTag-P _{tyrS} -Spel
tyrS-HisTag-reverse (4)	5' – CAT CAC CAT CAC CAT CAC GCA AGC AGT AAC TTG ATT AAA – 3'	Klonierung des Fragments: Spel- <i>tyrS</i> -HisTag
Mut-pKD3-Spel-forward (5)	5' – GTG ATC TTC CGT CAC TAG TAG GCG CGC CGA AG – 3'	QuikChange [®] PCR zur Insertion der Spel-Site in das pKD3-Plasmid
Mut-pKD3-Spel-reverse (6)	5' – CTT CGG CGC GCC TAC TAG TGA CGG AAG ATC AC – 3'	
pMO-tyrS-screen-forward (7)	5' – CCC TGA ATC TCC AGA CAA CCA ATA TCA – 3'	Primer für das PCR Screening nach der <i>tyrS</i> -Expressionskassette im

pMO-tyrS-screen-reverse (8)	5' – CCC GTA CAA ATT CTA CCA GTT CTG GA – 3'	Plasmid pMO-PSA-CTX-ΔIS2-tyrS
HisTag-tyrS-forward.ne (9)	5' – GTT ACT GCT TGC GTG ATG GTG ATG GTG ATG CAT CAA AAT CTC CAT GTA TAT AAC GAC TGC – 3'	Klonierung des verlängerten Promotors: HisTag-P _{tyrS} -SpeI aus genomischer DNA
tyrS-HisTag-forward (10)	5' – GTT TAA TCA AGT TAC TGC TTG CGT GAT GGT GAT GGT GAT GCA TCA AAA TC – 3'	Verlängerung des vorhandenen Promotors: HisTag-P _{tyrS} -SpeI aus der PCR-Klonierung
SpeI-IS2-Deletion-orward (11)	5' –AAA AAC TAG TGA TAA TGG TTC ATG CTA CCG GGC GAA TG – 3'	Klonierung des Fragments: SpeI-BamHI
IS2-Deletion-BamHI-reverse (12)	5' – GTT TTG GGA TCC ACC CTG ATG GCT CTG – 3'	
tyrS-seq1-forward (13)	5' – GAG TCA CCT GCT CCG CCA GTA C – 3'	Sequenzierungsprimer für die <i>tyrS</i> / tyrS-HisTag
tyrS-seq2-forward (14)	5' – CCA CCT GCT TAC GGA TTT TGT C – 3'	Expressionskassette im Plasmid pKD3-SpeI- <i>tyrS</i> /tyrS-HisTag
tyrS-seq3-forward (22)	5' – CAG ACA GGC GAA GTC ATA ACC – 3'	
tyrS-seq4-forward (23)	5' – CAC GAC TTT TCG CCA GAT GC – 3'	

IS2-Del.seq-1-forward (15)	5' – GCG TGG TGG CAT CAT GCT TTA TG – 3'	Sequenzierungsprimer für das Spel-BamHI- Fragment im Plasmid pMO-PSA-CTX-ΔIS2
IS2-Del.seq-2-forward (16)	5' – GAC GAA GTG TGA TAA CTG GT A TAG CC – 3'	
IS2-Del.seq-3-forward (17)	5' – CTC CAC TAC ACA GAA ACT GGC – 3'	
IS2-Del.seq-4-forward (24)	5' – GAC ACC AGT TCT GTA GAA TAT GC – 3'	
pKD3-seq-1-forward (18)	5' – CAG GAC GCC CGC CAT AAA CTG – 3'	Sequenzierungsprimer für die Spel-Schnittstelle im pKD3-Spel-Plasmid
pKD3-seq-2-forward (19)	5' – CCA GCT GAA CGG TCT GGT TAT AGG – 3'	
Ter-HisTag-1-forward (20)	5' – CCC CCT TTC CAC TTA ATG CAT TAG TGA TGG TGA TGG TGA TGT TTC CAG CAA ATC AGA CAG TAA TTC – 3'	Anfügen eines C-terminalen HisTag an die <i>tyrS</i> - Expressionskassette
Spel-Ter-HisTag-2-forward (21)	5' – AAA AAA ACT AGT GTT CCC TGT ATA AAA ACC AGG GGG AGT GAT TTC TCA CTC CCC CTT TCC ACT TAA TGC ATT AG – 3'	

Knockout - forward (25)	5' – GTG TAC CGG CAA AGG TGC AGT CGT TTT ATA CAT GGA GAT TTT GAT GGC AGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC – 3'	Amplifikation der <i>tyrS-cat</i> -Kassette aus dem pKD3-Spel- <i>tyrS</i> -HisTag-Plasmid
Knockout - reverse (26)	5' – GAT AGT GAC AGC GTT GGA GGC GAT AGT CTT ACG CGC CTG ACC ACG TGA CGG ATG GG A ATT AGC CAT GGT CC – 3'	
CTX-sreen – forward (27)	5' – CTG ATT TGT GTG CAG AAT ACC AC – 3'	Primer für das PCR Screening nach der CTX-Kassette im pMO-Plasmid mit IS2 Deletion
pdxH-forward (28)	5' – GAA GTG CCG TTA CCC AGC TTC TG – 3'	Primer für das PCR Screening nach der <i>tyrS-cat</i> -Kassette im <i>Salmonella typhi</i> Ty21a Genom
pdxY-reverse (29)	5' – GGG ACT GGA TAG CGA GGA TAT TC – 3'	
pdxH-forward 3 (39)	5' - CCA CAC TTG AGG TGG TGA GGT ATT TC – 3'	
pdxH-forward-neu (30)	5' – CGT ACC AGC GTA TCG TAT TGC TC – 3'	
FRT-site– forward (31)	5' – GTT CCT ATA CTT TCT AGA GAA TAG G – 3'	Primer für das PCR Screening nach der <i>tyrS</i> -HisTag- <i>cat</i> -Kassette im <i>Salmonella typhi</i> Ty21a Genom mit Bindung in den FRT-Sites
FRT-site-reverse (32)	5' – GTT CCT ATT CTC TAG AAA GTA TAG G – 3'	

Flp-forward (33)	5' – CTA AGT GAG GGT GAA AGC ATC TGG G – 3'	Primer zum Überprüfen des Vorhandenseins der Flipase auf pCP20
Flp-reverse (34)	5' – GAT ATT GGA TCA TAT GCA TAG TAC CG – 3'	
Cm-reverse (35)	5' – CCT ATA ACC AGA CCG TTC AGC TGG – 3'	Primer zum Sequenzieren der genomischen Integration der <i>tyrS</i> -HisTag- <i>cat</i> - Kassette.
Cm-reverse-2 (36)	5' – CCT ATA ACC AGA CCG TTC AGC TGG – 3'	
Kan-forward (37)	5' – GTT CAT CCA TAG TTG CCT GAC TCC – 3'	Primer zum Amplifizieren der Kanamycin-Kassette im pMO-Plasmid
Kan-reverse (38)	5' – CCT TTT TTG GTG TAG GCT GGA GCT G – 3'	

2.6 Enzyme und Antikörper

Enzym	Hersteller
<i>Taq</i> -Polymerase	NEB, Genecraft
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene
Turbo- <i>Pfu</i> -Polymerase	Finnzymes
T4-Ligase	MBI Fermentas
BcuI (SpeI)	Fermentas
Bam HI	Fermentas

Mph1103I /AvallI/ Nsil	Fermentas
EcoRI	Fermentas
Anti-Mouse-IgG, HRP-linked-AK	Amersham
Anti-HisTag-Antikörper Anti-Rabbit	New England Biolabs
Cholera Toxin Antikörper Anti-Rabbit	Zyomed
Anti-Hämolysin-AK Anti-Rabbit	Immuno Globe
Prostata-Specific-Antigen (PSA) Polyclonal Rabbit Anti-Human	Dako Cytomation

2.7 Medien, Medienzusätze und Kulturplatten

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):	25 g LB-Medium ad 1l Millipore
2YT-Medium:	16 g Select-Peptone 10 g Hefe Extrakt 10 g Natriumchlorid ad 1l Millipore
BHI-Medium:	37 g Brain-Heart- Infusion ad 1l Millipore

Alle Medien wurden nach dem Anmischen mit Millipore 20 min bei 120°C autoklaviert. Falls gewünscht, wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C die entsprechenden sterilfiltrierten Antibiotikastocklösungen zugegeben.

Antibiotikum	Stocklösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml in Millipore	100 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in Millipore	25 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in Millipore	20 µg/ml
Chloramphenicol	5 mg/ml in Millipore	5 µg/ml

Zur Herstellung von Agarplatten wurden den LB bzw. BHI Flüssigmedien 13 g Agar Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren und der eventuellen Zugabe von sterilfiltrierter Antibiotikastocklösungen wurden die Flüssigmedien in Plastikschaalen gegossen.

2.8 Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	BioRad
Agarose	Appllichem

AgarAgar	Applichem
Ampicillin	Sigma
Brain Heart Infusion (BHI) Medium	Difco
Chloramphenicol	Sigma
Desoxynukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DNA–Leiter 1kB	Invitrogen
ECL ^T 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	Appllichem
Ponceau S	Sigma
Protein-Leiter	Invitrogen
SDS	Roth
TBE-Puffer	AppliChem
TEMED	Sigma
Tween-20	Sigma

2.9 Verwendete Kits

Kit	Hersteller
DNeasy Tissue Kit	QIAGEN
Plasmid Mini Kit	QIAGEN
Plasmid Midi Kit	QIAGEN
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Quik-Change Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

3. Methoden

3.1 Allgemeine Arbeiten mit Bakterien

3.1.1 Sterilisation von Medien und Geräten

Die für die Anzucht von Bakterien benutzten Medien und Geräte wurden bei 120°C für 20 Minuten in einem Autoklaven sterilisiert. Bei der Erstellung selektiver Kulturplatten und Medien wurde das gewünschte, sterilfiltrierte Antibiotikum nach dem Autoklaviervorgang und dem Abkühlen auf ca. 50 °C den Medien zugesetzt. Das starke Erhitzen würde anderenfalls die hitzelablen Antibiotika zerstören.

3.1.2 Herstellung von Glycerinstocks

Von einer frisch ausgestrichenen Bakterien-Kolonie wird zunächst eine Übernachtskultur angelegt.

Bakterien dieser Kultur werden am nächsten Tag mit einer Glycerinlösung gemischt und anschließend bei -80°C in einem sterilen Gefäß tiefgefroren. Das angewandte Mischungsverhältnis beträgt ein Teil Glycerin zu drei Teilen Übernachtskultur. Wegen der Problematik 100 % Glycerin exakt zu pipettieren wurde eine 75 % Glycerinlösung mit Millipore verwendet.

Daraus ergibt sich ein Mischungsverhältnis von 400 µl 75 % Glycerinlösung und 600 µl Übernachtskultur.

3.1.3 Kultivierung von *E. coli* und *Salmonella*-Stämmen in Flüssigmedien

Bakterien wurden in LB, BHI oder 2-fach-konzentriertem YT-Medien kultiviert. Um eine Übernachts-Flüssigkultur mit Bakterien herzustellen, wurde mit einer sterilen Impföse eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte genommen und in ein steriles Flüssigmedium gebracht. Bei Bakterienkolonien, die ein Antibiotikaresistenzgen entweder chromosomal oder auf einem Plasmid tragen, wurde das Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur wurde je nach Bedarf variiert. Das Wachstum erfolgte in einem Schüttler bei 180 rpm.

3.1.4 Kultivierung von *E. coli* und *Salmonella*-Stämmen auf Kulturplatten

Für die Anfertigung von Verdünnungsreihen, Einzelausstrichen und das gezielte Picken von Bakterienkolonien müssen Bakterien auf Kultur-Agarplatten 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. Je nach Bedarf wurde Temperatur und Dauer variiert.

3.1.5 Erzeugung elektrokompeter Zellen

Elektrokompeter Zellen sind in der Lage bei einer Elektroporation freie DNA-Fragmente oder Plasmid-DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Bei der Entwicklung des Balanced lethal System wurden Bakterien, die diese Fähigkeit besitzen, mehrfach benötigt.

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

Ablauf	Ausführung
1. Bakterienzellen- anzucht	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. Bakterien- konzentration	Die sich nun in der log-Phase befindende Kultur wird 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 rpm für 20 bis 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.
3. Waschen der Zellen	Das entstandene Pellet wird mit 1 ml eiskalter 10 % Glycerinlösung resuspendiert und anschließend mit selbiger Glycerinlösung auf 50 ml aufgefüllt. Daraufhin erfolgt eine 20 Minuten-Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm. Der beschriebene Waschschrift wird zweimal wiederholt. Bei der ersten Wiederholung wird das resuspendierte Pellet auf 20 ml – und 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 bis 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 Arbeiten

3.2.1 Isolation von Plasmid-DNA

3.2.1.1 Mit Miniprep

Zur Gewinnung von reiner, isolierter Plasmid-DNA können verschiedene Techniken angewandt werden. Für kleinere Mengen an DNA hat sich das Standard Verfahren: QIAprep spin Miniprep Kit der Firma QIAGEN als sehr praktikabel erwiesen.

Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly; bei der die hochmolekulare chromosomomale DNA selektiv denaturiert wird, wohingegen die zirkulären Plasmide unbeschädigt bleiben. Diese werden anschließend auf Silicat-Gel spezifisch gebunden. (Birnboim and Doly 1979) Verunreinigungen des Lysats wie z. B. RNA, Proteine und Zellbestandteile werden nicht durch die Membran adsorbiert und durch das Waschverfahren entfernt.

Die in der Membran gebundene DNA wird im letzten Schritt von dieser eluiert und in EB-Puffer oder in Millipore ankonzentriert.

Das Verfahren wurde wie folgt durchgeführt:

Ablauf	Ausführung
1. Bakterien- anzucht	In LB-Medium wird eine Bakterien-Übernachtskultur angezüchtet. Enthält das zu isolierende Plasmid ein Antibiotikaresistenzgen wird die Bakterienkultur unter Antibiotika-Selektionsdruck durchgeführt.
2. Bakterien- konzentration	4-6 ml Bakterien-Übernachtskultur wird bei 14000 rpm eine Minute zentrifugiert.
3. Bakterienlyse	Der entstandene Pellet wird mit 250 µl P1-Puffer versetzt und resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2-Puffer wird die Mixtur vorsichtig gemischt. Während dieser beiden Schritte werden die Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen lysiert. Nach 4 min wird durch Zugabe von 350 µl Puffer N 3 und vorsichtigem Schütteln das Lysat neutralisiert.
4. Abzentrifugation von Zelldetritus	Der Ansatz wird für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, wobei die denaturierte, chromosomale DNA und die Zellrestbestandteile ein Pellet am Boden des Caps bilden.
5. Plasmid-DNA Adsorption	Der Überstand mit der enthaltenen Plasmid-DNA wird auf eine QIA prep Spin Miniprep-Säule pipettiert und für eine Minute zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird dadurch an der Membran der Säule gebunden. Der Durchfluss wird verworfen. Bei low-copy-Plasmiden können die Plasmide mehrerer Bakterienlysate auf einer Säule gebunden werden.

Dieses Verfahren erwies sich auch als sinnvoll, wenn hohe Plasmidkonzentrationen benötigt wurden.

6. Inaktivierung von Nukleasen

Die Membran wird mit 0,5 ml PB-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Im Lysat möglicherweise vorhandene Nukleasen werden somit entfernt. Der Durchfluss wird verworfen.
7. Waschen der Membran

Die Membran wird mit 0,75 ml PE-Puffer versetzt und anschließend zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Durch eine weitere Zentrifugation werden Überreste an Ethanol und Puffer aus der Membran entfernt, die folgende enzymatische Reaktionen stören könnten.
8. Elution der Plasmid-DNA

Die in der Membran adsorbierte Plasmid-DNA wird mit 15-50 µl EB-Puffer oder Millipore eluiert. Die Menge und die Art des Lösungsmittels hängen von den benötigten Plasmid-Konzentrationen und dem Verwendungszweck ab.

Um die Elution aus dem Silicat-Gel zu verbessern, wird die Säule mit der Membran für ca. 10 min bei 50°C inkubiert.
9. DNA-Gewinnung

In einem letzten Schritt wird die Säule für 60 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss enthält nun die gelöste Plasmid-DNA.

Mit diesem Verfahren lassen sich bis zu 20 µg Plasmid-DNA pro verwendeter Säule isolieren. Die DNA wird bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Mit Midiprep

Für die Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Standardverfahren QIAGEN Plasmid Purification „Midi Kit“ der Firma QIAGEN verwendet.

Mit diesem Verfahren können bis zu 100 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Das Verfahren wurde wie folgt durchgeführt.

Ablauf	Ausführung
1. Bakterienzellen- anzucht	In 150 ml LB-Medium wird eine Bakterien Übernachtskultur angezchtet. Enthält das zu isolierende Plasmid ein Antibiotikaresistenzgen, wird die Bakterienkultur unter Antibiotika-Selektionsdruck durchgeführt.
2. Bakterien- konzentration	Die Übernachtskultur von Bakterien wird bei 4000 rpm 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert
3. Bakterienlyse	Das entstehende Pellet wird mit 4 ml P1-Puffer versetzt und resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml P2-Puffer wird die Mischung vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Ansäuern durch CO ₂ zu verhindern, sollte die Inkubation unter Luftabschluss geschehen. Während dieser beiden Schritte werden die Bakterienzellen lysiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P3 und vorsichtigem Schütteln wird der Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysereaktion wird dadurch gestoppt.

- | | |
|-------------------------------|---|
| 4. Filtration
des Lysats | Das Gemisch wird filtriert, wobei die denaturierte, chromosomale DNA und die Zellrestbestandteile im Filter verbleiben. |
| 5. Präparation der
Säule | Auf die Säule QIAGEN-tip100 wird 10 ml QBT Puffer pipettiert und das völlige Durchsickern des Puffers abgewartet. |
| 6. Plasmid-DNA
Adsorption | Der Durchfluss aus Schritt 4 mit der enthaltenen Plasmid-DNA wird zügig auf die QIAGEN-tip100 Säulen aufgebracht. Die Flüssigkeit sickert selbstständig ein.
Die Plasmid-DNA ist nun in der Säule gebunden. |
| 7. Waschen der
Säule | Die Säule wird zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Das Zweite Waschen ist besonders bei großen Mengen Bakterienkultur wichtig.
Der Durchfluss wird jeweils verworfen. |
| 8. Elution der
Plasmid-DNA | Die in der Säule adsorbierte Plasmid-DNA wird mit 5 ml QF-Puffer oder Millipore gelöst.
Der Durchfluss der Säule wird in sterilen Greiner-Röhrchen aufgefangen. |
| 9. DNA-Präzipitierung | Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 60 min bei 4000 rpm und 4°C wird die DNA im Greiner-Röhrchen präzipitiert und bildet eine gläserne Ablagerung am Boden des Röhrchens.
Der Überstand wird vorsichtig abgekippt. |

10. DNA-Waschen Das Plasmid-DNA-Pellet wird mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und für 60 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das 70 % Ethanol ersetzt gebundene Salze und das gebundene Isopropanol des DNA-Pellets. Das Pellet wird damit leichter auflösbar. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt.
11. DNA-Gewinnung Die Pellets werden 5 bis 10 Minuten luftgetrocknet und in EB-Puffer (pH 8,0) oder 10 mM Tris HCl (pH 8,5) gelöst. Das Lösungsvolumen richtet sich nach der benötigten DNA-Konzentration.

Mit diesem Verfahren lassen sich bis zu 100 µg Plasmid-DNA pro verwendeter Säule isolieren. Die DNA wird bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Isolation von genomischer DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus Bakterien wurde das Standardverfahren DNeasy Tissue der Firma Qiagen verwendet. Das Prinzip der Methode basiert auf einer Lyse der Bakterien mit Hilfe der Proteinkinase K und einer anschließenden selektiven Bindung der frei gewordenen DNA auf einer Matrix.

Ablauf	Ausführung
1. Bakterienzellen- anzucht	Es werden 5 ml Übernachtskultur von Bakterien angezchtet, deren DNA isoliert werden soll.
2. Bakterien- konzentration	Der Ansatz wird am darauf folgenden Tag eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert und das

entstandene Pellet wird mit 180 µl ATL-Puffer resuspendiert.

3. Bakterienlyse

Das Gemisch wird mit 20 µl Proteinkinase K versetzt und mindestens drei Stunden (besser 8 Stunden) bei 55°C inkubiert.

Es ist auf eine gute Durchmischung des Ansatzes zu achten, um eine vollständige Auflösung der Bakterien zu ermöglichen.

4. DNA-Adsorptions Vorbereitung

Anschließend wird das Lysat mit 200 µl AL-Puffer versetzt und für 10 min bei 70 °C inkubiert.

Nach gründlicher Durchmischung mit 200 µl Ethanol wird das Produkt in die DNeasy Mini spin-Säule pipettiert, welche im Standard-Kit enthalten ist.

5. Waschen der Säule

Nach 1 min Zentrifugation bei 8000 rpm wird die in der Matrix gebundene DNA mit 500 µl AW1 und AW2 –Puffer nacheinander versetzt.

Nach jeder Pufferzugabe wird die Säule erneut zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Zusätzlich wird nach Zugabe von Puffer AW2 und einer Minute Zentrifugation die Säule wiederholt für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert um sicherzustellen, dass das Ethanol restlos aus der Matrix entfernt wurde.

6. Elution der DNA

Die in der Säule gelegene Matrix wird nun mit AE-Puffer oder Millipore versetzt.

Die Menge des verwendeten Elutionsmittels richtet sich nach der benötigten Konzentration der DNA.

Um das Lösen der DNA von der Matrix zu verbessern, wird die Säule 10 min bei 50°C inkubiert.

7. DNA-Gewinnung

Die im AE-Puffer oder Millipore gelöste DNA kann nun durch Zentrifugation mit 8000 rpm im Eppendorf Cap gewonnen werden.

Um eine höhere Ausbeute zu erzielen und die in der Matrix gebundene DNA restlos zu lösen, kann der Durchfluss erneut durch die Matrix zentrifugiert werden.

Die gewonnene genomische DNA wird bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Aufreinigung von DNA

3.2.3.1 Aus dem PCR-Ansatz

Um DNA-Fragmente aus PCR Reaktionen weiterverarbeiten zu können, müssen sie zunächst von Enzymen, wie der DNA Polymerase und Salzen befreit werden. Diese Störfaktoren können nachfolgende Anwendungen der PCR-Produkte beeinträchtigen. Für die Aufreinigung von PCR-Reaktionen wurde das Spin PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet.

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer Bindung von DNA-Fragmenten, an einer speziellen Silicat Membran in Gegenwart von hohen Salzkonzentration (Puffer PB).

Enzymatische Verunreinigungen, Oligonukleotide, Farbstoffe, Primer und Detergenzien adsorbieren nicht an der Membran und können durch Zentrifugation entfernt werden. In der Silicat-Membran noch vorhandene Salze werden mit dem ethanolhaltigem PE-Puffer gewaschen.

Die nun reine DNA wird mit 15 bis 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) oder Millipore – je nach gewünschter DNA Konzentration und Verwendungszweck- eluiert. Um eine bessere Lösung der DNA von der Silicat-Membran zu erreichen, wird abweichend vom vorgegebenen Protokoll die Säule mit dem EB-Puffer oder dem Millipore noch 10 min bei 50 °C inkubiert. Die Elution gelingt am besten bei Niedrigsalzbedingungen in leicht alkalischem Milieu.

Ablauf	Ausführung
1. Einstellen der DNA Bindebedingungen	Mischung von einem Teil PCR-Produkt mit mit 5 Teilen PB-Puffer (z.B. 100 µl PCR Produkt mit 500 µl PB-Puffer)
2. DNA-Absorption	Übertragen des Puffer-PCR Gemisches in die QIAquick spin Säule und 1 min Zentrifugation bei 14000 rpm. Der Durchfluss wird verworfen.
3. Silicat-Membran waschen	Die Silicat-Membran wird mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und anschließend bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.
4. Entfernen des Restethanols	Die QIAquick spin Säule wird 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird wieder verworfen und die Säule in ein neues 1,5 ml Cap gestellt.
5. DNA-Eluierung	In die Mitte der Membran wird 15 bis 50 µl EB-Puffer oder Millipore pipettiert und die Säule anschließend für 10 min bei 50 °C inkubiert.
6. DNA-Gewinnung	Nach einer Minute Zentrifugation bei 14000 rpm liegt die reine DNA im Durchfluss vor.

3.2.3.2 Aus der Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe ist mittels der Gelelektrophorese möglich. Um eine Bande, also ein DNA-Fragment bestimmter Länge, in Reinform zu erhalten, muss man die DNA aus dem Gel isolieren und aufreinigen.

Hierzu wurde das Verfahren QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN verwendet. Das Verfahren entspricht im Prinzip dem der Aufreinigung von PCR-Produkten PCR-Ansätzen.

Ablauf	Ausführung
1. Isolierung der DNA	Die Bande mit dem gesuchten DNA-Fragment wird aus dem Gelelektrophoresegel ausgeschnitten.
2. Einstellen der DNA-Bindebedingungen	Entsprechend dem Gewicht des ausgeschnittenen Gels wird ein Dreifaches an QG-Puffer hinzugegeben. Bsp. 100 mg Gel muss mit 300 µl QG-Puffer versetzt werden. Anschließend erfolgt die Inkubation des Gemisches bei 50°C für 10 min unter gelegentlichem Vortexen bis zur vollständigen Auflösung des Gels und Gelbfärbung der Lösung.
3. DNA-Adsorption	Das Gemisch wird in eine QIAquick spin Säule pipettiert und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.
4. Agaroserest-entfernung	Um die Agarose restlos zu entfernen, wird 0,5 ml QG-Puffer auf die Säule gegeben und anschließend 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.

5. Silicat-Membran waschen	Die Silicat-Membran wird mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und anschließend bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert.
6. Entfernen des Restethanols	Die QIAquick spin Säule wird 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule in ein neues 1,5 ml Cap gestellt.
7. DNA-Eluierung	In die Mitte der Membran wird 15 bis 50 µl EB-Puffer oder Millipore pipettiert und die Säule anschließend für 10 min bei 50 °C inkubiert.
8. DNA-Gewinnung	Nach einer Minute Zentrifugation bei 14000 rpm liegt die gereinigte DNA im Durchfluss vor.

3.2.3.3 Von QuikChange®-Produkten

Bevor das mutierte Plasmid pKD3-Spel in die super-kompetenten Zellen transformiert wird, muss der Ansatz mit Hilfe der Ethanol-fällung von Salzen und Enzymen befreit werden.

Die Aufreinigung und Ankonzentration über die Silicat Säulen ist wegen der geringen Konzentration der DNA nach der linearen Amplifikation durch die QuikChange®-PCR ungeeignet.

Ablauf	Ausführung
1. DNA-Fällung	Der mit DpnI verdaute Plasmidansatz wird mit 200µl 100 % Ethanol versetzt. Das Ethanol sollte eine Temperatur von -20 °C haben. Das Gemisch wird mit 4 µl 5 M NaCl versetzt und anschließend bei -20 °C 30 min inkubiert.

- | | |
|----------------------------|--|
| 2. DNA-Pelletierung | Der Ansatz wird 30 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. |
| 3. Waschen des Pellets | Das Pellet wird mit 200 µl Ethanol (70 %) versetzt und erneut 30 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. |
| 4. Trocknen | Um das erhaltene Pellet zu trocknen, wird es 90 Minuten bei 45 °C in einem Speed Vac Konzentrador inkubiert. |
| 5. Elution der Plasmid-DNA | Das Produkt wird mit 40 µl Millipore versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Plasmid-DNA kann dadurch in den 40 µl Millipore eluiert werden. |

Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt bei –20 °C.

3.2.4 Elektrophoretische DNA-Auftrennung

Die Gelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Verfahren um DNA und Proteine spezifisch aufzutrennen. Da die Ladung des DNA-Stranges - im Gegensatz zu Proteinen - aufgrund der zahlreichen negativen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphatrückgrats relativ pH-Wert unabhängig ist, können verschiedene DNA-Abschnitte nur auf der Basis ihrer Größe aufgetrennt werden.

Mit Hilfe von Größenstandards kann auch die Länge der aufgetrennten Nukleinsäuresequenz abgeschätzt werden.

Basis der DNA-Auftrennung ist eine Gel-Matrix, die wie ein Molekularsieb funktioniert. Die negativ geladene DNA wird mit Hilfe eines anliegenden elektrischen Feldes zur Anode gezogen.

Kleine DNA-Abschnitte können in der Gel-Matrix schneller wandern, wohingegen große DNA-Abschnitte durch das engmaschige Gel-Netzwerk bei ihrer Wanderung zur Anode mehr behindert werden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Abschnitte hängt dabei von folgenden Parametern ab: Größe des DNA-Abschnittes, angelegter Spannung, Agarosekonzentration der Gel-Matrix, Wahl des Laufpuffers, Salzkonzentration des Puffers und die Interkalation mit Farbstoffen.

Die Herstellung eines Gels für eine DNA-Gelelektrophorese wird nach folgendem Verfahren durchgeführt:

Die gewünschte Menge TBE-Puffer (Tris-Borat-Puffer) wird mit Agarose gemischt (z.B. 200ml TBE / 2g 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 1µl zu 10 ml Gellösung mit Ethidiumbromidlösung versetzt und gut vermischt.

Das Produkt wird in die 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 (590nm) Licht angeregt werden. Durch die Konzentrierung des Farbstoffes in dem DNA-Strang ist eine Unterscheidung von dem im Gel gelöstem Ethidiumbromid leicht möglich.

Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen werden sie mit Ladepuffer gemischt. Das Mischungsverhältnis für einen 10-fachen Ladepuffer beträgt 1/10 Puffer, 9/10 Probenansatz.

Dem Ladepuffer ist ein sichtbarer Farbmarker beigemischt. Anhand der daraus entstehenden Farbfront kann entschieden werden, wann die Gelelektrophorese beendet wird.

Der Ladepuffer garantiert, dass die Probe aufgrund der somit höheren Dichte des Puffer-Probenmischungs in der Tasche absinkt und diese nicht verlässt.

Neben den Proben wird auch ein Massenstandard aufgetragen, um eine Abschätzung der Größe der getrennten DNA-Fragmente zu ermöglichen.

Der Massenstandard enthält ebenfalls einen Farbmarker.

Das beladene Gel wird in einer Elektrophoresekammer 30 bis 50 Minuten einer Spannung von 160 bis 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.

Anhand der Farbfront, die durch den im Ladepuffer enthaltenen Farbmarker entsteht, kann entschieden werden, wann die Elektrophorese beendet werden kann. Die Farbfront bewegt sich mit den kleineren DNA-Fragmenten durch das Gel. Unter einer UV-Lampe können die gewanderten DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

Materialien

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

TBE-Puffer (10X)	108 g	TRIS
(Tris-Borat-Puffer)	55 g	Borsäure
	7,4 g	Na ₂ EDTA
	ad 1 l	Millipore
DNA-Ladepuffer (10X)	250 mg	Bromphenolblau
	250 mg	Xylencyanol
	33 ml	150 mM Tris (pH 7,6)
	60 ml	Glycerin
	7 ml	Millipore

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

3.2.5.1 Allgemeine Verfahrensprinzipien

Die Taq-DNA-Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), die 1983 durch den amerikanischen Biochemiker Kary Banks Mullis erstmals beschrieben wurde, ist ein sehr sensitives Verfahren zur Amplifizierung von DNA. Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde, ist dieses Verfahren in der Lage aus einem geschlossenen DNA–Strang nach n Zyklen 2ⁿ Kopien des Ausgangstranges herzustellen.

Anstelle der Taq-Polymerase, welche manchmal Fehler beim Kopieren von DNA-Sequenzen produziert, wird für eine sequenzexakte DNA-Amplifikation häufig die Pfu-Polymerase benutzt, die aus dem thermophilen Archaebakterium *Pyrococcus furiosus* stammt. Sie besitzt eine proof–reading Funktion. Auch die noch schnellere und exaktere Phusion-Taq kommt immer häufiger zur Anwendung.

Für einen kompletten Reaktionszyklus werden folgende Bestandteile benötigt:
Das zu vervielfältigende Template, Oligonukleotidprimer, Nucleotidtriphosphate und eine thermostabile DNA-Polymerase.

Das PCR-Verfahren besteht aus ca. 20 bis 40 Zyklen. Sie finden in einem so genannten Thermocycler statt, der den Versuchsansatz immer exakt auf die Temperatur bringt, welche für den Reaktionsschritt nötig ist.

Jeder Zyklus besteht aus drei Abschnitten:

1. Denaturierung

In einem ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA auf 95 bis 98 °C erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten. Es liegt dann DNA in Einzelstrangform vor. Um eine vollständige Separation der DNA-Ausgangsstränge sicherzustellen, wird beim ersten Reaktionszyklus häufig länger erhitzt als bei den folgenden Denaturierungsschritten.

2. Annealing

Anschließend wird die Temperatur auf ca. 48 bis 65°C abgesenkt, um eine Anlagerung der Primer an ihre komplementäre DNA-Strang Bindungsstelle zu ermöglichen. Je höher die Temperatur an der Schmelztemperatur des Primers liegt, desto spezifischer ist die Bindung des Primers an die komplementäre Stelle im Template.

3. Elongation

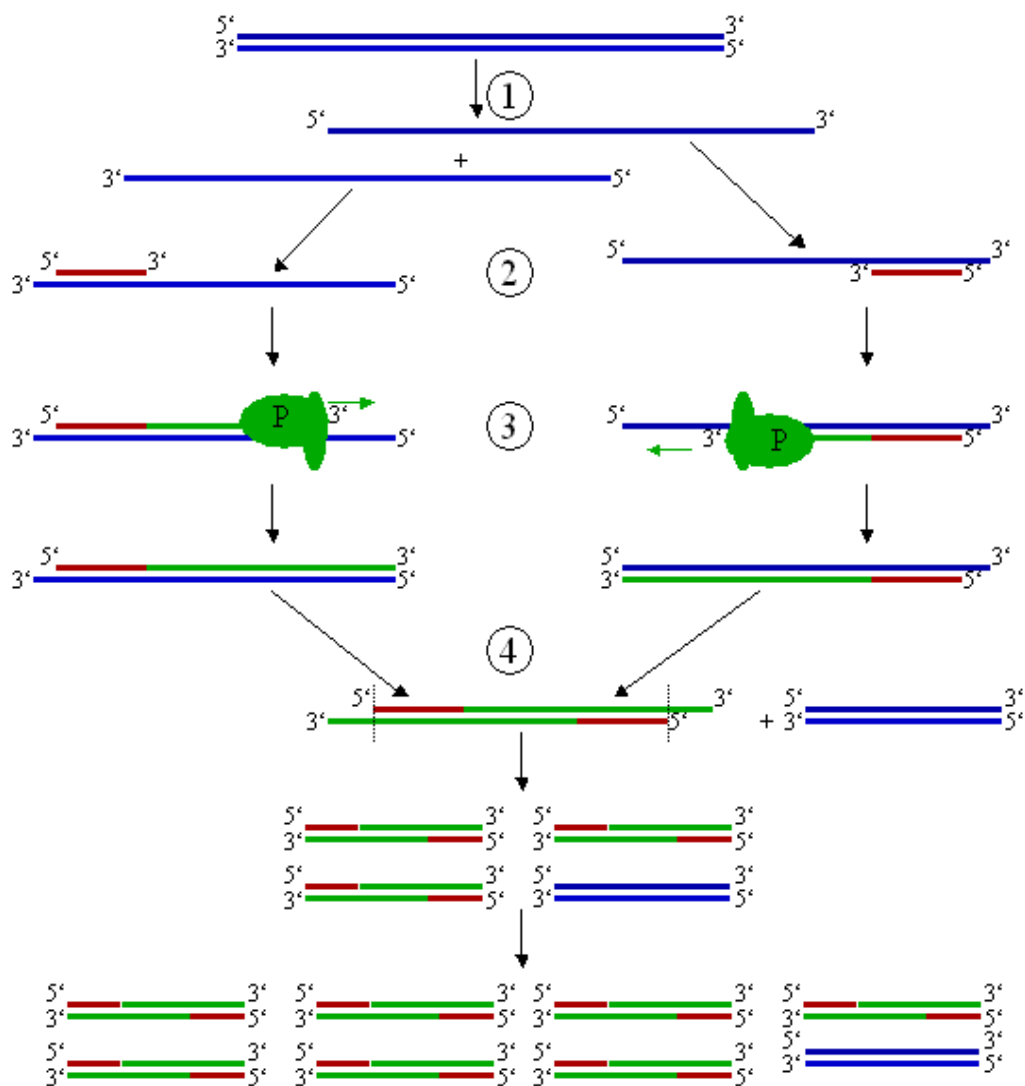
Die DNA-Polymerase lagert sich nun an den gebundenen Primer an und komplementiert den Einzelstrang unter Verwendung der im Ansatz vorhandenen Nucleotidtriphosphate. Die Pfu-Polymerase hat eine Synthesegeschwindigkeit von ca. 500 Basen pro Minute; die Taq-Polymerase synthetisiert ca. 1000 Basenpaare pro Minute.

Neuere Polymerasen, wie die Phusion-Taq erreichen sogar Amplifikationsraten von 1000 Basenpaaren pro 15 Sekunden. Somit entstehen zwei identische Doppelstränge.

Das Temperaturoptimum der Polymerase liegt zwischen 68 und 72 °C. Die Dauer dieses Reaktionsschritts hängt von der verwendeten Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments ab.

Nach Beendigung aller Reaktionszyklen folgt eine Inkubationszeit von 10 Minuten, in der die Polymerase nicht vollständig synthetisierte DNA-Stränge noch komplettieren kann. Das Produkt wird bei 4 °C bzw. -20 °C aufbewahrt.

Schaubild:



Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.

- (1) Schmelzen (*Denaturierung*).
- (2) Anlagerung (*Primerhybridisierung*).
- (3) Verlängerung (*Elongation*).
- (4) Der erste Zyklus ist beendet.

(Abbildung: 11; PCR-Zyklus)

3.2.5.2 Herstellung eines Bakterienschnelllysats für PCR

Um schnell und einfach sowohl genomische- als auch Plasmid-DNA aus Bakterien für PCR-Ansätze zu gewinnen, wurden Schnelllysate nach folgendem Verfahren durchgeführt.

Ablauf	Ausführung
1. Bakterien-gewinnung	Mit einer Pipettenspitze wird eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte abgekratzt und in 50µl Millipore gelöst.
2. Zellyse	Die Bakteriensuspension wird 5 Minuten bei 100 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dadurch wird die Bakterienmembran zerstört und das Zytoplasma freigesetzt.
3. DNA-Isolation	Um die DNA zu gewinnen, wird das Gemisch zwei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Bestandteile der Zellmembran und anderer Zelldetritus sammeln sich am Boden des Caps. Nach 2 min Inkubation auf Eis wird der Überstand vorsichtig abgenommen und in einen PCR-Ansatz eingesetzt.

Die Methode der direkten Zugabe von Bakterienmaterial in PCR-Ansätze führte manchmal zum Scheitern der Polymerase-Kettenreaktion.

3.2.5.3 Klonierungs PCR

Das Ziel einer Klonierungs PCR ist es, ein DNA-Fragment selektiv zu amplifizieren. Dieses vervielfältigte Fragment kann daraufhin in einen Vektor, z.B. ein Plasmid, integriert werden. Um die Wahrscheinlichkeit einer sequenzexakten DNA-Amplifizierung zu erhöhen, wurde bei den Klonierungs-PCRs die Pfu-Polymerase verwendet. Sie besitzt eine „proof-reading“ Aktivität und macht die Vervielfältigung damit weniger fehleranfällig.

Um die Amplifikations-Effizienz der Pfu-Polymerase zu optimieren, wird zunächst die MgSO₄-Konzentration bzw. der DMSO-Gehalt im Versuchsansatz variiert und die PCR anschließend mit den besten Parametern wiederholt.

Ansatz Pfu Polymerase	5	µl	10 x Puffer	
	1,0	µl	dNTPs-Mix (20 mM)	
	0,5	µl	Pfu-Polymerase	
	0,5	µl	Primer I	
	0,5	µl	Primer II	
	1-6	µl	MgSO ₄ (100 mM)	
oder	5	µl	DMSO	
	3	µl	Template	
	ad 50	µl	Millipore	
Ablaufprogramm einer Klonierungs PCR	95°C	5	min Denaturierung	

	95°C	1	min Denaturierung	} X- Zyklen
	50°C	1	min Annealing	
	72°C	X	min Elongation	

	72°C	10	min Vervollständigung	
	4°C	∞	Lagerung	

3.2.5.4 QuikChange® PCR

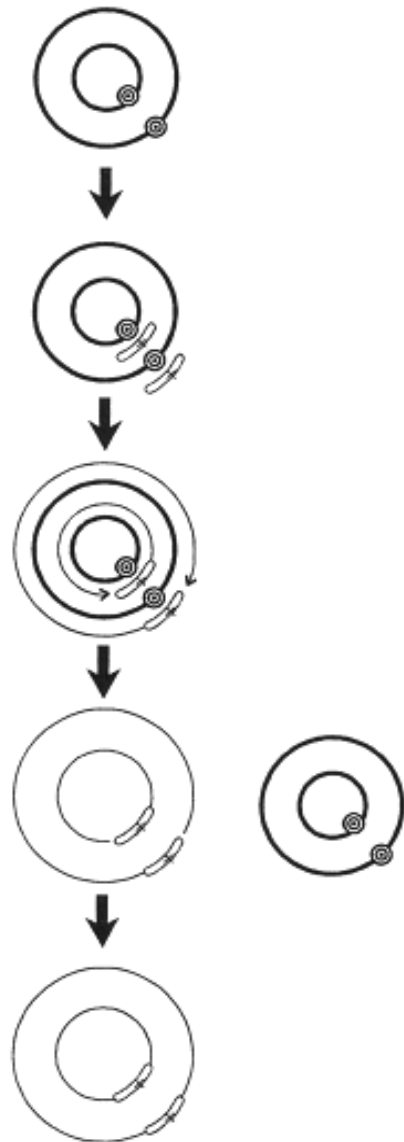
Das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene wird dazu benutzt Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in DNA-Abschnitte einzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeit kam es bei der Insertion der SpeI-Schnittstellen in das pKD3-Plasmid zur Anwendung. Die Primer sind so gewählt, dass sie in ihrer Mitte eine Fehlpaarung bzgl. des Templates beinhalten, die durch Template komplementäre DNA Abschnitte begrenzt werden. Die beiden Primer, die komplementär zueinander sind, binden an den korrespondierenden DNA-Abschnitten auf dem DNA-Strang. Mit Hilfe der Turbo-Pfu-Polymerase werden, ausgehend von den Primern, die Stränge synthetisiert. Um eine höhere Präzision der Replikation zu erreichen, wählt man eine Elongationstemperatur von nur 68°C.

Das Ergebnis dieser Site-spezifischen Mutagenese mittels PCR sind Plasmide mit und ohne Mutation. Da die nicht-mutierten Ausgangsstränge methyliert sind, können sie selektiv durch die Restriktionsendonuklease DpnI verdaut und abgebaut werden. Die Restriktionsendonuklease erkennt die methylierte Zielsequenz: 5'-G(m6)ATC-3' und schneidet das DNA-Fragment gezielt an dieser Stelle. Die in vitro synthetisierten Plasmide sind nicht methyliert und werden durch die Restriktionsendonuklease nicht tangiert.

Der Verdau wird bei 37 °C mit DpnI ca. 3 h durchgeführt.

Das Schaubild soll das Prinzip des Verfahrens verdeutlichen.



(Abbildung: 12; QuikChange® PCR-Ablauf)

Template

Die zu mutierende Stelle auf dem Plasmid ist durch Punkte hervorgehoben.

Primer vermittelte Mutagenese

Nach Hitzedenaturierung lagern sich die Oligonukleotidprimer mit der Fehlpaarung an die Einzelstränge an.

Elongation

Ausgehend von den Primern werden die komplementären DNA-Stränge durch die TurboPfu-Polymerase gebildet.

PCR- Amplifizierung

Am Ende des ersten PCR-Zyklus liegt das ursprungs- und das mutierte Plasmid vor.

Verdau

Die nicht-mutierte-DNA ist methyliert und kann durch die Restriktionsendonuklease DpnI selektiv verdaut werden.

Das mutierte Plasmid kann nun regulär amplifiziert werden

Ansatz Quik-Change® PCR	10,0	µl	10 x Puffer
	2,0	µl	dNTPs-Mix (20 mM)
	2,0	µl	Turbo-Pfu-Polymerase
	1,0	µl	Mut-pKD3-Spel-forward
	1,0	µl	Mut-pKD3-Spel-reverse
	10,0	µl	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	62,0	µl	Millipore
	2,0	µl	Template

Ablaufprogramm der Quik-Change PCR	95°C	5 min	Denaturierung	

	95°C	1 min	Denaturierung	} 17-Zyklen
	45°C	1 min	Annealing	
	68°C	7 min	Elongation	

	68°C	10 min	Vervollständigung	
	4°C	∞	Lagerung	

3.2.5.5 Screening PCR

Für den Nachweis erfolgreicher Klonierungen mussten im Rahmen dieser Arbeit mehrfach Bakterienkolonien mit dem PCR-Verfahren überprüft werden.

Es wurde zunächst eine Kolonie gepickt und auf einer neuen, nummerierten Agarplatte gesichert. Außerdem wurde ein Schnelllysat dieser Bakterienkolonie durchgeführt. 4 µl des Lysat-Überstandes konnten anschließend in einen PCR-Ansatz eingesetzt werden.

Um größerer Mengen Kolonien zu überprüfen, wurden jeweils 5 bis 10 Bakterienkolonien in einem Schnelllysate kumuliert und einzeln auf einer Agarplatte ausgestrichen. Ergab sich bei einem kumulierten Ansatz ein positives Ergebnis, so konnten die Bakterienkolonien anschließend einzeln überprüft werden.

Das Vorgehen, eine Bakterienkolonie direkt in den PCR-Ansatz zu geben, hat häufig zum Versagen der PCR-Reaktion geführt.

Ansatz Kolonie-Screening-PCR	5,0	µl	10 x Puffer
	1,0	µl	dNTPs-Mix (20 mM)
	0,5	µl	Taq-Polymerase
	0,5	µl	Primer 1
	0,5	µl	Primer 2
	43,0	µl	Millipore
	4,0	µl	Schnelllysateüberstand

3.2.5.6 Multiplex PCR

Um sicher nachweisen zu können, ob es sich bei einer Bakterienkolonie um einen *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* oder einen *E. coli* Stamm handelt, gibt es das Verfahren der Multiplex-PCR.

Die PCR wird mit acht Primern durchgeführt. Je nach Bakterienstamm werden bestimmte DNA-Fragmente amplifiziert, die bei der Gelelektrophorese ein spezifisches Bandenmuster ergeben.

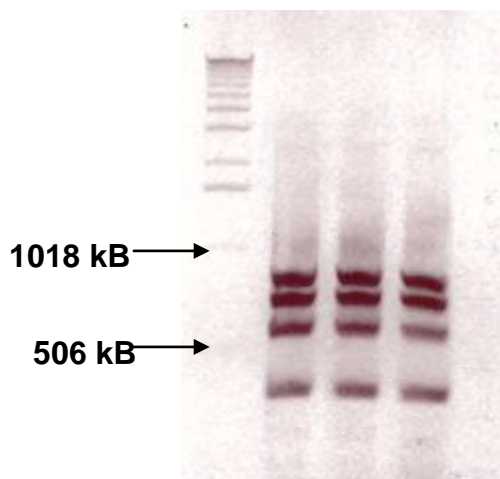
Ansatz Multiplex-PCR	5,0	µl	10 x Puffer
	1,0	µl	dNTPs-Mix (20 mM)
	1,0	µl	Taq-Polymerase
	2,5	µl	MgCl ₂
	3,0	µl	Bakterienkultur Schnelllysate
	1,0	µl	Dh-F-Primer

1,0	µl	Dh-R-Primer
1,0	µl	InvA-F-Primer
1,0	µl	InvA-R-Primer
1,0	µl	ViaB-R-Primer
1,0	µl	ViaB-F-Primer
1,0	µl	Prt-F-Primer
1,0	µl	Prt-R-Primer
ad 50,0	µl	Millipore

Ablaufprogramm der
Multiplex-PCR

95°C	3	min	Denaturierung	} 38- Zyklen
95°C	0,5	min	Denaturierung	
60°C	1,5	min	Annealing	
72°C	2,0	min	Elongation	
72°C	10	min	Vervollständigung	
4°C	∞		Lagerung	

Das Gelphoto zeigt das spezifische Vier-Bandenmuster von *Salmonella typhi* Bakterien.



(Abbildung: 13; DNA-Gelphoto)

Abb. 13: typisches Vier-Bandenmuster der Multiplex-PCR bei *Salmonella typhi*

3.2.6 Restriktionsverdau von DNA-Sequenzen

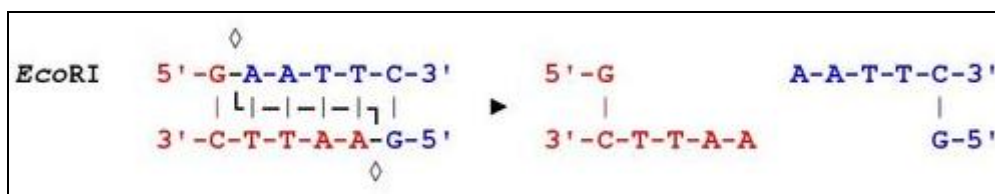
Restriktionsenzyme sind wichtige Werkzeuge der Gentechnologie und der Molekularbiologie.

Sie sind in der Lage eine DNA-Doppelhelix an genau definierten Nukleotidsequenzen zu schneiden. Je nach Art des Restriktionsenzym entstehen dadurch Schnittstellen mit 5' oder 3' Überhängen - so genannte „sticky ends“ oder glatte „blunt“ Ends ohne Überhänge.

Es könne dadurch DNA-Fragmente aus einem genetischen Umfeld isoliert werden und zu neuen Konstrukten zusammengesetzt werden.

Die ursprüngliche Aufgabe der Restriktionsenzyme ist der Schutz eines Bakteriums vor eindringenden Viren, indem das Enzym die virale DNA schneidet und dadurch abgebaut werden kann. Das Restriktionsenzym erkennt einen spezifischen DNA-Abschnitt in der Nukleotidsequenz und schneidet an dieser Stelle.

Da dieser Restriktionsort auch im Genom des Bakteriums vorkommt, wird die eigene DNA durch Methylierung einer A oder C Base vor der Spaltung durch das Restriktionsenzym geschützt. Dieses Methylierungsmuster liegt in Fremd bzw. Plasmid-DNA nicht vor. Eine selektive Spaltung nicht-genomischer DNA ist dadurch möglich. Die in der Molekularbiologie und Gentechnik eingesetzten Restriktionsenzyme sind Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Diese benötigen kein ATP und haben keine Methylierungsfunktion. Häufig sind die Schnittstellen Basenpaarpalindrome. Das Beispiel zeigt den Schnitt des Palindroms: GAATTC



(Abbildung: 14; Basenpaarpalindrom)

Je nach vorhandener Star-Aktivität des Enzyms wurden die Restriktionsansätze bei 37 °C 1 h bis 16 h inkubiert. Um optimale Restriktionsergebnisse zu erzielen

und die Star-Aktivität möglichst gering zu halten, wurden jeweils die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Bei den durchgeführten Doppelverdauen wurden ebenfalls die Empfehlungen und Pufferangaben der Hersteller berücksichtigt.

3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

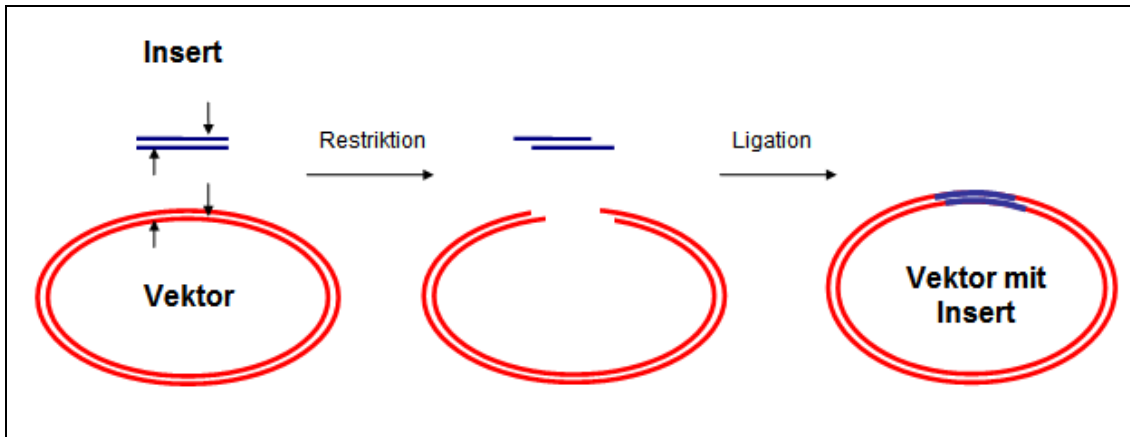
In der Gentechnologie wird die DNA-Ligation dazu benutzt, bestimmte Nukleotidsequenzen in einen neuen genetischen Hintergrund, z.B. ein Vektorplasmid zu integrieren. Dieser erweiterte Vektor kann anschließend in ein Bakterium transformiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich DNA-Fragmente ligiert, die komplementäre 3' bzw. 5' Überhänge – so genannte „sticky ends“ besitzen. 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. Besitzen die DNA-Fragmente „sticky Ends“ 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.

Die T4-DNA-Ligase ist das Produkt Virus infizierter *E. coli* Bakterien und kann aus ihnen isoliert werden.

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.



(Abbildung: 15; Insertion von DNA-Fragment in Plasmid durch Ligation)

Ansatz DNA Ligation	1,0	µl	T4-DNA Ligase
mit T4-DNA-Ligase	2,0	µl	10 x Ligasepuffer
	X	µl	Plasmid-DNA
	X	µl	Fragment-DNA
	ad 20,0	µl	Millipore

Vektor- und Fragmentanteil wird im Ligationsansatz so aufeinander abgestimmt, dass ein Verhältnis der Molekulargewichte von 1 zu 3-5 vorliegt. Dabei muss die Größe des Vektors bzw. des Fragments und die Konzentration der beiden Komponenten berücksichtigt werden.

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

Der Ansatz mit dem erweiterten Vektor kann nun z.B. durch Elektroporation in entsprechend präparierte Zellen transformiert oder bei -20 °C gelagert werden.

3.2.8 Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen

Unter Transformation versteht man allgemein die Veränderung einer Zelle durch Aufnahme oder Einschleusung von fremder DNA. War die DNA-Aufnahme erfolgreich, so ist die Zelle genetisch modifiziert, was auch in einer Veränderung ihrer Eigenschaften resultieren kann.

Eine Möglichkeit hohe Transformationsraten zu erzielen, bietet die Elektroporation. Die Zellen müssen vorher in dem beschriebenen Verfahren elektrokompent gemacht werden und Elektrolyte und Verunreinigungen entfernt werden.

Anschließend werden sie unter zu Hilfenahme eines sich entladenden Kondensators kurzzeitig einem elektrischen Feld von ca. 1,8 kV ausgesetzt. Durch die dabei entstehende Durchlässigkeit der Zellmembran können DNA-Fragmente und Plasmide in das Innere der Zelle aufgenommen werden. Die Permeabilität der Zellmembran ist nur im Millisekundenbereich vorhanden und sofort reversibel.

Es wurde folgendes Verfahren angewendet.

Ablauf	Ausführung
1. Inkubation	Elektrokompente 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. Membran-
regeneration
- Nach erfolgtem Puls müssen die Bakterien sofort mit einem Milliliter nährstoffreichen Mediums versetzt werden. Anschließend erfolgt eine Zwischeninkubation der Zellen. In dieser Zeit wird die Antibiotikaresistenz ausgebildet, die die Bakterien durch Aufnahme des Plasmids erworben haben. Die Dauer variiert je nach Antibiotikaresistenz.
4. Ausplattieren
- Die Zellen werden auf Agarplatten 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. Es wird dadurch überprüft, ob bei der Transformation keine Kontaminationen aufgetreten sind.

3.2.9 Photometrische Messung

3.2.9.1 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.

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann man dadurch auf die Konzentration der DNA in der Lösung schließen.

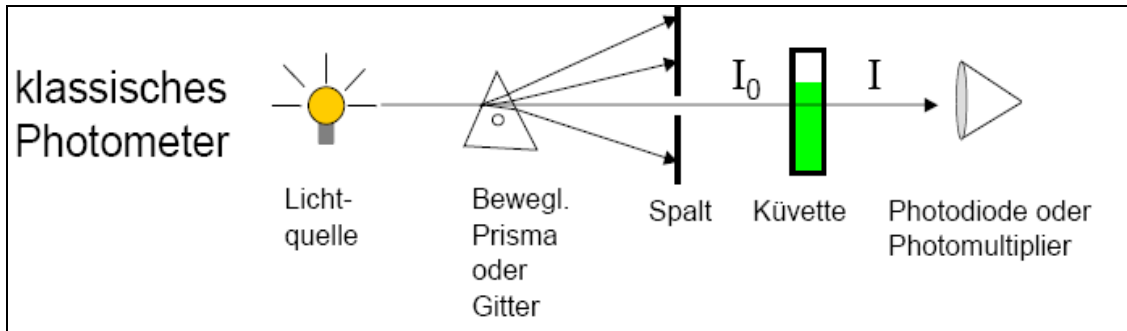
Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$E = \epsilon * c * d$$

ϵ = Extinktionskoeffizient in $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1} = \text{cm}^2/\mu\text{mol}$
 ($\text{mM} = \text{mmol/l} = \text{mmol}/1000 \text{cm}^3$)

c = Konzentration (mM)

d = Lichtweg (cm)



(Abbildung: 16; prinzipieller Aufbau eines Photometers)

Es wird folgendes Verfahren durchgeführt:

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 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ kann auf die Reinheit der DNA-Lösung geschlossen werden: Werte von 1,8 entsprechen reiner DNA, Werte von 2,0 reiner RNA. Liegt eine Proteinverunreinigung vor, so ist der $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Quotient kleiner als 1,8.

3.2.9.2 Von Bakterienkulturdichte

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

3.2.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Verschiedene Klonierungen und die chromosomale Integration der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette wurden durch Sequenzierung auf die gewünschte DNA-Modifikation hin getestet.

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), 1 µl Sequenzierungsprimer der Konzentration 10 pmol/µl und Millipore (ad 14 µl) zusammen.

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

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

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 Proteinisolierung aus dem Bakterienpellet

Mit der Western Blot Analyse kann nachgewiesen werden, ob bzw. in welcher Quantität Proteine innerhalb einer Zelle gebildet werden. Dazu müssen die Proteinprodukte zunächst aus dem Zellpellet isoliert werden.

Das Bakterienpellet wird sowohl aus einer Bakterienübernachtskultur als auch bei einer optischen Wachstumsdichte von 1,0 gewonnen.

Ablauf	Ausführung
1. Bakterien- anzucht	Aus einer Bakterienübernachtskultur werden 2 ml abgenommen und bei 14000 rpm 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Ebenso wird mit einer Bakterienkultur der optischen Dichte 1,0 verfahren.
2. Pelletlösung	Das gewonnene Zellpellet aus der Übernachtskultur und der optischen Dichte von 1,0 wird mit 150 µl Laemmlipuffer (5 fach konzentriert) resuspendiert.
3. Protein- denaturierung	Das Gemisch wird anschließend 5 min bei 110 °C gekocht. Der Zelldetritus wird 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand enthält die zellulären Proteinprodukte. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C

3.3.2 Proteinisolierung aus dem Bakterienüberstand

Um mit Hilfe einer Western Blot Analyse nachzuweisen, ob Proteine aus einem Bakterium sezerniert werden, ist es nötig die Proteinprodukte aus dem Zellüberstand zu isolieren. Der Proteinüberstand wird aus einer Übernachtskultur sowie bei einer optischen Wachstumsdichte von 1,0 isoliert.

Ablauf	Ausführung
1. Bakterien- anzucht	35 ml BHI-Medium werden (gegebenenfalls mit Antibiotika) im Verhältnis 100: 1 mit einer Bakterienübernachtskultur angeimpft. Beim Erreichen der optischen Dichte:1,0 wird das Wachstum abgestoppt.
2. Überstands- gewinnung	25 ml der Bakteriensuspension wird 40 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert. 20 ml des Überstandes wird abgenommen, das Pellet wird verworfen.
3. Proteinfällung	Die 20 ml Bakterienüberstand werden mit 2 ml Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) versetzt und über Nacht auf Eis inkubiert. Das Gemisch wird nach ca. 16 h Inkubationsdauer 40 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das entstandene Pellet wird mit 1 ml Aceton versetzt und erneut bei obigen Bedingungen zentrifugiert.
4. Proteinaufnahme	Der Überstand wird verworfen und das Pellet ca. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend werden die Proteine in 150 µl 5 fach Laemmli Puffer aufgenommen. Sobald sich das Protein-Laemmli-Gemisch gelb färbt, wird es mit 20 µl 3 M Tris HCl versetzt.
5. Protein- denaturierung	Die eluierten Proteine werden 5 min bei 110 °C gekocht und anschließend bei -20 °C gelagert.

Mit der Bakterienübernachtskultur wird ab Schritt 2. analog verfahren.

3.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine durch die Western Blot Analyse detektieren zu können, müssen sie zunächst durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese größenspezifisch aufgetrennt werden.

Dazu eluiert man die isolierten Proteinprodukte in Laemmli-Puffer und kocht das Gemisch bei 100 °C ca. 5 Minuten.

Durch das im Laemmli-Puffer enthaltenen SDS werden nicht-kovalente Bindungen aufgebrochen und die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteinkomplexe zerstört. Um Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Aminosäureketten zu spalten, ist dem Laemmli-Puffer β -Mercaptoethanol beigemischt. Dieses reduziert die Schwefelbrücken zwischen den Cysteinresten. Die Bindung des stark negativ geladenen SDS an die Aminosäuresequenzen maskiert die Eigenladung der Proteine. Die Auftrennung der denaturierten Proteine in Richtung der Anode erfolgt bei der SDS-Page daher ausschließlich nach ihrer Größe.

Marker mit genau definiertem Molekulargewicht ermöglichen, es die Masse der aufgetrennten Proteine abzuschätzen.

Zur Auftrennung werden 15 bis 20 μ l der behandelten Proteinproben auf ein Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli geladen.

In einem 4 prozentigen Sammelgel werden die Proben zunächst aufkonzentriert, bevor sie beim Eintritt in das 10 prozentige Laufgel größenspezifisch aufgetrennt werden.

Sammelgel und Trenngel werden zwischen zwei Glasscheiben gegossen, da der Luftsauerstoff die Polymerisation des Gels verhindert. Das zweischichtige Gel setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Lösungen	Trenngel (10 %)	Sammelgel
Acrylamid / Bisacrylamid (40 %)	5 ml	1.1 ml
Wasser	12,1 ml	7,55 ml
20 % SDS	100 µl	50 µl
TEMED	20 µl	10 µl
3 M Tris pH 9,0	2,5 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	1,25 ml
APS	200 µl	100 µl

Das polymerisierte Gel wird vertikal in eine Laufkammer gespannt und die Apparatur mit 1 % SDS Puffer aufgefüllt. Nach Beladung der Geltaschen mit den Proteinproben wird eine Spannung von 120 V angelegt bis die Lauffront, welche durch das Bromphenolblau des Laemmli-Puffers sichtbar wird, aus dem Gel herausfließt.

Am Ende des Prozesses sind die Proteine der Größe nach sortiert und können mit der Coomassie-Färbung oder der immunologischen Nachweismethode des Western-Blots sichtbar gemacht werden.

10x SDS-Laufpuffer	10 g	SDS
	30,3 g	Tris
	144,1 g	Glycin
<hr/>		
	ad 1000 ml	Millipore

3.3.4 Western Blot Analyse

Im Anschluss an eine SDS-PAGE können die größenspezifisch aufgetrennten Proteine durch das Western Blot Verfahren vom Polyacrylamid Gel mittels elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden.

Dies bietet die Möglichkeit Proteinbanden auf der Nitrozellulose Membran mittels spezifischer Antikörper zu identifizieren.

Ablauf	Ausführung
1. Auswaschen von SDS Puffer	Das Polyacrylamidgel mit den größenspezifisch aufgetrennten Proteinen wird ca. 30 Minuten in Towbin Puffer gelegt.
2. Semi-Dry-Blot-System	Zwischen zwei Metallplatten, die Anode und Kathode darstellen, wird eine sandwich-artige Struktur aus Whatman-paper, Polyacrylamidgel und Nitrozellulosemembran zusammengestellt. Auf die Anode werden 2 Lagen Whatman-paper, die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und nochmals 2 Lagen Whatman-paper geschichtet. Whatman-paper und Nitrozellulosemembran werden vorher in Towbin-Puffer getränkt. Eventuell entstehende Luftblasen werden ausgestrichen, da sie den Blotvorgang beeinträchtigen. Auf den Stapel wird die Kathodenplatte gepresst. Für die zu blottenden Proteine wurde eine Spannung von 25 Volt für 30 bis 60 Minuten angelegt.
3. Blocken	Im Anschluss wird die Nitrozellulosemembran ca. 60 min mit 5 % Magermilchpulver in PBS geblockt. Dadurch werden alle freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert.

4. Inkubation mit 1. Antikörper
- Die geblockte Nitrozellulosemembran wird anschließend bei 4 °C über Nacht mit dem 1. Antikörper inkubiert. Auf der Membran gebundene Proteine können auf diese Weise spezifisch markiert werden.
5. Waschvorgang
- Die Nitrozellulosemembran wird nun dreimal 30 Minuten auf dem Schüttler mit PBS-Tween gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wird das PBS-Tween gewechselt. Nicht gebundene Antikörper werden so entfernt.
6. Inkubation mit 2. Antikörper
- Anschließend wird die gewaschene Membran ca. 120 Minuten mit dem 2. Antikörper inkubiert. Der 2. Antikörper bindet an den Fc-Teil des gebundenen 1. Antikörpers. An den 2. Antikörper ist kovalent eine funktionelle Gruppe gebunden, die mit Reagenzien nachgewiesen werden kann.
7. Waschvorgang
- Die Membran wird nun erneut dreimal 30 Minuten auf dem Schüttler mit PBS-Tween gewaschen.
- Nicht gebundener Zweitantikörper wird somit entfernt.
8. Röntgenentwicklung
- Nach dem Waschvorgang wird die Nitrozellulosemembran eine Minute mit zwei Entwicklungsflüssigkeiten versetzt. Anschließend wird die Membran zwischen Whatman-paper getrocknet und in eine Entwicklungskassette eingelegt.

In der Dunkelkammer wird ein Röntgenfilm je nach Signalintensität 5 Sekunden bis 30 Minuten auf die Membran gelegt und gebundene Antikörper durch den Röntgenfilmentwickler sichtbar gemacht.

Towbin-Puffer	3,0 g	Tris
	14,4 g	Glycin
	200,0 ml	Methanol
<hr/>		
	ad 1000 ml	Millipore

3.4 Arbeiten unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften

Da die Bakterienimpfstämme, die im Rahmen des Forschungsprojektes „Bakterielle Tumorthherapie“ entwickelt werden, später im Menschen zur Anwendung kommen sollen, sind besondere Herstellungsrichtlinien zu beachten.

Das in dieser Dissertation etablierte Balanced lethal System übernimmt dabei die Aufgabe das Antigendelivery Plasmid in dem humanen *Salmonella typhi* Ty21a Impfstamm zu stabilisieren.

Die genetischen Manipulationen des *Salmonella typhi* Ty21a Stamms wurden deshalb unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften durchgeführt, die in Anlehnung an GMP-Produktionsverfahren entwickelt wurden, diesen jedoch formal nicht entsprechen.

GMP steht für Good Manufacturing Practice und impliziert eine Reihe von Arbeitsanweisungen, Verhaltensregeln und Dokumentationsvorschriften bei der Herstellung von Arzneimitteln, Arzneimittelzusatzstoffen, medizinischen Geräten und Produkten, die im Menschen zur Anwendung kommen.

Das Regelwerk wurde von der U.S. Food and Drug Administration entwickelt und soll weltweit Qualitätsstandards bei der Produktion oben genannter Produkte sicherstellen.

Der wichtigste Leitfaden zum Thema GMP-Production im europäischen Raum ist unter folgender Internetadresse zu finden:

<http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev4.htm>

3.5 Synchroner Excision des *tyrS-cat*-Fragments aus dem Genom und Deletion der Kanamycin-Kassette aus dem pMO-Plasmid

Als Vorbereitung wurden elektrokompente *Salmonella typhi* Ty21a mit *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette und dem Plasmid pCP20, auf dem das Enzym Flipase kodiert ist, hergestellt. In diese Zellen können im weiteren Verlauf jede Variante des pMO-Plasmids transformiert werden, um dann einen Knockout-Stamm herzustellen.

1. Transformation des pMO-Plasmids in elektrokompente

***Salmonella typhi* Ty21a mit *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette mit 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.

5. Zweite Übernachtkultur

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

6. 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.

7. 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.

8. PCR-Nachweis

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

(siehe auch 4.5.3)

4. Ergebnisse

4.1 Übersichtsplan durchgeführter Klonierung

pKD3-Plasmid

- ▶ Cm^R; Amp^R
- ▶ FRT-Sites



- ▶ Einfügen einer Spel-Site (pKD3-Spel)
- ▶ Integration von *tyrS*-HisTag (pKD3-*tyrS*-HisTag)



- ▶ PCR-Amplifikation von *tyrS*-HisTag -*cat*-Kassette mit FRT-Sites



- ▶ Transformation des Produktes in *S. typhi* Ty21a Träger von

pKD46-Plasmid

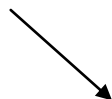
- ▶ Kan^R, Amp^R
- ▶ Rekombinase



- ▶ Chromosomaler Austausch von *tyrS* gegen *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette
- ▶ Transformation von

pCP20-Plasmid

- ▶ *cat*^R
- ▶ Flipase um Produkt zwischen FRT-Sites zu entfernen



- ▶ Entfernen der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette aus dem *Salmonella typhi* Ty21a Genom
- ▶ Entfernen der Kan^R aus dem Plasmid pMO-PSA-CTX-ΔIS2-*tyrS*-HisTag



Balanced lethal System

pMO-PSA-CTX-Plasmid

- ▶ Kan^R
- ▶ Cholera-toxin-Gen
- ▶ PSA-Antigen
- ▶ Häm-α-Sekretionssystem



- ▶ Deletion eines IS2-Elements



- ▶ Integration von *tyrS*-HisTag



- ▶ Transformation in *S. typhi* Ty21a mit pCP20-Plasmid



4.2 Herstellung des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragments

Das *tyrS*-Gen hat eine Länge von 1275 Basenpaaren. (siehe 7.)

Für die Komplementation des chromosomalen Knockouts sollte die *tyrS*-Expressionskassette inklusive des eigenen Promotors bzw. des eigenen Terminators verwendet werden.

Um eine vollständige Amplifikation der *tyrS*-Expressionskassette sicherzustellen, wurden die Primer Spel-TyrS-EPK-forward und TyrS-EPK-Spel-reverse so gewählt, dass sie 336 Basenpaar vor bzw. 70 Basenpaare nach der eigentlichen *tyrS*-Gen kodierenden Sequenz auf dem *E. coli* Genom binden. Es ergibt sich dadurch ein zu generierendes DNA-Fragment von 1681 Basenpaaren.

Für die Herstellung des *tyrS*-Komplexes mittels PCR-Technik wurde aus dem *E. coli* Bakterienstamm zunächst die chromosomale DNA mit dem DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen isoliert. (siehe 3.2.2)

Die Amplifizierung des *tyrS*-Gens aus dem *E. coli* Genom wurde mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. Es wurde eine Annealing Temperatur von 50 C° und eine Elongationszeit von 4 Minuten gewählt.

Da keine geeigneten Antikörper gegen die Tyrosyl-tRNA-Synthetase zur Verfügung standen, wäre es schwierig gewesen die Expression des klonierten Gens direkt zu testen.

Um die Funktionalität des klonierten *tyrS*-Gens überprüfen zu können, wurde eine HisTag-Region in das *tyrS*-Gen eingefügt. Der HisTag-Abschnitt besteht aus der Basensequenz: GTA ATG GTA ATG GTA ATG und kodiert für 6 Histidin-Aminosäuren.

Gegen diese Aminosäuresequenz sind spezifische Antikörper vorhanden. Die Integration der HisTag-Sequenz scheint laut Literatur außerdem keine Auswirkung auf die biologische Aktivität des Enzyms zu haben.

(Wahlsten *et al.* 1996; Kiga *et al.* 2002)

Zunächst wurde versucht die HisTag-Sequenz n-terminal in das *tyrS*-Gen zu integrieren. Es war geplant die *tyrS*-Kassette in zwei separaten Abschnitten herzustellen:

1. Promotor-*tyrS*-Kassette und 2. Terminator-Region. Die beiden Sequenzen wurden mit überhängenden Primern generiert, die in der HisTag-Sequenz komplementär zueinander sind. In einer rekombinanten PCR sollten die beiden Abschnitte aneinandergelagert und amplifiziert werden.

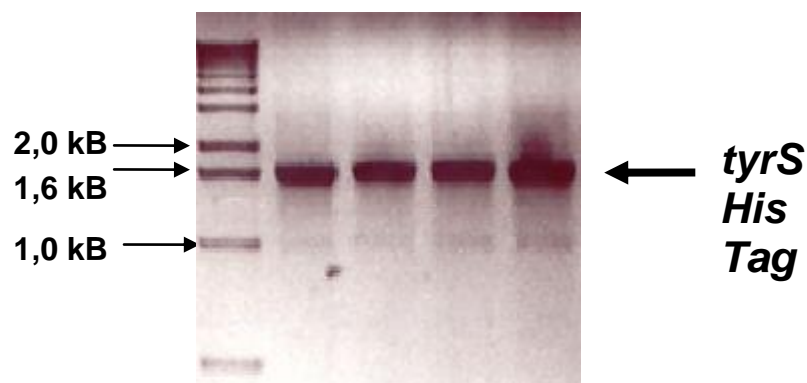
Trotz mehrerer Versuche gelang es nicht, mit Hilfe der rekombinanten PCR das *tyrS*-Gen mit dem integrierten HisTag-Abschnitt herzustellen.

Deshalb wurde die HisTag-Sequenz mit den Primern Ter-His-Tag-1-forward und Spel-Ter-His-Tag-2-forward nacheinander C-terminal an die *tyrS*-Kassette angehängt.

Das Genprodukt, das mit den Primern Ter-His-Tag-1-forward und TyrS-EPK-Spel-reverse hergestellt wurde, diente dabei als Template für die PCR mit den Primern TyrS-EPK-Spel-reverse und Spel-Ter-His-Tag-2-forward.

Beide PCR-Verfahren wurden mit der Pfu-Polymerase bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einer Elongationszeit von 4 Minuten durchgeführt. Auf die effizientere Taq-Polymerase wurde bei der Herstellung dieser PCR-Produkte wegen der größeren Fehleranfälligkeit verzichtet.

Gelphoto der *tyrS*-HisTag-Expressionskassette:



(Abbildung: 17; DNA-Gelphoto)

4.3 Modifikationen am pKD3-Plasmid

4.3.1 Einfügen von Spel-Schnittstelle und Integration von *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag

Abweichend vom Datsenko Wanner Prinzip (Datsenko *et al.* 2000) kann bei der Erstellung des Balanced lethal Systems das *tyrS*-Gen nicht in einem Schritt gegen eine Antibiotikaresistenzkassette ausgetauscht werden.

Aus der Annahme, dass die Tyrosyl-tRNA-Synthetase essentiell (Wakasugi *et al.* 1998; Woese *et al.* 2000; Gerdes *et al.* 2003) ist, würde bei diesem Schritt das Bakterium absterben.

Bei der Konzeption einer Strategie zur Erstellung eines Balanced lethal Systems wurde deshalb über einen modifizierten Schritt zunächst das *tyrS*-Gen auf dem *Salmonella* Genom gegen eine *tyrS*-Antibiotikaresistenzkassette ausgetauscht.

Da das Plasmid pKD3 als Template für die PCR-Amplifizierung der *tyrS*-Antibiotikaresistenzkassette diente, wurde die *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Expressionskassette zunächst in das pKD3-Plasmid kloniert. Die Integration erfolgte vor der Chloramphenicol-Antibiotikaresistenzkassette und zwischen den beiden FRT-Sites. Dies ermöglicht die Amplifizierung des Rekombinations-DNA-Strangs: *tyrS*-HisTag-*cat* (siehe 4.5.1).

Da in diesem Bereich des pKD3-Plasmids keine Schnittstelle für eine Integration zur Verfügung stand, wurde zunächst mit dem Verfahren der Site-spezifischen-Mutagenese eine Spel-Schnittstelle in das Plasmid eingefügt.

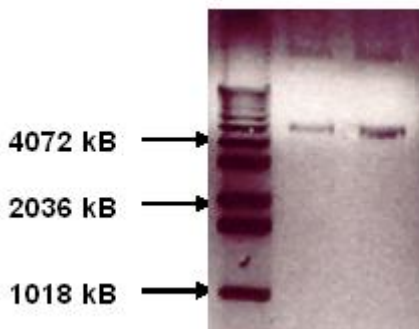
Für dieses Verfahren wurden zwei Primer: Mut-pKD3-Spel-forward und Mut-pKD3-Spel-reverse so konstruiert, dass sie komplementär auf dem pKD3 Plasmid binden und in ihrer Mitte eine Spel-Schnittstelle beinhalten.

Bei der PCR Amplifikation wird daraufhin in den resultierenden pKD3-Plasmiden eine Spel-Schnittstelle eingefügt. (siehe 3.2.5.4)

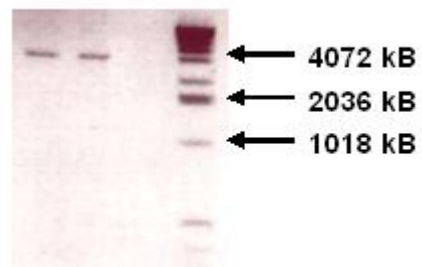
Ansatz Quik-Change® PCR	10	µl	10 x Puffer
	2	µl	dNTPs-Mix (20 mM)
	2	µl	Turbo-Pfu-Polymerase
	1	µl	Mut-pKD3-Spel-forward
	1	µl	Mut-pKD3-Spel-reverse
	10	µl	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	62	µl	Millipore
	2	µl	Template

Ablaufprogramm der Quik-Change PCR	95°C	5 min	Denaturierung	
	<hr/>			
	95°C	1 min	Denaturierung	} 17- Zyklen
	45°C	1 min	Annealing	
	68°C	7 min	Elongation	
<hr/>				
	68°C	10 min	Vervollständigung	
	4°C	∞	Lagerung	

Das PCR-Produkt wurde mit einer Ethanol-fällung ankonzentriert (siehe 3.2.3.3) und anschließend 4 µl in 100 µl elektrokompente *E.coli* CC118 (pir⁺) elektroporiert. Das Screening-Verfahren wurde mittels Plasmidisolierung und anschließendem Spel-Verdau durchgeführt.



(Abbildung: 18; DNA-Gelphoto)



(Abbildung: 19; DNA-Gelphoto)

Abb. 18: pKD3 nach 4 Stunden SpeI-Verdau bei 37°C: Es sind die verschiedenen Coiling-Formen des Plasmids zu erkennen, die auftreten, wenn ungespaltene, zirkuläre Plasmid-DNA vorliegt.

Abb. 19: pKD3-SpeI nach 4 Stunden SpeI-Verdau bei 37°C: Es ist nur noch eine Linie zu sehen, die das gespaltene Plasmid darstellt.

Nach erfolgreichem Screening wurden die FRT-Sites und die SpeI-Schnittstelle mit den Primern pKD3-seq-1-forward und pKD3-seq-2-forward sequenziert. Die Sequenzierung zeigte die fehlerfreie Integration der SpeI-Schnittstelle in das pKD3-Plasmid und die Intaktheit der FRT-Sites.

In die eingefügte SpeI-Schnittstelle wurde nun der in 4.2 hergestellte *tyrS* bzw. der *tyrS*-HisTag-Komplex in das pKD3-SpeI-Plasmid integriert. Hierzu wurden das pKD3-SpeI-Plasmid und die *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragmente mit dem SpeI-Restriktionsenzym bei 37°C 16 Stunden verdaut.

Ansatz Plasmid-Verdau	40	µl	pKD3-SpeI/PCR-Fragment
mit Bcul (SpeI)	8	µl	10x Puffer Tango
	28	µl	Millipore
	4	µl	Bcul (SpeI)

Nach 16 Stunden wurde das geschnittene pKD3-SpeI-Vektor-Plasmid drei mal 30 Minuten mit je 1 µl Ciap Enzym dephosphoryliert.

Anschließend wurden pKD3-SpeI-Plasmid und *tyrs* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragment mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen aufgereinigt (siehe 3.2.3.1) und in Ligationsansätzen zusammengestellt.

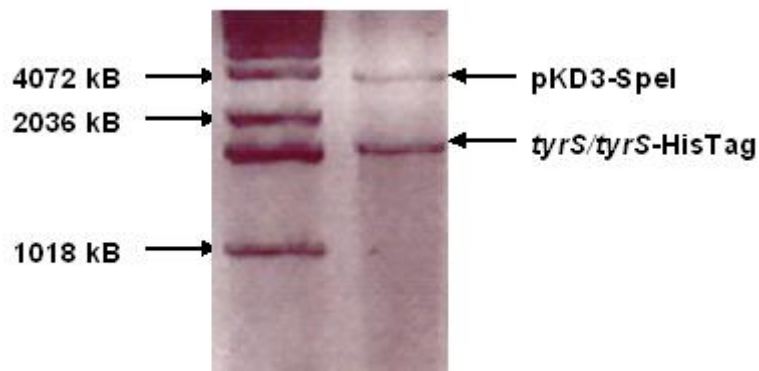
Ansatz DNA Ligation	1,0 µl	T4-DNA-Ligase
mit T4-DNA-Ligase	2,0 µl	10 x Ligasepuffer
	2,0-8,0 µl	pKD3-SpeI-Plasmid x SpeI
	1,0 µl	DNA-Fragment x SpeI
	8,0-14,0 µl	Millipore

Die Ligationsansätze wurden 16 Stunden bei 4 °C inkubiert, anschließend hitzeinaktiviert und je 4 µl des Gemisches in 100 µl elektrokompetente *E.coli* CC118 (pir⁺) transformiert.

Die auf Ampicillin-Platten gewachsenen Kolonien wurden mit den Primern SpeI-TyrS-EPK-forward, TyrS-EPK-SpeI-reverse und pKD3-seq-2-forward auf die erfolgreiche Integration des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragments in das pKD3-SpeI Plasmid getestet.

Es wurden zum Screening sowohl der SpeI-TyrS-EPK-forward-Primer als auch der TyrS-EPK-SpeI-reverse-Primer benutzt, um die Integration des PCR-Fragments in beiden möglichen Richtungen detektieren zu können.

Von positiven Klonen, wurde das Plasmid isoliert und ein Verdau mit dem SpeI-Restriktionsenzym durchgeführt. Es konnte dadurch eindeutig gezeigt werden, dass das ca. 1600 bp große *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragment in das Plasmid integriert wurde.



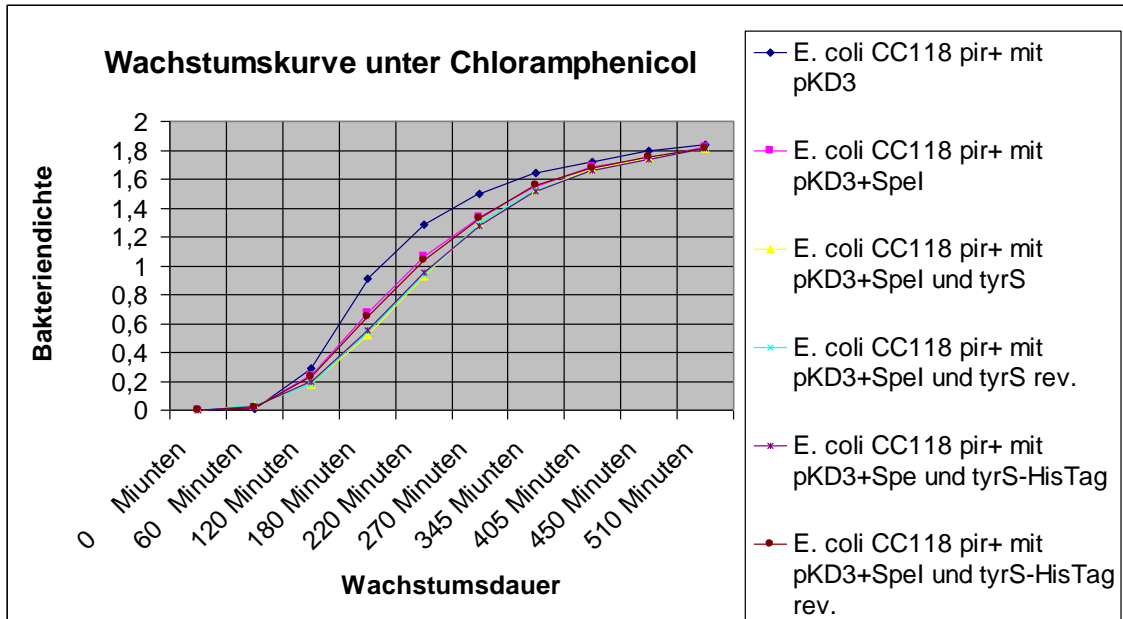
(Abbildung: 20; DNA-Gelphoto)

Abb. 20: pKD3-Spel-tyrS/tyrS-HisTag nach 2h SpeI-Verdau bei 37 °C
gespaltenes pKD3-Spel und Insertionsfragment erkennbar

Um sicherzustellen, dass bei der Amplifikation des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragments und dessen Integration in das pKD3-SpeI-Plasmid keine Fehler aufgetreten sind, wurde das Plasmid mit den Primern TyrS-seq1-forward, TyrS-seq2-forward und pKD3-seq-2-forward sequenziert. Für die Sequenzierung und die anschließende weitere Verwendung wurden die Plasmid-Isolate aus den Klonen 2 für pKD3-SpeI-*tyrS* bzw. 2 für pKD3-SpeI-*tyrS*-HisTag verwendet. Es wurden jeweils die Plasmid-Isolate ausgewählt, bei denen das *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragment in Leserichtung der Chloramphenicolresistenz ins pKD3-SpeI-Plasmid integriert wurde. Das Ergebnis der Sequenzierung beweist, dass der *tyrS*-Komplex und der *tyrS*-Komplex mit der angehängten HisTag-Sequenz fehlerfrei in das PKD3-SpeI-Plasmid integriert wurden.

4.3.2 Erstellung von Wachstumskurven

Um zu testen, ob die Integration des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag Fragments in das pKD3-SpeI Plasmid Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Bakterienstamms *E.coli* CC118 (*pir*⁺) hat, wurden Wachstumskurven der verschiedenen Stämme erstellt:



(rev.: Die Leserichtung des *tyrS*-Komplexes ist entgegengesetzt zur Leserichtung des *cat*-Gens = Chloramphenicolresistenz-Gen)

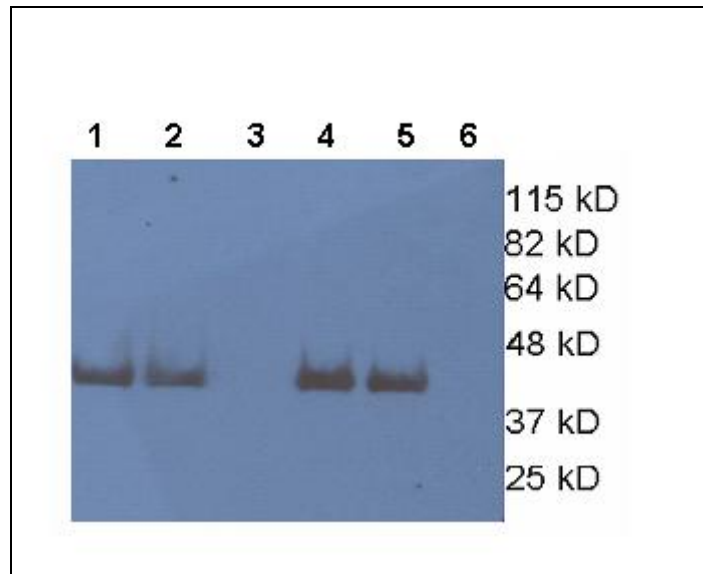
Die Wachstumskurve zeigt, dass die Integration der *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Expressionskassette keinen entscheidenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Bakterien hat.

Ferner kann aus der Grafik entnommen werden, dass die Orientierung des integrierten *tyrS*-Gens – in *cat*-Leserichtung oder gegen *cat*-Leserichtung (entspricht der Bezeichnung rev. in der Grafik) ohne Bedeutung für das Wachstumsverhalten der Bakterien ist.

Für die weiteren Arbeiten wurde das Plasmid pKD3-SpeI mit *tyrS*-HisTag in *cat*-Leserichtung aus dem Bakterienklon 2 gewählt, da die HisTag-Sequenz eine Detektion der Expression der Tyrosyl-tRNA-Synthetase ermöglicht.

4.3.3 Proteinexpressionstests

Um zu überprüfen, ob die normalerweise chromosomal kodierte Tyrosyl-tRNA-Synthetase auch gebildet wird, wenn der korrespondierende Gencode auf einem Plasmid lokalisiert ist, wurde ein Proteinexpressionstest durchgeführt. Des Weiteren konnte dadurch geklärt werden, ob die Auswahl der Promotorregion bei der Amplifizierung des *tyrS*-Abschnitts auf dem *E. coli* Genom (336 bp vor dem eigentlichen *tyrS*-Gen)(siehe 4.2) ausreichend war, um eine Expression des Plasmid lokalisierten Enzyms zu ermöglichen. Durch die Integration der HisTag-Sequenz in das *tyrS*-Gen konnte im Western Blot mit HisTag spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass das klonierte *tyrS*-Gen auf dem pKD3-Spel-Plasmid exprimiert wird. Zwischen den beiden möglichen Orientierungen der *tyrS*-Kassette im pKD3-Spel-Plasmid (rev. entspricht der Leserichtung entgegengesetzt zur Ableserichtung der Chloramphenicolresistenzkassette) ist beim Grad der *tyrS*-Expression kein Unterschied zu erkennen. Das *tyrS*-Gen hat eine Größe von ca.47 kD.



(Abbildung 21; Protein-Gelphoto)

Abb. 21: Western Blot aus Proteinisolationen von *E. coli* CC118 *pir*⁺-Zellpellet (siehe 3.3.1) mit Modifikationen im Plasmid pKD3 inkubiert mit Antikörper gegen das c-terminale HisTag-Produkt.

- Spur 1: pKD3-Spel *tyrS*-HisTag rev. Optische Dichte(OD): 1,0
- Spur 2: pKD3-Spel *tyrS*-HisTag OD: 1,0
- Spur 3: pKD3-Spel OD: 1,0
- Spur 4: pKD3-Spel *tyrS*-HisTag rev. Übernackkultur (ÜK)
- Spur 5: pKD3-Spel *tyrS*-HisTag ÜK
- Spur 6: pKD3-Spel ÜK

(rev. entspricht der Leserichtung des Plasmids entgegengesetzt zur Ableserichtung der Chloramphenicolresistenzkassette)

4.4 Modifikationen am pMO-Plasmid

4.4.1 Deletion von IS2-like-Element und Integration von *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag

Im Rahmen der Entwicklung des Balanced lethal Systems für *Salmonella typhi* Ty21a wurde das vermutlich essentielle *tyrS*-Gen . (Gerdes *et al.* 2003) in dem Bakterien-Chromosom deletiert, und auf dem pMO-PSA-CTX-Antigendelivery Plasmid ersetzt.

Bei den Klonierungsarbeiten wurde die *tyrS*-Expressionskassette in das pMO-PSA-CTX-Plasmid integriert

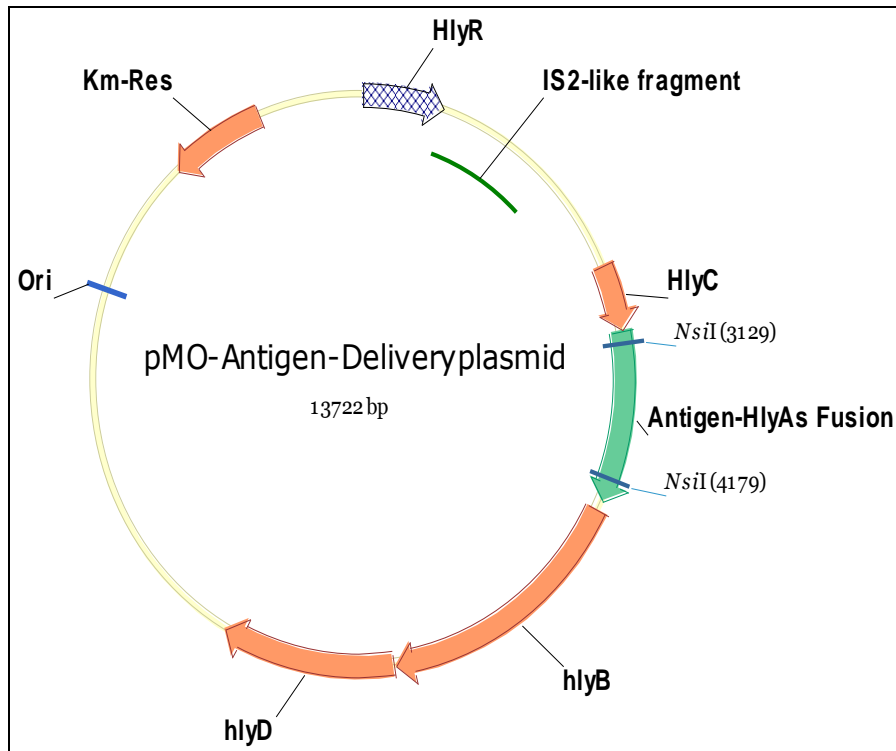
Um das Balanced lethal System später auch für andere tumorspezifische Antigene wie B-Raf nutzbar zu machen, wurde das *tyrS*-Gen auch in das Ausgangsplasmid: pMO-CTX integriert.

In einem ersten Schritt wurde ein IS2-like-Element aus dem pMO-PSA-CTX-Plasmid entfernt.

Bei dem IS2-like-Element besteht die Gefahr, dass es mit dem humanen Genom rekombiniert. Da der *Salmonella typhi* Ty21a Stamm mit dem Antigendelivery Plasmid pMO später im Menschen Anwendung finden soll, ist es von Vorteil wenn die Gefahr eines Austausches mit dem humanen Genom minimiert wird.

Das IS2-like-Element wird nicht von Restriktions-Schnittstellen begrenzt. Daher musste der Genabschnitt: IS2-HlyC-5hlyA-CTX-HlyAsig, der von einer SpeI- und einer BamHI-Restriktionssite umrahmt wird, komplett aus dem Plasmid entfernt werden. Anschließend wurde der um das IS2-like-Element verkürzte Abschnitt mit PCR amplifiziert und über eine eingefügte SpeI-Site in das pMO-Plasmid re-integriert.

Zur besseren Veranschaulichung:



(Abbildung 4; pMO-Antigendelivery Plasmid - Karte)

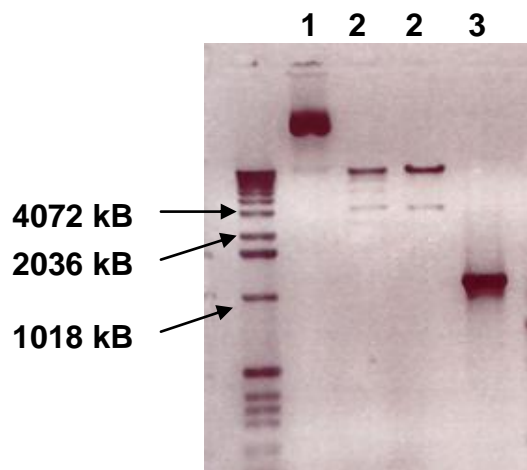
- Km-Res: Kanamycinresistenzgen (*nptII*-Gen)
- HlyC: Acyltransferase zur Aktivierung von HlyA (Stanley *et al.* 1998)
- HlyB/D : Bildung des Sekretionsapparats mit TolC (Gentschev *et al.* 2002)
- HlyR : Verstärkt die Bildung von α -Hämolysin (Vogel *et al.* 1988)
- Antigen-: Integrationsite zur Integration von tumorspezifischen
- HlyAs- Antigenen (z.B. PSA)
- Fusion:
- IS2-like: Sequenzen, die die Rekombination zwischen homologen
- fragment Sequenzen auf Chromosomen und Plasmiden erleichtert (Rijavec *et al.* 2007) Dies birgt jedoch die Gefahr der Rekombination mit dem humanen Genom bei späteren Anwendung im Menschen.
- NsiI: Schnittstelle

Das pMO-PSA-CTX-Plasmid wurde mit den Enzymen SpeI und BamHI in einem Ansatz bei 37°C 16 Stunden verdaut.

Ansatz Plasmid Verdau mit SpeI und BamHI	40	µl	1. pMO-PSA-CTX-Plasmid / 2. SpeI-BamHI-Fragment
	8	µl	10 x Puffer Tango
	24	µl	Millipore
	4	µl	BcuI (SpeI)
	4	µl	BamHI

Nach anschließender Dephosphorylierung mit dem Enzym Ciap wurde das verdaute Plasmid mit dem PCR-Purification-Kit ankonzentriert. (siehe 3.2.3.1)
Um das ausgeschnittene Fragment sicher vom Plasmid zu trennen, wurde der Ansatz aufs Gel aufgetragen und das geschnittene Plasmid mit dem Gel-Extraction-Kit aus dem Gel eluiert. (siehe 3.2.3.2)

Mit den Primern SpeI-IS2-Deletion-forward und IS2-Deletion-BamHI-reverse wurde ein PCR-Fragment erzeugt, das die Gene HlyC, 5hlyA und CTX-HlyAsig enthält. Für die Amplifikation wurde die Pfu-Polymerase verwendet. Die Elongationszeit betrug 4 Minuten, die Annealingtemperatur 52°C.



(Abbildung: 22; DNA-Gelphoto)

- Spur 1: pMO-PSA-CTX-Plasmid unverdaut
- Spur 2/2: pMO-PSA-CTX-Plasmid nach dem Doppelverdau SpeI/BamHI
- Spur 3: SpeI-BamHI-Fragment, das in das Plasmid re-integriert wurde

Das PCR-Fragment wurde ebenfalls in einem Doppelverdau mit SpeI und BamHI geschnitten. (siehe oben)

In Ligationsansätzen wurden pMO-PSA-CTX-Plasmid und SpeI-BamHI-Fragment über Nacht bei 4 °C mit der T4-Ligase inkubiert.

Ansatz DNA Ligation	1,0 µl	T4-DNA-Ligase
mit T4-DNA-Ligase	2,0 µl	10 x Ligasepuffer
	2,0-8,0 µl	pMO-PSA-CTX-Plasmid x SpeI, x BamHI
	1,0 µl	SpeI-BamHI-Fragment x SpeI, x BamHI
	8,0-14,0 µl	Millipore

Je 4 µl der Ligationen wurden in 100 µl elektrokompetente *E.coli* DH5α transformiert.

Die auf Kanamycin gewachsenen Kolonien wurden mit den Primern IS2-Del.seq-2-forward und IS2-Deletion-BamHI-reverse auf die Integration des PCR-Fragments getestet.

Um sicher zugehen, dass bei der PCR-Amplifikation und Plasmid-Integration des SpeI-BamHI-Fragments keine Fehler und Mutationen aufgetreten sind, wurde das pMO-PSA-CTX-ΔIS2-Plasmid des Bakterienklons 2 mit den Primern IS2-Del.seq-1-forward, IS2-Del.seq-2-forward und IS2-Del.seq-3-forward an der Integrationsite sequenziert.

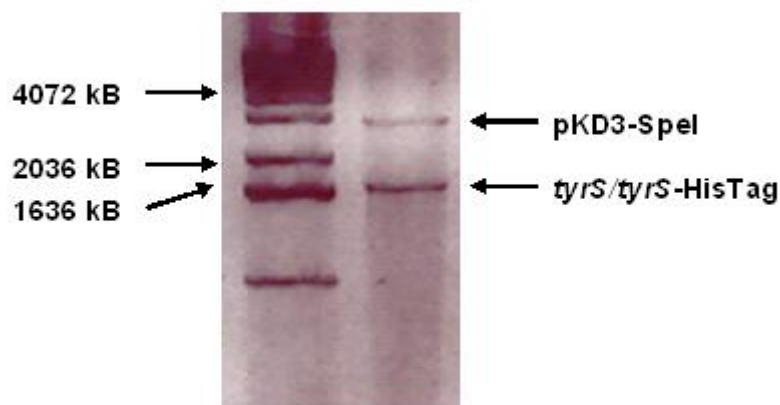
Das Sequenzierungsergebnis zeigte, dass das IS2-like-Element aus dem pMO-PSA-CTX-Plasmid entfernt wurde, und dass bei der Re-Integration des SpeI-BamHI-Fragments keine Basenaustausche aufgetreten waren.

Im nächsten Schritt wurde nun die *tyrS* bzw. die *tyrS*-HisTag-Expressionskassette in das Plasmid pMO-PSA-CTX-ΔIS2 aus Klon 2 integriert. Die *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Sequenz konnte hierfür mit dem SpeI-Enzym aus dem pKD3-SpeI-*tyrS*/*tyrS*-HisTag-Plasmid (beidesmal aus Klon 2) gewonnen werden, in das es bereits fehlerfrei integriert war.

Ansatz Plasmid-Verdau	40	μl	1. pMO-PSA-CTX ΔIS2-Plasmid (Klon 2)
Bcul (SpeI)			2. pKD3-SpeI <i>tyrS</i> bzw. <i>tyrS</i> - HisTag-Plasmid (Klon 2/2)
	8	μl	10 x Puffer Tango
	28	μl	Millipore
	4	μl	Bcul (SpeI)

Der Verdau wurde 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Bande bei 1600 Basenpaaren ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraktions Kit aufgereinigt. Sowohl die *tyrS*-Kassette, als auch die *tyrS*-HisTag-Kassette wurden auf diese Weise isoliert. (siehe 3.2.3.2)



(Abbildung: 23; DNA-Gelphoto)

Abb. 23: pKD3-SpeI-*tyrS*/*tyrS*-HisTag nach 2h SpeI-Verdau bei 37 °C
Isolation von Bande *tyrS*/*tyrS*-HisTag

Für die Integration der *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Kassette in das Plasmid pMO-PSA-CTX-ΔIS2 wurde der Vektor mit dem SpeI-Restriktionsenzym verdaut. (siehe oben)

Um Religationen zu verhindern, wurde das Plasmid anschließend mit dem Enzym Ciap dephosphoryliert. Dem oben beschriebenen Restriktionsansatz wurden hierzu 3 mal 1 μl Enzym im Abstand von 45 Minuten zugegeben.

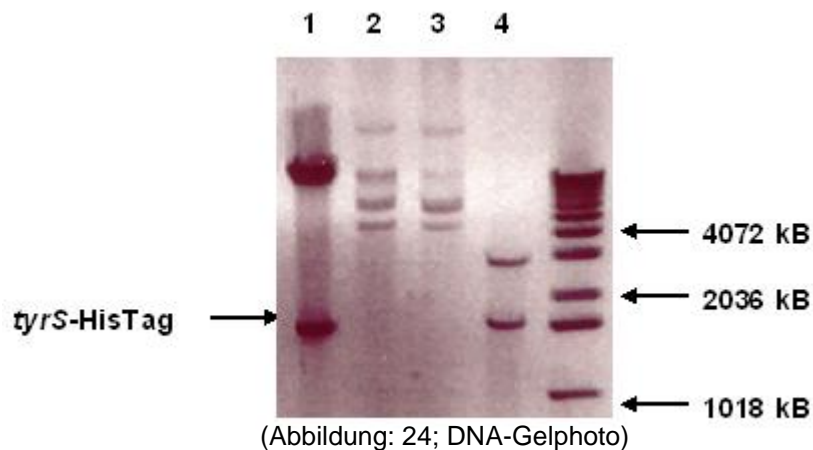
Nach erfolgter Aufreinigung wurde aus dem *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Komplex und dem verdauten Vektor ein Ligationsansatz zusammengestellt.

Ansatz DNA Ligation	1,0	µl	T4-DNA-Ligase
mit T4-DNA-Ligase	2,0	µl	10 x Ligasepuffer
	1,0	µl	Plasmid pMO-PSA-CTX ΔIS2 x SpeI (Klon 2)
	9,0	µl	<i>tyrS</i> / <i>tyrS</i> -HisTag-Fragment x SpeI
	6,0	µl	Millipore

Der Ansatz wurde bei 16 °C 2 Tage inkubiert. 2,4 und 6 µl der Ligation wurden in 100 µl elektrokompente *E.coli* DH5α elektroporiert. Auf Kanamycin-Platten gewachsene Kolonien wurden mit Koloniescreening-PCR und den Primern SpeI-TyrS-EPK-forward, TyrS-EPK-SpeI-reverse und pMO-TyrS-screen-forward auf die Integration der *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Kassette untersucht.

Die Primerkombinationen SpeI-TyrS-EPK-forward - pMO-TyrS-screen-forward und pMO-TyrS-screen-forward - TyrS-EPK-SpeI-reverse ermöglichen die Detektion der *tyrS*-Kassette im Plasmid pMO-PSA-CTX-ΔIS2 sowohl in Leserichtung der Hämolyseexpressionskassette als auch entgegengesetzt. Um zu testen, ob die Orientierung der *tyrS*-Kassette Einfluss auf die Expression des Proteins Tyrosyl-tRNA-Synthetase hat, ist es wichtig beide möglichen Klone zu isolieren.

Für die Bestätigung der Screening-PCR wurde das Plasmid pMO-PSA-CTX-ΔIS2-*tyrS*/*tyrS*-HisTag aus *E. coli* isoliert und mit dem SpeI-Restriktionsenzym testverdaut:



- Spur 1: verdautes Plasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2 mit herausgespaltenem *tyrS*-HisTag-Fragment
- Spur 2/3: negative Klone
- Spur 4: verdautes pKD3-SpeI-Plasmid mit herausgespaltenem *tyrS*-HisTag

Das *tyrS*-Fragment und das *tyrS*-HisTag-Fragment wurden jeweils in beiden möglichen Orientierungen in das Plasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2 integriert. Auf eine Sequenzierung konnte verzichtet werden, da das *tyrS*/*tyrS*-HisTag-Fragment aus dem pKD3-SpeI-*tyrS*/*tyrS*-HisTag Plasmid (jeweils Klon 2) isoliert worden war. Für die weiteren Arbeiten wurde das pMO-PSA-CTX-*tyrS*-Plasmid aus Klon 3 bzw. pMO-PSA-CTX-*tyrS*-HisTag-Plasmid aus Klon 1 verwendet.

Das PSA-Gen ist in das pMO-PSA-CTX-Plasmid integriert und kann nicht selektiv ausgeschnitten werden. Da das Balanced lethal System auch für andere tumorspezifische Antigene nutzbar sein soll, muss das *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragment auch in das Ausgangsplasmid pMO-CTX integriert werden. Um die aufwendige Deletion der IS2-like-Kassette zu umgehen, wurde das PSA-CTX-Fragment, das von NSI-Schnittstellen begrenzt wird, aus dem Plasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2 (Klon 2) ausgeschnitten.

Ansatz Plasmid-Verdau mit Nsil (Avalll)	40	μl	1. Plasmid pMO-PSA-CTX- ΔIS2 (Klon 2)
			2. pMO-CTX-Plasmid
	8	μl	10 x Puffer R
	28	μl	Millipore
	4	μl	NSI-Enzym

Der Ansatz wurde 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Plasmid mit dem Enzym Ciap dephosphoryliert.

Um das CTX-Gen wieder in das pMO-Plasmid zu integrieren. Wurde es aus dem pMO-CTX-Plasmid isoliert. (siehe oben)

Der Verdau wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das CTX-Gen mit einer Länge von ca. 500 Basenpaaren aus dem Gel eluiert. (siehe 3.2.3.2)

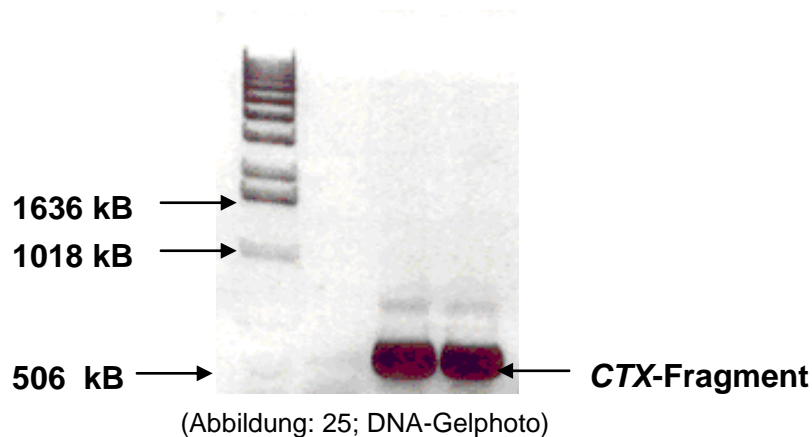


Abb. 25: CTX-Fragment nach Verdau

Aus dem CTX-Fragment und dem mit Spel verdauten Plasmid pMO-ΔIS2 wurde anschließend ein Ligationsansatz zusammengestellt.

Ansatz DNA Ligation	1,0	μl	T4-DNA-Ligase
mit T4-DNA-Ligase	2,0	μl	10 x Ligasepuffer
	1,0	μl	pMO-ΔIS2-Plasmid x Nsil
	16,0	μl	CTX-Fragment x Nsil
	0	μl	Millipore

Nach 16 Stunden Inkubation bei 16 °C wurden 4 µl des Gemisches in 100µl elektrokompetente *E. coli* DH5α transformiert.

Auf Kanamycin-Platten gewachsene Klone wurden mit den Primern PMO-hly-f und Ctx-screen-forward auf die erfolgreiche Integration der CTX-Kassette untersucht.

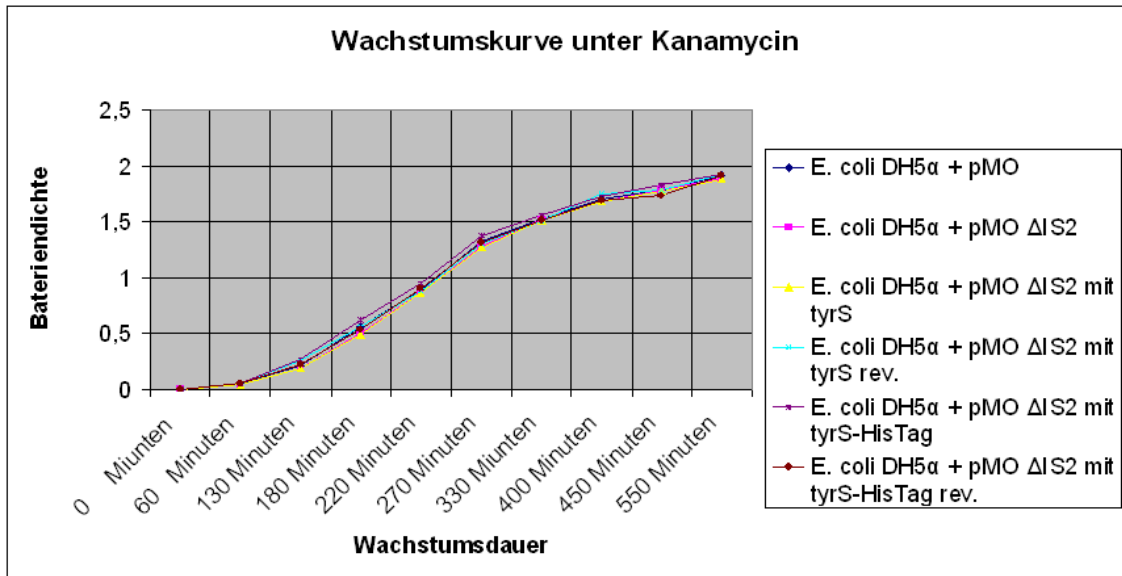
In das erhaltene pMO-CTX-ΔIS2-Plasmid, wurde anschließend das *tyrS* bzw. das *tyrS*-HisTag-Fragment kloniert. Das Vorgehen gleicht dem Integrationsverfahren des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragments in das Plasmid pMO-PSA-CTX-ΔIS2 und wird daher nicht näher beschrieben. Sowohl *tyrS* als auch *tyrS*-HisTag stammen aus den pKD3-Spel-*tyrS*/*tyrS*-HisTag-Plasmiden (jeweils aus Klon 2), in die beide Gene bereits integriert wurden. (siehe Kapitel 4.3.1)

Für die Aufbewahrung in der Stammsammlung wurden die Klone: 4 für das Plasmid pMO-CTX-*tyrS* bzw. 16 für das Plasmid pMO-CTX-*tyrS*-HisTag isoliert und bei – 80°C gelagert.

4.4.2 Erstellung von Wachstumskurven

Bedouelle *et al.* zeigte in *E. coli*, dass die Überexpression des *tyrS*-Gens toxisch für den Bakterien-Stamm ist. (Bedouelle *et al.* 1990)

Es wurden deshalb Wachstumskurven mit den verschiedenen Modifikationen im pMO-Anitgendelivery Plasmid durchgeführt.



(rev.: die Integrationsrichtung des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragments ist entgegengesetzt der Leserichtung der Hämolysesekretionskassette)

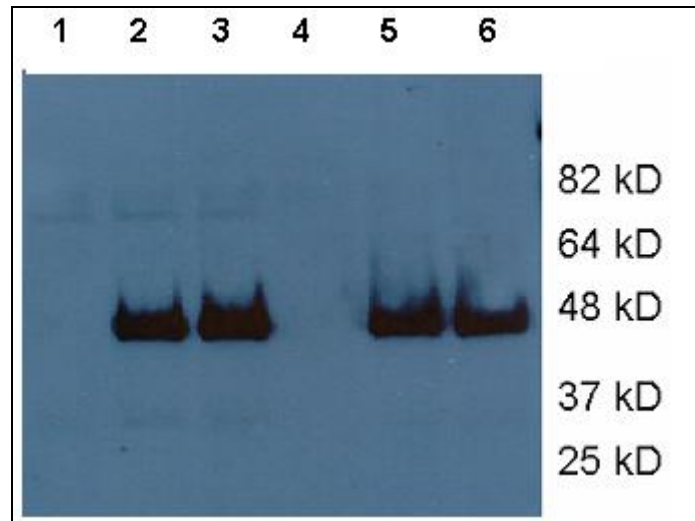
Wie die Grafik zeigt, ist keine Veränderung der Wachstumskurven der *E. coli*-Stämme mit den verschiedenen Modifikationen im pMO-PSA-CTX-Antigendelivery Plasmid festzustellen.

Sowohl die IS2-like-Deletion als auch die Orientierung des *tyrS* bzw. des *tyrS*-HisTag-Fragments haben keinen detektierbaren Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Trägerstammes. Die Wachstumskurve wurde durch Messung der optischen Dichte einer Flüssigkultur bei 600 nm durchgeführt. Beim Erreichen der stationären Phase wurde die Messung abgebrochen.

4.4.3 Proteinexpressionstests

Von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität des Balanced lethal Systems ist die Expression des *tyrS*-Gens auf dem Antigendelivery Plasmid pMO. Nur wenn das *tyrS*-Gen auf dem pMO-Plasmid die Tyrosyl-tRNA-Synthetase in ausreichender Menge exprimiert, kann damit die Deletion dieses essentiellen Gens auf dem Genom komplementiert werden.

Es wurde deshalb durch das Western Blot Verfahren die Expression des *tyrS*-HisTag Komplexes mit Hilfe von HisTag-Antikörpern überprüft.



(Abbildung: 26; Protein-Gelphoto)

Abb. 26: Western Blot aus Proteinisolationen von *E. coli*-Zellpellet (siehe 3.3.1) mit Modifikationen im Plasmid pMO inkubiert mit Antikörper gegen das c-terminale HisTag des *tyrS*-HisTag-Komplexes.

- Spur 1: pMO-PSA-CTX Übernachtkultur (ÜK)
- Spur 2: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag ÜK
- Spur 3: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag rev. ÜK
- Spur 4: pMO-PSA-CTX Optische Dichte: 1,0 (OD)
- Spur 5: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag OD: 1,0
- Spur 6: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag rev. OD: 1,0

(rev.: die Integrationsrichtung des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragments ist entgegengesetzt der Leserichtung der Hämolysesekretionskassette)

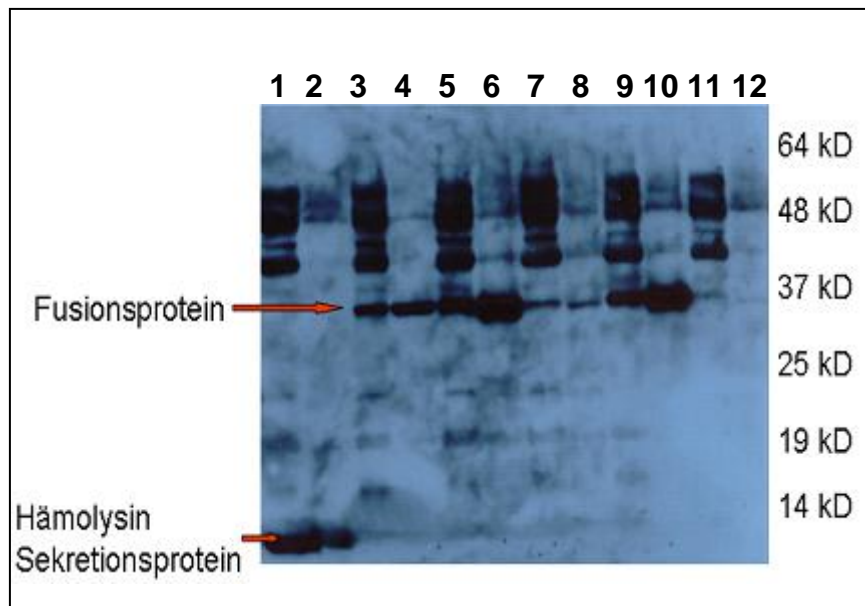
Das SDS-Gel zeigt die Expression des *tyrS*-HisTag-Fragments auf dem Plasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag. Die Proteinisolierung wurde sowohl bei einer optischen Dichte von 1,0 als auch nach ca. 16 Stunden Übernachtkultur durchgeführt. Die Orientierung der *tyrS*-Kassette hat keinen detektierbaren Einfluss auf die Stärke der Proteinexpression.

Die Integration des *tyrS* bzw. des *tyrS*-HisTag-Fragments in das pMO-Plasmid darf die Funktionalität des Hämolyisin- α -Sekretionssystems nicht beeinflussen. Ebenso muss das tumorspezifische Antigen weiterhin sezerniert werden.

Um die beiden Eigenschaften des pMO-Plasmids zu überprüfen, wurde der Proteinüberstand aus *E. coli* Kulturen mit den verschiedenen Modifikationen im pMO-Plasmid gewonnen. (siehe 3.3.2)

Durch Antikörper gegen das Hämolyisin, das Prostata Spezifische Antigen und das Choleratoxin konnte im Western Blot gezeigt werden, dass die Funktionalität des Hämolyisin- α -Sekretionssystems durch die Integration der *tyrS*-Kassette in *E. coli* nicht aufgehoben wird. Auch das tumorspezifische Antigen PSA konnte weiterhin detektiert werden.

Aus den unten aufgeführten Protein-Gelen kann auch geschlossen werden, dass die Richtung der *tyrS*-Kassette im pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag-Plasmid die Funktionalität des Hämolyisin- α -Sekretionssystems beeinflusst. Ist das *tyrS*-Fragment entgegengesetzt der Leserichtung der Hämolyisinexpressionskassette integriert, so wird das tumorspezifische Antigen PSA deutlich weniger sezerniert. Bei den weiteren Arbeiten wurde das Plasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag aus Bakterienklon 1 verwendet.

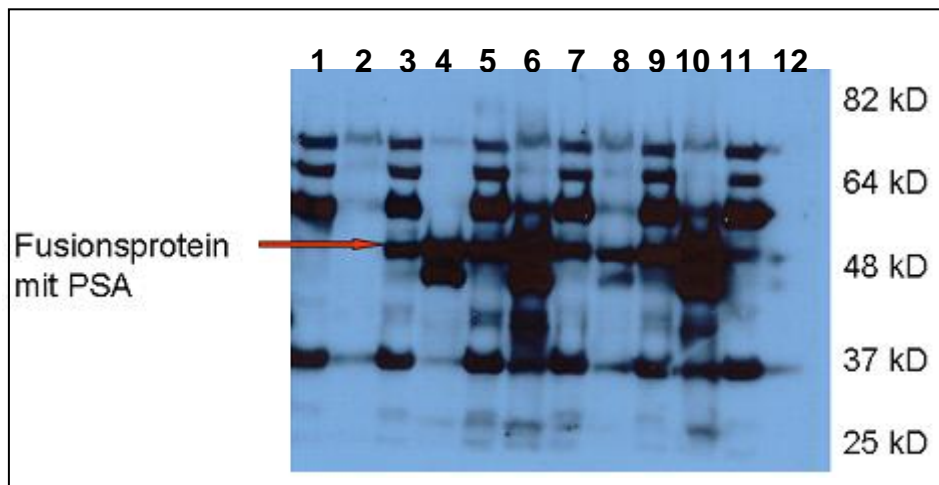


(Abbildung: 27; Protein-Gelphoto)

Abb. 27: Western Blot aus Proteinisolationen von *E. coli*-Überstand (siehe 3.3.2) mit Modifikationen im Plasmid pMO inkubiert mit Antikörper gegen das Hämolyisin-Sekretionsprotein bzw. das Fusionsprotein aus dem Hämolyisin-Sekretionsprotein und PSA.

- Spur 1: pMO-CTX Zellpellet (ZP)
- Spur 2: pMO-CTX Überstand (ÜS)
- Spur 3: pMO-PSA-CTX- Δ IS2 ZP
- Spur 4: pMO-PSA-CTX- Δ IS2 ÜS
- Spur 5: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag ZP
- Spur 6: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag ÜS
- Spur 7: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag rev. ZP
- Spur 8: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag rev. ÜS
- Spur 9: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS* ZP
- Spur 10: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS* ÜS
- Spur 11: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS* rev. ZP
- Spur 12: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS* rev. ÜS

(rev.: die Integrationsrichtung des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragments ist entgegengesetzt der Leserichtung der Hämolyisinsekretionskassette)



(Abbildung: 28; Protein-Gelphoto)

Abb. 28: Western Blot aus Proteinisolationen von *E. coli*-Überstand (siehe 3.3.2) mit Modifikationen im Plasmid pMO inkubiert mit Antikörper gegen das Prostata Spezifische Antigen (PSA) bzw. das Fusionsprotein aus dem Hämolyisin-Sekretionsprotein und PSA.

- Spur 1: pMO-CTX Zellpellet (ZP)
- Spur 2: pMO-CTX Überstand (ÜS)
- Spur 3: pMO-PSA-CTX- Δ IS2 ZP
- Spur 4: pMO-PSA-CTX- Δ IS2 ÜS
- Spur 5: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag ZP
- Spur 6: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag ÜS
- Spur 7: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag rev. ZP
- Spur 8: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag rev. ÜS
- Spur 9: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS* ZP
- Spur 10: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS* ÜS
- Spur 11: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS* rev. ZP
- Spur 12: pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS* rev. ÜS

(rev.: die Integrationsrichtung des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Fragments ist entgegengesetzt der Leserichtung der Hämolyisinsekretionskassette)

4.5 Der chromosomale Knockout der *tyrS*-Kassette und dessen Komplementierung

Die Deletion des *tyrS*-Gens aus dem *Salmonella typhi* Ty21a Genom wurde mit einem modifizierten Verfahren von Datsenko und Wanner (Datsenko *et al.* 2000) durchgeführt. (siehe 1.2.3.1.2)

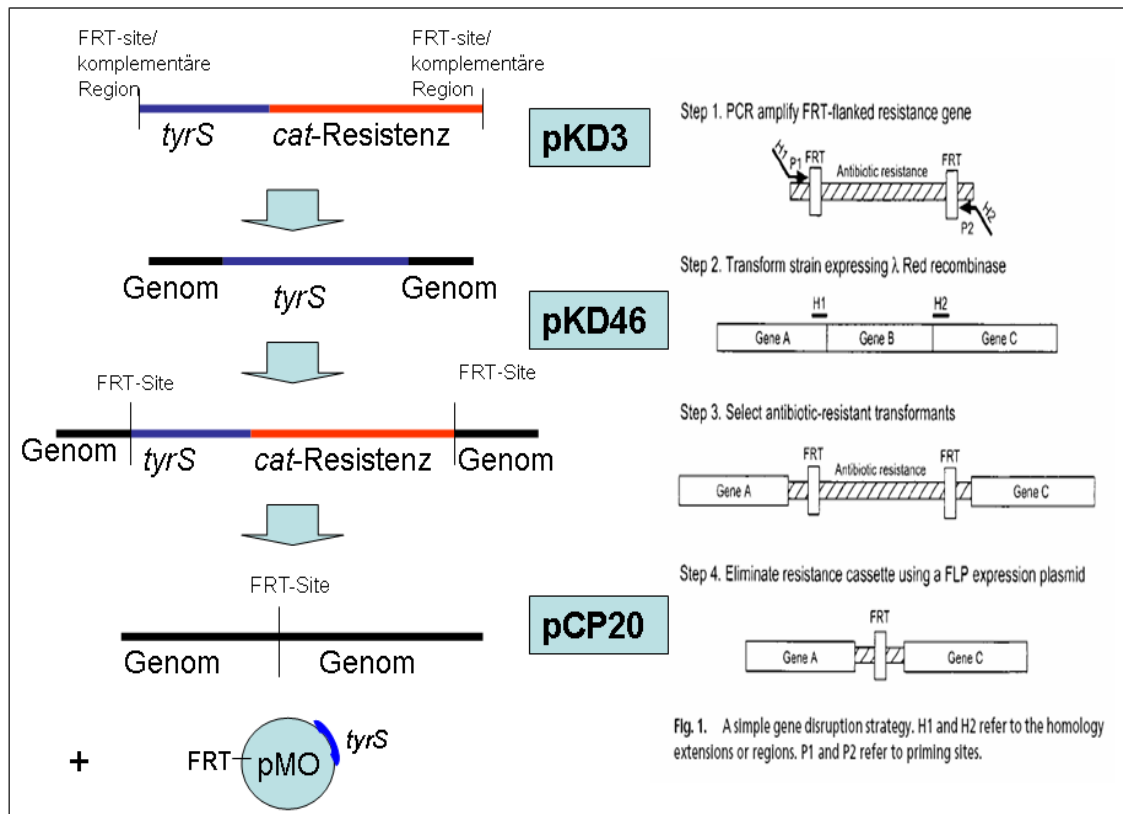
Da die Tyrosyl-tRNA-Synthetase in Bakterien vermutlich essentiell ist, (Wakasugi *et al.* 1998; Woese, *et al.* 2000; Gerdes *et al.* 2003)

kann das *tyrS*-Gen nicht einfach gegen eine Antibiotikaresistenzkassette ausgetauscht werden. Die deletierten Bakterien wären höchst wahrscheinlich nicht lebensfähig

Bei der Rekombination des PCR-Fragments mit dem chromosomalen *tyrS*-Gen wurde deshalb das essentielle Gen gegen eine *tyrS*-Chloramphenicolresistenz(*cat*)-Kassette ausgetauscht.

Des Weiteren mussten wir bei der Konzeption der Erstellung eines Balanced lethal Systems darauf achten, dass im Moment der Deletion der *tyrS*-Antibiotikaresistenzkassette aus dem Bakterien-Genom das *tyrS*-Gen bereits auf dem pMO-Plasmid komplementiert ist.

Zum besseren Verständnis wurde im Folgenden das klassische Datsenko Wanner Prinzip mit den von mir durchgeführten, nötigen Modifikationen bei der Deletion eines essentiellen Gens aus dem Bakteriengenom gegenübergestellt:



(Abbildung: 29; Darstellung der Modifikationen der D. u. W. Methode)

4.5.1 Amplifizierung des *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragments

Für den Austausch des *tyrS*-Gens gegen ein *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragment im *Salmonella* Genom wurde zunächst ein lineares Rekombinationsprodukt mittels Polymerase-Kettenreaktion hergestellt.

Das Verfahren wurde unter strengen Dokumentationsvorschriften durchgeführt. (siehe 3.4)

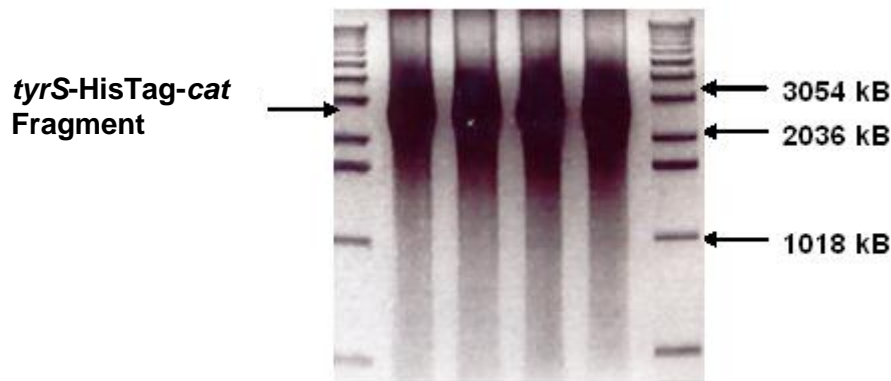
Als Template für die PCR-Amplifikation des *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragments diente das Hilfsplasmid pKD3-Spel-*tyrS*-HisTag aus Bakterienklon 2, in welches die *tyrS*-HisTag-Kassette in Leserichtung des *cat*-Gens integriert wurde. (siehe 4.3.1)

Die verwendeten Primer Knockout-forward und Knockout-reverse bestehen aus 74 bzw. 69 Basenpaaren. Sie enthalten Bereiche, die homolog zu den 5' – bzw. 3'- Enden des *tyrS*-Gens des *Salmonella typhi* Ty21a Genoms sind. Ebenso enthalten sie Abschnitte, die mit den Randbereichen der von FRT-Sites

begrenzten *tyrS*-HisTag-*cat*-Region auf dem pKD3-Spel-*tyrS*-HisTag-Plasmid, hybridisieren.

Das 2803 Basenpaare lange Knockout PCR-Produkt wurde mit der Taq-Polymerase amplifiziert. Die Annealing-Temperatur lag bei 50 °C, die Kettenverlängerungszeit betrug 4 Minuten.

Aufgrund der geringeren Amplifikationsfehlerrate wurde auch versucht das PCR-Fragment mittels Phusion-Taq, I-Proof, Pfu-Polymerase und Turbo-Pfu-Polymerase herzustellen, die Amplifizierung mit diesen Polymerasen ergab jedoch kein, bzw. nur geringe Mengen des gewünschten PCR-Produkts.



(Abbildung: 30; DNA-Gelphoto)

Abb. 30 : *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragment für chromosomale Rekombination

Es wurden jeweils 4 µl PCR-Produkt aufgetragen.

Für die Herstellung des Rekombinationsstranges wurde das pKD3-Spel – Plasmid aus Bakterienklon 2 mit *tyrS*-HisTag-Kassette in Leserichtung des *cat*-Gens verwendet.

Da bei den durchgeführten Wachstumskurven keine negative Auswirkung des HisTag-Anhangs zu erkennen war und die HisTag-Sequenz laut Literatur die biologische Aktivität des Enzyms nicht behindert (Wahlsten *et al.* 1996; Kiga *et al.* 2002), wurde die chromosomale Integration mit der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette durchgeführt.

Die Verwendung dieses Fragments bietet die Möglichkeit den integrierten *tyrS-cat*-Abschnitt im *Salmonella typhi* Ty21a Genom mit HisTag-Antikörpern zu detektieren.

Zur Herstellung des *tyrS*-HisTag-*cat*-Knockout-Fragments wurden 16 Ansätze a 50 µl (= 800 µl) in einem Mastermix zusammengestellt

Ansatz Taq Polymerase	5,0	µl	10 x Taq Puffer
(in 50 µl)	1,0	µl	dNTPs-Mix (20 mM)
	0,5	µl	Taq-Polymerase
	0,5	µl	Primer Knockout-forward
	0,5	µl	Primer Knockout–reverse
	39,5	µl	Millipore
	3,0	µl	pKD3 mit <i>tyrS</i> -HisTag

Anschließend wurden jeweils 200 µl PCR-Ansatz mit dem PCR-Purification-Kit über eine Säule aufgereinigt und die gebundene DNA jeder Säule mit 43 µl Wasser für Injektionszwecke eluiert. (siehe 3.2.3.1)

Um das Template-Plasmid: pKD3-SpeI-*tyrS*-HisTag des PCR Ansatzes zu entfernen, wurden die eluierte DNA mit dem DpnI-Enzym bei 37°C 16 Stunden verdaut.

Ansatz DpnI Verdau	40	µl	aufgereinigter PCR-Ansatz
(4X)	8	µl	10 x Puffer R
	28	µl	Millipore
	4	µl	DpnI

Die 320 µl DpnI-Verdau wurde anschließend in 8 Spuren gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Banden bei 2800 Basenpaaren ausgeschnitten und mit dem Gel-Extraktion Kit aufgereinigt. Dabei wurden alle 8 Banden über eine Säule ankonzentriert und das *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragment mit 43 µl Wasser für Injektionszwecke eluiert. (siehe 3.2.3.2)

Anschließend wurde das Eluat in 5 µl Mengen aliquotiert und bei -20° C gelagert.

Die starke Ankonzentration des *tyrS*-HisTag-*cat* Fragments ist für eine erfolgreiche chromosomale Rekombination nötig.

4.5.2 Integration des *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragments in das *Salmonella typhi* Ty21a Genom

Da der Impfstamm *Salmonella typhi* Ty21a später im Menschen Anwendung finden soll, wurde die chromosomale Integration der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette unter Bedingungen der strengen Dokumentation durchgeführt.

(siehe 3.4 Arbeiten unter strengen Dokumentationsvorschriften)

Dies ist von großer Bedeutung, da bei der chromosomalen Integration das Genom des *Salmonella typhi*-Stamms modifiziert wird. Aufgrund der strengen Richtlinien, die bei der Herstellung von Arzneimitteln und Impfstoffen gelten, muss später eine lückenlose Nachvollziehbarkeit der genetischen Modifikationen des Impfstamms gewährleistet sein.

Zunächst wurde das Hilfsplasmid pKD46 unter strengen Dokumentationsvorschriften mit dem Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen isoliert.

Auf dem Plasmid pKD46 ist das Enzym Rekombinase kodiert, das über einen Arabinose induzierbaren Promotor verfügt. Die Rekombinase soll die Rekombination zwischen dem hergestellten PCR-Fragment *tyrS*-HisTag-*cat* (siehe 4.5.1) und dem *tyrS*-Gen des *Salmonella typhi* Ty21a-Stamms durchführen. Das isolierte Plasmid wurde in elektrokompente *Salmonella typhi* Ty21a Bakterien transformiert. Die verwendeten Zellen stammen aus einer bereits früher durchgeführten Produktion mit strengen Dokumentationsvorschriften. Durch das Wachstum auf speziell definierten Ampicillin–Agarplatte wurden die transformierten Bakterien auf die Aufnahme von pKD46 selektioniert, das ein Ampicillin-Resistenzgen trägt.

Die Inkubation nach der Elektroporation erfolgte ausschließlich bei 30 °C, da pKD46 bei höheren Temperaturen nicht repliziert wird und somit verloren geht.

Der *Salmonella typhi* Ty21a Stamm mit pKD46 wurde anschließend in LB-Medium mit 0,2 L-(+)-Arabinose (zur Induktion der Gene β γ und *exo*) und unter Ampicillin Selektionsdruck bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0,8 inkubiert und anschließend elektrokompotent gemacht. Die Inkubation und das Verfahren zur Elektrokompotentmachung wurden ebenfalls unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften durchgeführt.

Anschließend wurde das PCR-Fragment: *tyrS*-HisTag-*cat* (siehe 4.5.1) unter definierten Bedingungen in die elektrokompotenten *Salmonellen* elektroporiert und die Transformanten bei 30 °C auf LB-Platten mit einer Chloramphenicolkonzentration von 5 µg/ml und einer Arabinosekonzentration von 0,2 % selektiert. Nur Bakterien, bei denen eine Rekombination mit dem PCR-Fragment erfolgt war, konnten auf den Chloramphenicol-Platten wachsen. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR wurden nun die *Salmonellen*-Kolonien identifiziert, bei denen die Rekombination zwischen dem chromosomalen *tyrS*-Gen und dem *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragment an der richtigen Stelle stattgefunden hatte.

Die Kolonien wurden dabei unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften gepickt und auf definierten Agarplatten gesichert. Das PCR-Screenen konnte deshalb unter normalen Laborbedingungen durchgeführt werden. Die verwendeten Primer *pdxH*-forward-neu und *pdxY*-reverse binden 550 Basenpaare vor, bzw. 200 Basenpaare nach der Rekombinationssite auf dem *Salmonella typhi* Ty21a Genom. Mit dem rekombinierten *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragment ergibt sich ein PCR-Produkt von 3550 Basenpaaren, wohingegen beim Wildtyp *Salmonella typhi* Ty21a Bakterium mit dieser Primerkombination ein Fragment von 1600 Basenpaaren amplifiziert wird.

Die Elongationszeit der Screening-PCR mit der Taq-Polymerase betrug 4 Minuten, die Hybridisierungstemperatur lag bei 50 °C.

Bei 170 überprüften Kolonien konnten 2 positive Klone gefunden werden. Es wurde Klon 117 (Bild: Klon I) und Klon 120 (Bild: Klon II) isoliert und bei -80 °C unter zertifizierten-Bedingungen gelagert. (siehe 3.1.2)



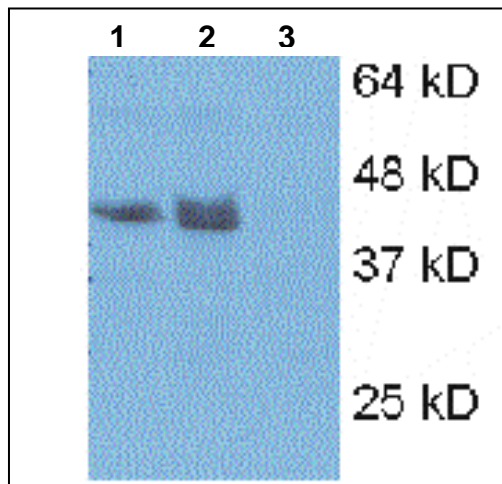
(Abbildung: 31; DNA-Gelphoto)

Abb. 31 : *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragment bei Klon I (Klon 117) und Klon II (Klon 120) mit chromosomaler Integration

Die Rekombination wurde auch mit den Primerkombinationen: pdxY-reverse/ FRT-site-forward; pdxY-reverse/FRT-site-reverse; pdxH-forward-neu/ FRT-site-forward; pdxH-forward-neu/ FRT-site-reverse; pKD3-seq-2-forward/ pdxY-reverse und pdxH-forward-neu/ Cm-reverse überprüft. Die Ergebnisse dieser PCR-Banden entsprachen den Größen der zu erwartenden PCR-Fragmente.

Die Schnittstellen des *Salmonella typhi* Ty21a Genoms mit der integrierten PCR-Sequenz wurden mit den Primern pdxH-forward-neu, Cm-reverse, pdxY-reverse, SpeI-TyrS-EPK-forward und TyrS-EPK-SpeI-reverse sequenziert. Das Ergebnis zeigte die erfolgreiche Integration des *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragments in das *Salmonella* Genom. Die für den Knockout entscheidenden FRT-Sites wurden durch die Sequenzierung ebenfalls fehlerfrei dargestellt.

Da das chromosomale *tyrS*-Gen nun über eine HisTag-Region verfügt, konnte die Expression der Tyrosyl-tRNA-Synthetase im Western Blot mit HisTag-Antikörpern detektiert werden.



(Abbildung: 32, Protein-Gelphoto)

Abb. 32: Western Blot aus Proteinisolationen von *Salmonella typhi* Ty21a-Zellpellet (siehe 3.3.1) mit chromosomaler Integration des *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragments inkubiert mit Antikörper gegen das c-terminale HisTag des *tyrS*-HisTag-Komplexes.

- Spur 1: *Salmonella typhi* Ty21a mit chromosomaler Integration des *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragments, Klon:117, Übernachtskultur (ÜK)
 Spur 2: *Salmonella typhi* Ty21a mit chromosomaler Integration des *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragments, Klon:120, Übernachtskultur (ÜK)
 Spur 3: *Salmonella typhi* Ty21a mit pMO-PSA-CTX (ÜK)

Um das temperatursensitive pKD46 aus dem *Salmonella*-Stamm zu entfernen, wurden die Kolonien über Nacht bei 37 °C koloniegereinigt.

Die Schritte bis zur chromosomalen Integration des PCR-Fragments, mit Ausnahme des Screenings, wurden unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften durchgeführt.

4.5.3 Excision des *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragments

Zur Erstellung des Balanced lethal Systems musste in einem Schritt das chromosomal integrierte *tyrS*-HisTag-*cat*-Fragment und die Kanamycinresistenzkassette aus dem Antigenelivery Plasmid pMO deletiert werden.

Dieser Schritt erwies sich hingegen den Erwartungen als äußerst schwierig. Die Deletion der chromosomalen Integration wurde deshalb nicht unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften durchgeführt, da zunächst die Methode und die Bedingungen etabliert werden mussten. Da der *Salmonella typhi* Ty21a Stamm mit dem *tyrS*-HisTag-*cat* Fragment jedoch unter definierten Bedingungen hergestellt wurde, kann der Knockout jetzt jederzeit unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften einfach durchgeführt werden.

In einem ersten Schritt wurde das Plasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag in den *Salmonella typhi* Ty21a Stamm (Klon 117) mit der chromosomalen *tyrS*-HisTag-*cat*-Integration elektroporiert.

Anschließend wurde die Rekombinase-Flipase, die auf dem Plasmid pCP20 kodiert ist, in den *Salmonella* Stamm mit dem bereits enthaltenen pMO-PSA-CTX-*tyrS*-HisTag-Plasmid transformiert. Die Selektion auf die Aufnahme beider Plasmide wurde auf Amp-Kan-Platten bei 30 °C Inkubationstemperatur durchgeführt.

Die niedrige Temperatur ist nötig, um das hitzesensitive Plasmid pCP20 nicht zu verlieren. Kolonien waren auf den Doppeltransformationsplatten erst nach ca. 48 h sichtbar.

Die 2. Transformation des instabilen Hilfsplasmids pCP20 war nur mit DNA-Menge von mindestens 1,2 μ g (4 μ l Konzentration 300 ng/ μ l) erfolgreich.

Für den Knockout der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette aus dem *Salmonella typhi* Ty21a Genom (Klon 117) und die Deletion der Kan-Resistenzkassette aus dem Plasmid pMO mit dem integrierten *tyrS*-HisTag-Komplex wurden verschiedenste Bedingungen getestet.

Letztendlich erwies sich nur folgendes Vorgehen als erfolgreich:

Der *Salmonella*-Stamm mit der chromosomal integrierten *tyrS*-HisTag-*cat* Kassette und den aufgenommenen Plasmiden pCP20 und pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag wurde bei 29 °C in Kan-Amp-BHI-Medium inkubiert.

Nach 16 h wurde ein BHI Flüssigmedium im Verhältnis 1 zu 1000 mit der Übernachtskultur angeimpft. Das Wachstum erfolgte unter Amp-Selektionsdruck. Die Kultur wurde abwechselnd 1 h bei 37°C und 1 h bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Insgesamt wurde der Temperaturshift viermal durchgeführt. Nach 8 h wurde ein BHI-Flüssigmedium im Verhältnis 1 zu 1000 mit der geschifteten Kultur angeimpft. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und die Stufen 4 bis 7 auf BHI-Platten ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C waren Kolonien auf den Platten der Verdünnungsreihe sichtbar.

Es musste nun überprüft werden, ob die *Salmonella typhi* Ty21a Kolonien folgende Antibiotikaresistenzen verloren hatten:

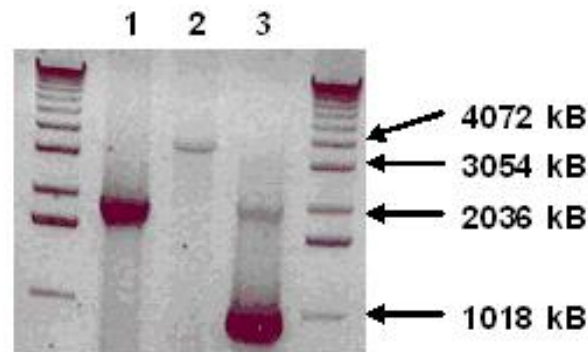
1. Die chromosomal lokalisierte Chloramphenicol-Resistenz
2. Die auf dem pMO-Plasmid lokalisierte Kanamycin-Resistenz und
3. Die Ampicillin-Resistenz des hitzesensitiven Hilfsplasmids pCP20.

50 *Salmonella* Kolonien wurden deshalb jeweils auf Amp, Kan, Cm und BHI Platten übertragen.

Nach 24 h Inkubation bei 37 °C waren bei den 50 getesteten Kolonien kein Wachstum auf Kan, Amp oder Cm Agarplatten mehr festzustellen.

Die Überprüfung der chromosomalen Deletion wurde mit den Primern pdxY-reverse und pdxH-forward-neu durchgeführt.

Es ergab sich ein chromosomales Restfragment von 900 Basenpaaren.



(Abbildung: 33; DNA-Gelphoto)

- Spur 1: *tyrS*-Kassette in *Salmonella typhi* Ty21a Wildtyp (1681 bp)
- Spur 2: *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette chromosomal integriert in bei *Salmonella typhi* Ty21a (3550 bp)
- Spur 3: *Salmonella typhi* Ty21a–Knockoutstamm mit Komplementation (900 bp)

Das Fragment wurde mit den Primern pdxY-reverse, pdxH-forward-neu und pdxH-forward 3 sequenziert. Es konnte die vollständige Deletion der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette aus dem Genom dargestellt werden. Auf dem Genom verbleibt lediglich eine FRT-Site.

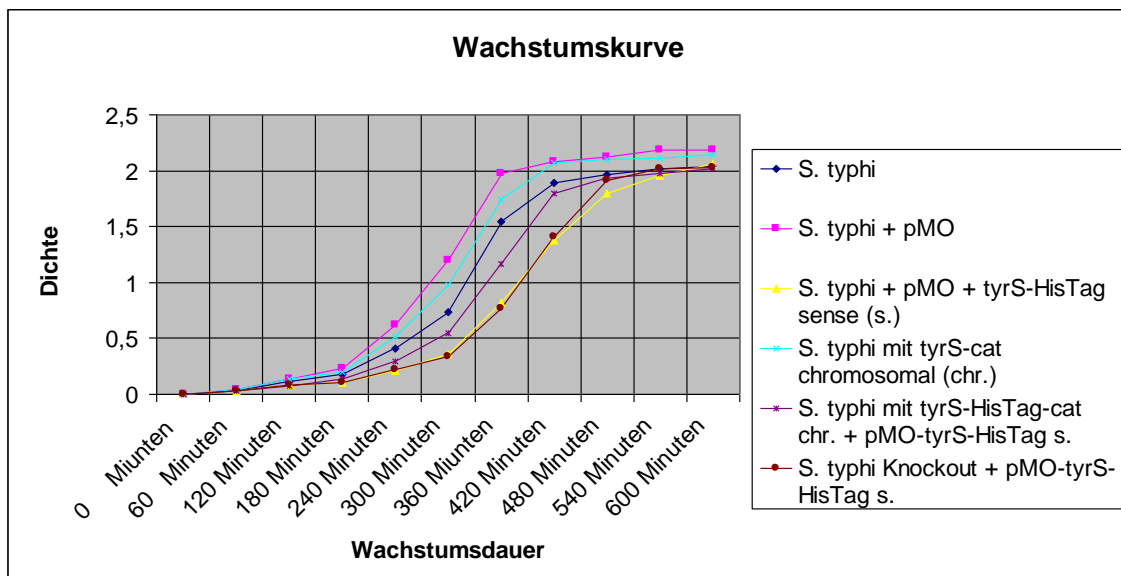
Die Excision der Kanamycinresistenz-Kassette aus dem Plasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag wurde mit den Primern Kan-forward und Kan-reverse überprüft. Die erfolgreiche Deletion des Kanamycinresistenzgens auf dem pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag-Plasmid konnte damit bewiesen werden.

4.6 Charakterisierung des Knockout Stammes

4.6.1 Wachstumskurven von *Salmonella typhi* Ty21a Stämmen

Der Vergleich der verschiedenen *Salmonella* Stämme verdeutlicht, dass die *tyrS*-HisTag Integration in das pMO-PSA-CTX-Plasmid keine Veränderungen im Wachstumsverhalten induziert.

Auch die chromosomale Insertion der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette bzw. der Knockout Stamm zeigen eine vergleichbare Steigung in der log-Phase wie die *Salmonella typhi* Ty21a Wildtyp Bakterien.



4.6.2 Plasmidstabilitätstests

Um die Funktionalität des Balanced lethal Systems nachzuweisen, wurde ein Plasmid-Stabilitätstest nach folgendem Verfahren durchgeführt:

Von einer Übernachtskultur des *Salmonella*-Knockout-Stamms mit ca. 10^8 Bakterien pro ml wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt.

Mit 1 ml der Verdünnungsstufe 10^{-8} wurde erneut eine 48 h Kultur angeimpft. Der Prozess des Verdünnens und Wiederanimpfens wurde fünf Mal wiederholt. Bei ungefähr 18 Bakteriengenerationen pro Übernachtkultur ergeben sich bei fünf Wiederholungen ca. 90 Bakteriengenerationen.

Anschließend wurde die Verdünnungsreihe ausplattiert.

Mittels PCR-Verfahren und den Primern TyrS-EPK-Spel-reverse und pMO-TyrS-screen-forward wurden 120 Bakterienkolonien auf das Vorhandensein des Komplementationsplasmids pMO-PSA-CTX- Δ IS2-tyrS-HisTag überprüft.

Von den 120 getesteten Bakterienkolonien konnte in jeder das Plasmid detektiert werden.

Das *tyrS*-Balanced lethal System zeigt somit *in vitro* eine Plasmidstabilität von 100%.

Die bis zu diesem Zeitpunkt getroffene Annahme, dass das *tyrS*-Gen essentiell ist, kann damit bestätigt werden, da sich anderenfalls keine derart hohe Stabilität des Plasmids ergeben würde.

Weiterhin wurde überprüft, ob sich die Menge an Komplementationsplasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2-tyrS-HisTag im *Salmonella typhi* Ty21a Knockout-Stamm im Verhältnis zur Menge an pMO-PSA-CTX im Salmonella-Ausgangstamm verändert hat.

Es wurde deshalb eine Plasmidisolierung mit dem Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen von beiden Bakterienstämmen äquivalent durchgeführt.

Bei der DNA-Messung konnte kein signifikanter Unterschied an isolierter Plasmid-Menge festgestellt werden.

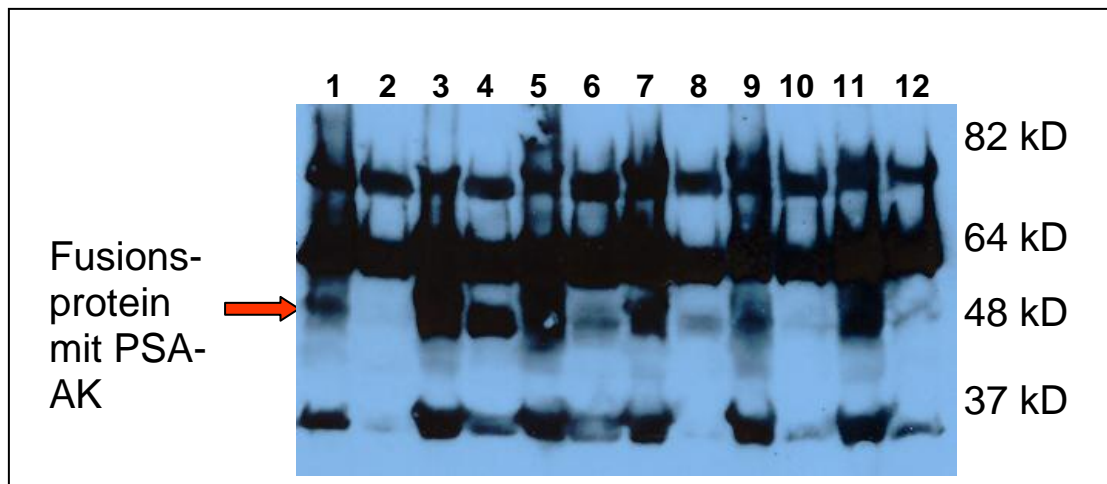
Diese Art der DNA-Messung hat jedoch nur orientierenden Charakter und stellt kein quantitatives Messergebnis dar. Im Rahmen der Arbeiten von Martin Gesser wurden hierzu Real Time PCR Messungen durchgeführt.

4.6.3 Proteinexpressionstests

Mit Hilfe des Western Blot Verfahrens sollte die Auswirkung des chromosomalen Knockouts im *Salmonella typhi* Ty21a Genom auf das Hämolysin- α -Sekretionssystem und die Sekretion des Antigens PSA überprüft werden.

Es wurden Überstände und Zellpellets der unten angegebenen *Salmonella*-Stämme mit den entsprechenden Modifikationen im pMO-Plasmid isoliert. (siehe 3.3.1 und 3.3.2)

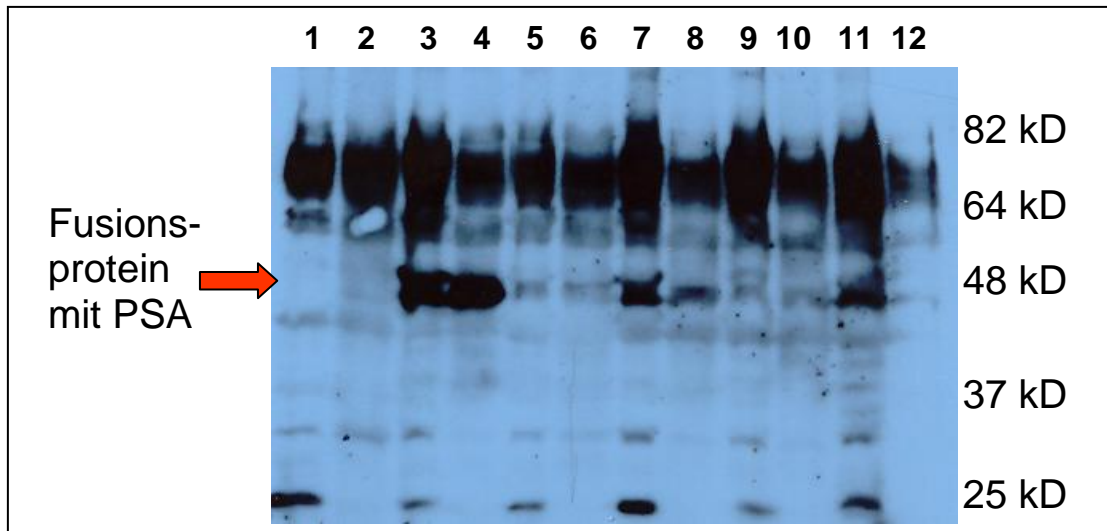
Anschließend wurde mit dem Hämolysin und dem Cholera toxin Antikörpern versucht das Fusionsprotein Hämolysin-PSA-CTX zu detektieren.



(Abbildung: 34; Protein-Gelphoto)

Abb. 34: Western Blot aus Proteinisolationen von *Salmonella typhi* Ty21a-Überstand (siehe 3.3.2) mit Modifikationen im Genom und im Plasmid pMO inkubiert mit Antikörper gegen das Cholera toxin bzw. das Fusionsprotein aus dem Hämolsin-Sekretionsprotein, Cholera toxin und PSA.

- Spur 1: *Salmonella typhi* Ty21a- Zellpellet
- Spur 2: *Salmonella typhi* Ty21a- Überstand
- Spur 3: *Salmonella typhi* Ty21a + pMO-PSA-CTX - Zellpellet
- Spur 4: *Salmonella typhi* Ty21a + pMO-PSA-CTX - Überstand
- Spur 5: *Salmonella typhi* Ty21a + pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag-Zellpellet
- Spur 6: *Salmonella typhi* Ty21a + pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag
- Überstand
- Spur 7: *Salmonella typhi* Ty21a mit *tyrS*-HisTag-*cat* (chromosomal integriert) +
pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag - Zellpellet
- Spur 8: *Salmonella typhi* Ty21a mit *tyrS* HisTag *cat* (chromosomal integriert) +
pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag - Überstand
- Spur 9: *Salmonella typhi* Ty21a Knockout + pMO-PSA-CTX- Δ IS2
Element, ohne Kan-Resistenz-Gen mit *tyrS*-HisTag - Zellpellet in BHI-Medium
- Spur 10: *Salmonella typhi* Ty21a Knockout + pMO-PSA-CTX- Δ IS2
Element, ohne Kan-Resistenz-Gen mit *tyrS*-HisTag - Überstand in
BHI-Medium
- Spur 11: *Salmonella typhi* Ty21a Knockout + pMO-PSA-CTX- Δ IS2
Element, ohne Kan-Resistenz-Gen mit *tyrS*-HisTag - Zellpellet in
LB-Medium
- Spur 12: *Salmonella typhi* Ty21a Knockout + pMO-PSA-CTX- Δ IS2
Element, ohne Kan-Resistenz-Gen mit *tyrS*-HisTag - Überstand
in LB-Medium



(Abbildung: 35; Protein-Gelphoto)

Abb. 35: Western Blot aus Proteinisolationen von *Salmonella typhi* Ty21a-Überstand (siehe 3.3.2) mit Modifikationen im Genom und im Plasmid pMO inkubiert mit Antikörper gegen das Hämolyisin-Sekretionsprotein bzw. das Fusionsprotein aus dem Hämolyisin-Sekretionsprotein, Cholera toxin und PSA.

- Spur 1: *Salmonella typhi* Ty21a- Zellpellet
- Spur 2: *Salmonella typhi* Ty21a- Überstand
- Spur 3: *Salmonella typhi* Ty21a + pMO-PSA-CTX - Zellpellet
- Spur 4: *Salmonella typhi* Ty21a + pMO-PSA-CTX - Überstand
- Spur 5: *Salmonella typhi* Ty21a + pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag-Zellpellet
- Spur 6: *Salmonella typhi* Ty21a + pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag-Überstand
- Spur 7: *Salmonella typhi* Ty21a mit *tyrS*-HisTag-*cat* (chromosomal integriert) + pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag - Zellpellet
- Spur 8: *Salmonella typhi* Ty21a mit *tyrS* HisTag *cat* (chromosomal integriert) + pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag - Überstand
- Spur 9: *Salmonella typhi* Ty21a Knockout + pMO-PSA-CTX- Δ IS2 Element, ohne Kan-Resistenz-Gen mit *tyrS*-HisTag - Zellpellet in BHI- Medium
- Spur 10: *Salmonella typhi* Ty21a Knockout + pMO-PSA-CTX- Δ IS2 Element, ohne Kan-Resistenz-Gen mit *tyrS*-HisTag - Überstand in BHI-Medium
- Spur 11: *Salmonella typhi* Ty21a Knockout + pMO-PSA-CTX- Δ IS2 Element, ohne Kan-Resistenz-Gen mit *tyrS*-HisTag - Zellpellet in LB-Medium
- Spur 12: *Salmonella typhi* Ty21a Knockout + pMO-PSA-CTX- Δ IS2 Element, ohne Kan-Resistenz-Gen mit *tyrS*-HisTag - Überstand in LB-Medium

(Überstand und Zellpellet der Grafiken entstammen einer Bakterienübernachtskultur. Die Isolation bei einer optischen Dichte von 1,0 ergibt ein vergleichbares Bild)

Den beiden Proteingelen ist zu entnehmen, dass die Integration des *tyrS*-HisTag-Komplexes und die Deletion des IS2-like-Elements im pMO-PSA-CTX-Plasmid zu einer signifikanten Verschlechterung der Antigensekretion führen. Während die Positivkontrolle (Spur 3 und 4) auf der Höhe von 48 kD eine stark ausgeprägte Bande anzeigt, ist auf gleicher Höhe bei den *Salmonella typhi*-Ty21a Stämmen mit *tyrS*-HisTag-Integration und IS2-Deletion im pMO-PSA-CTX-Plasmid nur noch eine schwache Bande zu erkennen.

Die Spuren 5,7,9 und 11, bei denen das Bakterienpellet aufgetragen wurde, zeigen, dass das Fusionsprotein Hämolysin-PSA-CTX im Bakterium vorhanden ist und detektiert werden kann.

Im Überstand ist jedoch kaum sezerniertes Antigen nachweisbar.

Der Versuch das Fusionsprotein mit Antikörpern gegen PSA nachzuweisen, ergibt ein ähnliches Bild.

5 Diskussion und Ausblicke

Im Rahmen des Projektes „Bakterielle Tumorthherapie“ werden unter anderem attenuierte Bakterien-Stämme dazu benutzt, tumorspezifische Antigene zu produzieren und zu sezernieren.

Die „Krebs“-Antigene werden dabei im Bakterium sowohl mit dem Adjuvant Cholera toxin (CtxB), als auch mit dem Sekretionssignal von Hämolyysin (HlyA_{signal}) gekoppelt. Das daraus entstehende Fusionsprotein CtxB-Tumorantigen-HlyA_{signal} wird durch das Hämolyysin- α -Sekretionssystem aus *Escherichia coli* erkannt und vom *Salmonella*-Trägerstamm sezerniert.

Die Genkodes des Fusionsproteins CtxB-Tumorantigen-HlyA_{signal} und des Hämolyysin- α -Sekretionssystems sind dabei auf dem Antigen delivery Plasmid pMO (Gentschev *et al.* 1996) lokalisiert. Das Ausgangs pMO-Plasmid verfügt außerdem über eine Kanamycinresistenzkassette, wodurch mit Hilfe von Antibiotikaselektionsdruck das Plasmid im Bakterium stabil gehalten werden kann.

Obwohl der Gebrauch von Antibiotikaresistenzgenen zur Erhöhung der Plasmidstabilität *in vitro* sehr effektiv ist, hat die Anwendung solcher Stabilisierungsmethoden *in vivo* entscheidende Nachteile:

Im Organismus, in den das Bakterium appliziert wird, herrscht kein Antibiotikaselektionsdruck und es können sich Subpopulationen des Vakzinstamms ohne das Antigen delivery Plasmid mit einem Selektionsvorteil entwickeln.

Weiterhin wird wegen der Gefahr der Ausbreitung von Resistenzen der Einsatz von Antibiotikaresistenzkassette in Impfstoffen seitens der Behörden zunehmend restriktiv behandelt.

Außerdem ist die industrielle Fermentation von Bakterienkulturen unter Antibiotikaselektionsdruck äußerst aufwendig und kostenintensiv.

Um die genannten Probleme zu umgehen und eine eventuelle spätere Anwendung im Menschen zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Balanced lethal System entwickelt, das eine Plasmidstabilisierung ohne den Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen erzielt.

In der Literatur sind bereits zahlreiche Methoden beschrieben um den Verlust von Plasmiden in Bakterienkulturen zu verhindern. Einen Überblick bieten die Publikationen von Garmory *et al.* 2005 und Spreng *et al.* 2005.

In den frühen 90er Jahren wurde ein Balanced lethal Plasmid System auf der Basis des Aspartat- β -Semialdehyd-Dehydrogenase-Gens (*asd*-Gen) etabliert. (Curtiss *et al.* 1990)

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

Da das Produkt des *asd*-Gens, die Diaminopimelinsäure, in Tieren nicht vorkommt, trugen 100 % der applizierten Impf-*Salmonellen* nach verschiedenen Zeitintervallen das Komplementationsplasmid. (Srinivasan *et al.* 1995) (Kang *et al.* 2002; Wyszynska *et al.* 2004)

In klinischen Studien wurden *asd*-stabilisierte *Salmonella* Stämme als Träger von Hepatitis B Antigenen auch im Menschen angewandt.

Freiwilligen Versuchspersonen wurden verschiedene Dosen an Impf-*Salmonellen* verabreicht. Es konnte jedoch keine detektierbare humorale Immunantwort stimuliert werden. Als Ursachen werden die mangelnde Antigenexpression *in vivo*, und ein zu schneller Antigenabbau diskutiert. (Tacket *et al.* 1997; Spreng *et al.* 2005; Nardelli-Haeffliger *et al.* 1996)

Bei den Arbeiten mit den *asd*-stabilisierte *Salmonella* Stämme viel weiterhin auf, dass das Komplementationsprodukt der Komplementationskassette auf dem zu stabilisierenden Plasmid wenn es im Übermaß produziert wird zu einem Verlust des Plasmids führt.

Es reicht im Grunde ein Plasmid mit dem essentiellen Gen aus, um den chromosomalen Knockout zu komplementieren. Es erscheint logisch, dass Bakterien mit einer größeren Anzahl an Plasmiden, die alle Träger des essentiellen Gens sind, einige dieser Plasmide verlieren.

Besonders wenn auf den high-copy Plasmiden Gene kodiert sind, die für das Bakterium einen Selektionsnachteil beinhalten. (Galan *et al.* 1990)

Kang *et al.*, zeigte, dass die Integration des *asd*-Gens in ein multi-copy Plasmid zu einer 200 bis 300 fachen Überproduktion von Aspartat- β -Semialdehyd-Dehydrogenase führt; als es zur Komplementierung des chromosomalen Knockouts nötig wäre.

Die Deletion von Teilen der *asd*-Promotorregion auf den Komplementationsplasmiden führte zu einer geringeren Produktion der Aspartat- β -Semialdehyd-Dehydrogenase und gleichzeitig zu einer Steigerung der Immunogenität der Impf-*Salmonellen*. Auch die auf Plasmiden lokalisierten Gene, toxisch wirkender Proteine, können mit diesem System stabilisiert werden. (Kang *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 *et al.* 2005)

Außerdem muss sichergestellt sein, dass das Stoffwechselprodukt, dessen Genkodes 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* essentiell. Bei der Applikation im Mausmodell konnten jedoch Bakterien überleben, die das Komplementationsplasmid nicht tragen.

Dies beweist, dass die Aminosäure Glutamin im Darmtrakt der Versuchstiere in ausreichendem Maß zur Verfügung steht, um die chromosomale Deletion des *gln*-Gens zu ersetzen. (Ryan *et al.* 2000)

Damit die Plasmidstabilität auch *in vivo* gegeben ist, muss sichergestellt sein, dass die applizierten Impf-Stämme nicht in der Lage sind das Produkt des deletierten Gens aus der Umgebung aufzunehmen. Das Balanced lethal System verliert sonst die Fähigkeit das Auftreten von Vakzin-Bakterien ohne antigenträgendes Plasmid zu verhindern.

Eine Möglichkeit die Aufnahme des Stoffwechselproduktes des deletierten Gens aus der Umgebung des Bakteriums zu minimieren, ist die Etablierung von Balanced lethal Systemen auf der Basis von Genen, die für essentielle Enzyme der Proteinbiosynthese kodieren.

Bereits 2003 wurde durch Pilgrim *et al.* ein Plasmid-Stabilisierungssystem etabliert, das sich auf ein essentielles Gen eines Enzyms der Proteinbiosynthese stützt. (Pilgrim *et al.* 2003)

Pilgrim deletierte das *trpS*-Gen, das die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase kodiert, aus dem Chromosom von *Listeria monocytogenes* und komplementierte es auf einem DNA-delivery Plasmid. Das Balanced lethal System konnte das Komplementationsplasmid sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stabilisieren. (Pilgrim *et al.* 2003)

Für die Erhöhung der Plasmidstabilität in *Salmonella*-Stämmen ist die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase jedoch ungeeignet, da das *trpS*-Gen mehrfach auf dem Bakterienchromosom vorhanden ist. (Deng *et al.* 2003)

Für die Etablierung eines Balanced lethal Systems müsste das Gen deshalb mehrfach aus dem Chromosom entfernt werden.

Im Rahmen dieser medizinischen Dissertation wurde ein Balanced lethal System konstruiert, um das Antigen-delivery Plasmid pMO im *Salmonella typhi* Ty21a Stamm *in vitro* und *in vivo* ohne den Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen zu stabilisieren.

Die Basis dieses Systems bilden der chromosomale Knockout des vermutlich essentiellen *tyrS*-Gens (Gerdes *et al.* 2003) und die gleichzeitige Komplementation dieses Gens auf dem pMO-Plasmid mit dem Hämolyisin- α -Sekretionssystem und dem tumorspezifischen Antigen.

Der Salmonella-Stamm gerät dadurch in eine obligate Abhängigkeit von dem Stoffwechselprodukt des *tyrS*-Gens auf dem jeweiligen pMO-Plasmid.

Bei *in vivo* Applikation sollte es im Wirtsorganismus deshalb nur *Salmonella*-Bakterien geben, die das tumorspezifische Antigen exprimieren, oder aufgrund des Plasmidverlustes abgestorben sind. In der Theorie könnte sich im Organismus keine Subpopulation von Impfbakterien entwickeln, die das antigentragende pMO-Plasmid nicht beinhaltet. Dies gilt es im Rahmen der Weiterentwicklung des Projektes *in vivo* zu beweisen.

Das *tyrS*-Gen kodiert für die Tyrosyl-tRNA-Synthetase. Dieses Enzym katalysiert in zwei Schritten die Verbindung der Aminosäure Tyrosin mit der korrespondierenden tRNA. Für die Benutzung des *tyrS*-Gens als Basis des Balanced lethal Systems sprachen dabei mehrere Gründe:

Um zu garantieren, dass keine Bakterien ohne das Plasmid überleben können, muss das chromosomal deletierte Gen essentiell sein.

Aufgrund der Ähnlichkeit von *E. coli* und *Salmonella* Stämmen wurde angenommen, dass das *tyrS*-Genprodukt in *Salmonella*-Bakterien eine ebenso essentielle Rolle bei der Proteinbiosynthese spielt wie das für *E. coli*-Bakterien der Fall ist. Hierfür konnte der essentielle Charakter bereits bewiesen werden.

(Gerdes *et al.* 2003)

Außerdem gelten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in Bakterien generell als essentiell. (Gerdes *et al.* 2003)

Weiterhin sollte das essentielle Gen einfach aus dem Genom zu deletieren sein und nur in einer Kopie im Chromosom vorliegen.

Für das Tyrosyl-tRNA-Synthetase-Gen trifft das zu. Es ist im sequenzierten *Salmonella typhi* Genom nur einmal beschrieben. (Deng *et al.* 2003)

Hier liegt der Vorteil des *tyrS*-Gens gegenüber dem *trpS*-Gen, das im *Salmonella* Genom doppelt vorkommt.

Das *tyrS*-Gen besitzt weiterhin den Vorteil, dass das Genprodukt aus einem Homodimer zusammengesetzt ist. (Woese et al. 2000)

Bestünde das Enzym aus verschiedenen Aminosäuresequenzen, ist die Gefahr gegeben, dass die Deletion eines kodierenden Gens zur Überexpression eines nicht deletierten Gens führt, dessen Genprodukt an der Bildung des Enzyms beteiligt ist.

Die Beeinträchtigung des Bakterien-Stoffwechsels durch das noch vorhandene, überexprimierte Gen, könnte die Folge sein. (Jakes et al. 1975; Janson et al. 2000)

Andere Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind häufig aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt. (Woese et al. 2000; O'Donoghue et al. 2003)

Da der *Salmonella typhi* Ty21a Impfstamm mit dem Balanced lethal System später im Menschen Anwendung finden soll, muss sicher gestellt sein, dass das humane *tyrS*-Genprodukt nicht das bakterielle Enzym ersetzen kann, falls das pMO Antigendelivery Plasmid verloren geht. Das Balanced lethal System würde sonst umgangen und seine Wirkung verlieren.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die humane Tyrosyl-tRNA-Synthetase aufgrund der spezie-spezifischen Erkennung die Aufgabe des prokaryontischen Enzyms nicht übernehmen kann. Dies ist bei anderen Enzymen der Proteinbiosynthese nicht bewiesen.

(Wakasugi et al. 1998; Hamano-Takaku et al. 2000)

Weiterhin gibt es in der Literatur keinen Anhaltspunkt, dass das *tyrS*-Gen in die Steuerung der Expression anderer Gene involviert ist. Diese Tatsache ist von großer Bedeutung, um das *tyrS*-Gen ohne Folgen für die Wachstumseigenschaften des *Salmonella*-Stammes deletieren zu können.

Das *tyrS*-Stabilisierungssystem kann auch auf andere *Salmonella*-Stämme übertragen werden. Dies kann sich in der Zukunft als sehr effektiv erweisen, da das *tyrS*-Balanced lethal System neben dem Gebrauch

bei *Salmonella typhi* Ty21a auch in *Salmonella typhimurium* SL7207 aroA; TAD *Salmonella vac*[®]T; TAD *Salmonella vac*[®]E sowie in *Salmonella enteritidis* Anwendung finden soll.

Nicht zuletzt liegt der Vorteil der Verwendung des *tyrS*-Gens in der Tatsache, dass bisher kein Balanced lethal System auf der Basis dieses Gens beschrieben ist. Da der *Salmonella*-Impfstamm wahrscheinlich später kommerziell genutzt werden wird, sollten die verwendeten Systeme nicht bereits patentrechtlich geschützt sein.

Die Integration der HisTag-Region in das *tyrS*-Gen hat sich als sehr sinnvoll erwiesen. Einerseits wurde die biologische Funktionalität der Tyrosyl-tRNA-Synthetase nicht aufgehoben, zum anderen bietet diese Sequenz die Möglichkeit die Expression des *tyrS*-Gens auf dem Komplementationsplasmid zu überprüfen.

Da die Genprodukte des *Salmonella* und *E. coli tyrS*-Gens zu 96 % identisch sind und die flankierenden Gene zueinander homolog sind, wurde die *tyrS*-Expressionskassette des *E. coli* Genoms dazu benutzt, die *tyrS*-Deletion auf dem *Salmonella* Genom im pMO-Plasmid zu komplementieren.

Die Herkunft des *tyrS*-Gens aus dem *E. coli* Genom soll zusätzlich die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Rekombination der *tyrS*-Kassette auf dem Komplementationsplasmid mit dem *Salmonella* Genom senken.

Weiterhin ist das *tyrS*-Gen von *E. coli*-Bakterien, inklusive seiner flankierenden Bereiche auf dem Genom, in der Literatur sehr genau beschrieben.

Über die Promotor Struktur und die Regulation der Expression und Termination des *tyrS*-Komplexes existieren bereits mehrere Veröffentlichungen. (siehe 1.2.3.2.2)

Das *tyrS*-Gen wurde auf Plasmide kloniert und die biologische Aktivität nachgewiesen. (Lam *et al.* 1992; Yang *et al.* 1998)

Bedouelle *et al.* untersuchte den Einfluss der Expression des rekombinanten *E. coli tyrS*-Gens auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* Stämmen.

(Bedouelle *et al.* 1990) (Kiga *et al.* 2002)

Das *tyrS*-Gen wurde auf Plasmide mit differierenden Kopienzahlen und unter der Kontrolle verschiedener Promotoren kloniert. Die Arbeitsgruppe um Bedouelle konnte darstellen, dass sich eine Überproduktion des *tyrS*-Gens toxisch auf die Bakterien auswirkt. Dies zeigte sich in einer Abnahme der Wachstumsraten und in der negativen Auswirkung auf die Proteinexpression im Allgemeinen.

Der Ersatz des Wildtyp Promotors durch einen stärkeren Promotor, sowie der Gebrauch eines Plasmids mit einer höheren Kopienzahl, führten zu den beschriebenen toxischen Effekten.

Um diese negativen Auswirkungen zu umgehen, wurde im Rahmen dieses Projekts zunächst der vermutlich autoregulativ wirkende Wildtyp *tyrS*-Promotor (Bedouelle *et al.* 1990) für die Komplementation des chromosomalen *Salmonella*-Knockouts benutzt.

Wachstumsstudien mit dem *E. coli tyrS*-komplementierten *Salmonella* Knockoutstamm scheinen diese Überlegungen zu bestätigen, da der Knockoutstamm im Wachstumsverhalten nicht gegen den Wildtypstamm zurückfiel.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die autoregulative Komponente der *tyrS*-Expressionskassette auf dem pMO-Plasmid die Überproduktion der Tyrosyl-tRNA-Synthetase verhindert. Da das pMO-Plasmid in vielfacher Kopie im *Salmonella typhi* Ty21a Knockout-Stamm vorkommt, käme es bei konstanter Expression des *tyrS*-Gens zu einer toxischen Überproduktion (Bedouelle *et al.* 1990) des Enzyms.

Ein weiteres Erklärungsmodell für die konstanten Wachstumseigenschaften des Knockout-Stammes ist die Reduktion der Anzahl der pMO-Antigendelivery Plasmide im Bakterium.

Um dies zu überprüfen werden im Rahmen der Weiterentwicklung des Projektes von Martin Gesser Real Time-PCR Versuche durchgeführt.

Für die Konstruktion des chromosomalen *tyrS*-Knockoutstamms wurde das Verfahren von Datsenko und Wanner (2000) „One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products“ modifiziert. Da die Tyrosyl-tRNA-Synthetase höchst wahrscheinlich in *Salmonella* Stämmen essentiell ist (Gerdes *et al.* 2003) und nicht durch Zugabe zum Wachstumsmedium ersetzt werden kann, wäre ein *tyrS*-Gen Knockout nach dem Datsenko und Wanner Prinzip für die Bakterien tödlich. Es mussten durch uns deshalb folgende Veränderungen des Verfahrens vorgenommen werden:

Das chromosomale *tyrS*-Gen konnte nicht einfach durch eine Antibiotikaresistenzkassette ersetzt werden. Im Rahmen der Etablierung einer modifizierten Methode wurde durch uns das *tyrS*-Gen zunächst gegen einen Komplex aus Antibiotikaresistenzgen (Chloramphenicolresistenz) und eine *E.coli tyrS*-HisTag-Expressionskassette ausgetauscht.

Außerdem sollte der *Salmonella*-Vakzinstamm schlussendlich über keine Antibiotikaresistenzgene mehr verfügen. Deshalb musste in einem Schritt nicht nur der chromosomale *tyrS*-HisTag-*cat*-Komplex, sondern auch das Kanamycinresistenzgen auf dem pMO-Plasmid deletiert werden.

Da die beiden zu deletierenden Regionen in unseren Vorarbeiten zwischen FRT-Sites positioniert worden waren, konnte die Flipase beide Antibiotikaresistenzmarker und den chromosomale *tyrS*-HisTag-Komplex gleichzeitig entfernen. Um diesen Schritt erfolgreich durchzuführen, war zunächst die Etablierung des Shiftens unter doppeltem Antibiotikadruck (siehe 4.5.3) nötig.

Mit Hilfe des hier entwickelten Verfahrens konnte dann die zweifache Deletion (auf *Salmonella* Genom und im pMO-Plasmid) mit einer Effizienz von 100 % durchgeführt werden.

Nur mit den beschriebenen Modifikationen konnte die Erstellung des *tyrS*-Balanced lethal Systems realisiert werden.

Zusätzlich bietet das abgeänderte Verfahren die Möglichkeit den *Salmonella typhi* Ty21a Stamm mit dem integrierten *tyrS*-HisTag-*cat*-Komplex unter Antibiotika-Selektionsdruck anzuzüchten. Das Risiko von Kontaminationen wird dadurch gemindert.

Ausgehend von dem *Salmonella typhi* Ty21a Stamm mit der chromosomalen Integration, als Zwischenstufe, kann jedes beliebige Plasmid stabilisiert werden, wenn es eine *E. coli tyrS*-Expressionskassette trägt.

Zudem können andere tumorspezifische Antigene wie z.B. B-Raf problemlos in das Komplementationsplasmid pMO-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag integriert werden. Die Übertragung des *tyrS*-Balanced lethal Systems für verschiedenste Antigendelivery Plasmide erscheint weiterhin leicht möglich.

Da die Zwischenstufe (*Salmonella typhi* Ty21a Stamm mit der chromosomalen Integration) unter strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften hergestellt wurde, können daraus abgeleitete Balanced lethal Systeme unter GMP-Bedingungen bzw. unter Bedingungen der strengen Dokumentations- und Arbeitsvorschriften entwickelt werden und Anwendung als Testimpfstoffe finden. Auch eine Etablierung des Balanced lethal Systems für andere *Salmonella* Impfstämme scheint mit dem entwickelten Verfahren leicht durchführbar.

In den durchgeführten Tests erwies sich das *tyrS*-Balanced lethal System mit dem Komplementationsplasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2- Δ Kan^R-*tyrS*-HisTag *in vitro* als 100 % stabil.

Es wurde in *E. coli* demonstriert, dass die Integration der *tyrS*-HisTag-Kassette und die Deletion des IS2-like-Elements auf dem pMO-Plasmid das Hämolysin- α -Sekretionssystem nicht behindert und das tumorspezifische Antigen PSA weiterhin gebildet und sezerniert wird. Diese Feststellung gilt sowohl für das *tyrS* als auch für das modifizierte *tyrS*-HisTag-Fragment, welches benötigt wurde, um die Expression des *tyrS*-Gens auf dem pMO-Plasmid nachzuweisen.

Aus den Proteingelen kann geschlossen werden, dass die Deletion des IS2-like-Elements zu einer Verschlechterung der Antigenproduktion und Sekretion in *E. coli* führt. Durch die Integration des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Komplexes in Leserichtung des Plasmids kann die Abnahme der Antigen-delivery Leistung jedoch kompensiert werden. Der Abstand der *hlyR* und *hlyC*-Komponente auf dem pMO-Plasmid scheint wie durch Vogel *et al.* bereits gezeigt eine entscheidende Rolle für die Funktionalität des Hämolyisin- α -Sekretionssystems zu spielen. (Vogel *et al.* 1988)

Der Verlust der Basenpaare durch die Deletion des IS2-like-Elements wird durch die Integration des *tyrS* bzw. *tyrS*-HisTag-Komplexes kompensiert. In *E. coli* ergibt sich insgesamt keine Verschlechterung der Antigensekretion durch die IS2-like-Deletion und *tyrS/tyrS*-HisTag Integration in das pMO-Plasmid.

Den angefertigten Wachstumskurven ist zu entnehmen, dass die zusätzliche *tyrS*-Kassette auf dem pMO-Plasmid keinen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der *E. coli* bzw. *Salmonella typhi* Ty21a Stämme hat. Außerdem konnte demonstriert werden, dass der *tyrS*-Knockout im *Salmonella typhi* Ty21a Bakterium zu keinem Wachstumsnachteil führt und die chromosomale *tyrS*-Deletion durch das Komplementationsplasmid pMO ausgeglichen werden kann.

Alle Modifikationen im Antigen-delivery Plasmid pMO wurden in *E. coli* getestet. Hierbei ergab sich keine Verschlechterung der Antigensekretionsleistung.

Bei der Transformation des Plasmids pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag in den *Salmonella typhi* Ty21a Stamm bzw. den Knockout-Stamm ist sowohl die Antigenproduktion, als auch die Sekretion durch das Hämolyisin- α -Sekretionssystem massiv beeinträchtigt.

Trotz der Ähnlichkeit von *Salmonella*- und *E. coli*-Stämmen führen die Modifikationen im pMO-Plasmid zu einer ganz unterschiedlichen Auswirkung bzgl. der Antigensekretion.

Es gibt mehrere mögliche Ursachen für die insuffiziente Sekretion des Antigens PSA durch den *Salmonella typhi* Ty21a Stamm:

Das IS2-like-Element auf dem pMO-Plasmid könnte möglicherweise für die Steuerung des Hämolyisin- α -Sekretionssystems in *Salmonella typhi* eine entscheidende Rolle spielen. In *E. coli* war dies jedoch nicht der Fall.

Es muss nun das pMO-Plasmid mit dem IS2-like-Element und der *tyrS*-HisTag-Kassette auf die Funktionalität des Sekretionssystems hin überprüft werden.

Durch die Integration des *tyrS*-HisTag-Komplexes an der *SpeI*-Site- Δ IS2-Deletion käme es jedoch zu einer Verlängerung des Abstandes zwischen dem *hlyR*- und dem *hlyC*-Element des Sekretionssystems.

Es sollte deshalb versucht werden, die *tyrS*-HisTag-Kassette mit Hilfe einer *Sall*-Schnittstelle an einer anderen Integrationsite in das pMO-Plasmid zu integrieren. Das *tyrS*-Gen wäre damit örtlich völlig unabhängig vom Hämolyisin- α -Sekretionssystem. Auf die Deletion des IS2-like-Elements muss dann jedoch verzichtet werden, da anderenfalls das *hlyR*- und das *hlyC*-Element direkt nebeneinander zu liegen kämen.

Des Weiteren kann die geringe Antigensekretion auch in einem Mangel des Komplementationsplasmids pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag begründet liegen. Wie oben bereits erwähnt, reicht ein Komplementationsplasmid mit funktionalem *tyrS*-Komplex aus, um den chromosomalen *tyrS*-Knockout zu komplementieren.

Möglicherweise ist die Anzahl an Komplementationsplasmiden pro *Salmonella* - Bakterium zu gering, um eine effiziente Produktion und Sekretion von Antigenen zu gewährleisten.

Um darüber statistische Aussagen treffen zu können, müssen Real Time-PCRs mit dem Knockout-Stamm durchgeführt werden.

Sollten tatsächlich nur sehr wenige Komplementationsplasmide pro Bakterium vorhanden sein, muss der Wildtyp Promotor des *tyrS*-Komplexes durch einen sehr schwachen Promotor ersetzt werden. Ziel wäre es dabei, die nötige Anzahl

an Plasmiden zu erhöhen, die gebraucht wird, um eine Komplementation der chromosomalen *tyrS*-Deletion zu gewährleisten.

Auffällig ist zudem die Tatsache, dass die Antigensekretion in *Escherichia coli* durch die Modifikationen im pMO-Plasmid nicht beeinflusst wird, wohingegen in *Salmonella typhi* Ty21a kaum noch sezerniertes Antigen detektiert werden kann. Bei der Suche nach Unterschieden bzgl. der Antigensekretion zwischen *E. coli* und *Salmonella typhi* Ty21a fällt die Deletion des Sigma-Faktors *rpoS* bei dem verwendeten *Salmonella* Stamm auf. Das *rpoS*-Gen, das für einen RNA-Polymerase Sigma Faktor kodiert, reguliert die Proteinsekretion in Bakterienstämmen. (Flores *et al.* 2007)

In dem Vakzinestamm *Salmonella typhi* Ty21a ist dieser Regulationsfaktor nicht funktionsfähig. Robbe-Saule *et al.* konnte zeigen, dass die Reintegration des *rpoS*-Gens zu einer Zunahme der Virulenz und Resistenz des *Salmonella typhi* Ty21a Stammes führt. (Robbe-Saule *et al.* 1995; Robbe-Saule *et al.* 1999; Oscarsson *et al.* 2002)

In den *Escherichia coli* Bakterien, in denen das Antigenelivery Plasmid pMO getestet wurde, ist das regulierende *rpoS*-Gen nicht inaktiviert.

Die Vermutung liegt nahe, dass die fehlende Funktionalität des *rpoS*-Gen in *Salmonella typhi* Ty21a für die insuffiziente Antigensekretion durch das pMO-Plasmid verantwortlich ist.

Es muss nun getestet werden, ob das Plasmid pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag im *Salmonella typhi* Ty21a-Stamm zu einer höheren Antigensekretionsrate führt, wenn in die *Salmonella*-Bakterien zusätzlich ein *rpoS*-Gen integriert wird.

Außerdem besteht die Möglichkeit den *E. coli tyrS*-Wildtyp Promotor durch einen *rpoS* unabhängigen, bzw. einen sehr schwachen Promotor wie z.B. Lac I., zu ersetzen.

Da die *tyrS*-HisTag-Expressionskassette auf dem pMO-PSA-CTX- Δ IS2-*tyrS*-HisTag-Plasmid zwischen dem Hämolyisin- α -Sekretionssystem integriert wurde, könnte dies zu einer Steigerung der Anzahl der Expressionsmolekülen, des Sekretionssystems führen.

Die von Martin Gesser weitergeführten Arbeiten zeigen zum Thema der Steigerung der Antigensekretionsleistung des Vakzinstammes viel versprechende Lösungsansätze.

Sobald das Hämolyisin- α -Sekretionssystem optimal funktionsfähig ist, sollte ein *in vivo* Experiment durchgeführt werden, bei dem die Immunogenität des Impfstammes mit *tyrS*-Balanced lethal Stabilisierungssystem gegen einen Bakterienimpfstamm ohne Plasmidstabilisierung getestet wird.

Ein *in vivo* Experiment ermöglicht auch die Stabilität des Antigendelivery Plasmids pMO im Wirtsorganismus zu überprüfen.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass es im Rahmen dieser medizinischen Dissertation gelungen ist, ein auf das essentielle *tyrS*-Gen basierendes Balanced lethal System zu erstellen. *In vitro* konnte bereits eine Plasmidstabilität von 100 % gezeigt werden. Es laufen momentan Studien und Vorbereitungen um die Plasmidstabilität auch *in vivo* nachzuweisen. Dieses multifunktional einsetzbare System bietet die Möglichkeit auf den Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen zur Plasmidstabilisierung zu verzichten.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeitsgruppe „Bakterielle Tumorthherapie“ ist unter anderem die Entwicklung von Vakzinen gegen maligne Neoplasien auf der Basis von attenuierten Bakterien.

Sie dienen hierbei als Träger von tumorspezifischen Antigenen.

Diese können mit Hilfe des *E. coli* Hämolysin- α -Sekretionssystems von *Salmonella*-Bakterienstämmen sezerniert werden und eine spezifische Immunreaktion induzieren. Sowohl die Gene, die für das Sekretionssystem kodieren als auch die Gensequenzen des tumorspezifische Antigens sind bei dem Projekt auf dem detailliert beschriebenen Antigenelivery Plasmid pMO kodiert. (siehe 1.2.2.2)(Gentshev *et al.* 2002) (Gentshev *et al.* 2005)

Die bis dato angewandte Methode der pMO-Plasmidstabilisierung mit Hilfe von Antibiotikaresistenzgenen beinhaltet jedoch zahlreiche, beschriebene Probleme und wird seitens der Behörden in Impfstämmen zunehmend restriktiv gehandhabt.

Im Rahmen der Entwicklung eines bakteriellen Tumorigenimpfstoffes war es daher das Ziel dieser Arbeit ein System zur Stabilisierung des Antigenelivery Plasmids pMO zu etablieren, das auf den Einsatz von Antibiotikaresistenzgenen verzichtet. Um eine maximale Stabilität des pMO-Plasmids zu erreichen, wurde durch uns ein Konzept zur Entwicklung eines Balanced lethal Systems erstellt, das auf der chromosomale Deletion, bei gleichzeitiger Komplementation in trans eines vermutlich essentiellen Gens der Proteinbiosynthese, basiert.

Die Auswahl des Gens, das aus dem *Salmonella typhi* Ty21a Genom deletiert und auf dem Antigenelivery Plasmid pMO komplementiert wurde, fiel dabei auf das in *E. coli* vorhandene, essentielle *tyrS*-Gen (Gerdes *et al.* 2003), das für die Bildung der Tyrosyl-tRNA-Synthetase verantwortlich ist. Aufgrund der Ähnlichkeit der *E. coli* und *Salmonella*-Stämme wurde angenommen, dass das *tyrS*-Gen auch in *Salmonella typhi* Ty21a überlebenswichtig ist. Die Vorzüge dieses Gens, sowie die Festlegung der Größe und Herkunft der Komplementationskassette auf dem pMO-Plasmid wurden diskutiert. (siehe 5.)

Bei der Realisierung des Projektes wurde in Grundzügen auf das von Datsenko und Wanner beschriebene Verfahren „One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12“ (Datsenko *et al.* 2000) zurückgegriffen. Es waren jedoch umfangreichen Modifizierungen und Erweiterungen des beschriebenen Verfahrens nötig, um gleichzeitig ein essentielles Gen chromosomal zu deletieren und auf einem Plasmid zu komplementieren.

Ebenso wurden aufwendige Klonierungsarbeiten durchgeführt um in einem finalen Schritt alle drei verwendeten Antibiotikaresistenzgene aus dem System zu entfernen. (siehe 4.)

Nach Etablierung des Verfahrens des Shiftens unter doppeltem Antibiotikaselektionsdruck konnte die chromosomale Deletion der *tyrS*-HisTag-*cat*-Kassette sowie die zeitgleiche Excision des Kanamycinresistenzgens aus dem pMO-Plasmid durchgeführt werden. Auf diesem Weg wurde das *tyrS*-basierende Balanced lethal System in *Salmonella typhi* Ty21a erfolgreich erstellt.

Da der Vakzinstamm später im Menschen Anwendung finden soll, wurden die genetischen Modifikationen am *Salmonella typhi* Ty21a-Genom unter strengen Dokumentations- und Arbeitsbedingungen durchgeführt. (siehe 3.4)

Da das *tyrS*-Gen höchst wahrscheinlich eine essentielle Komponente des Aminosäurestoffwechsels in *Salmonella typhi* Ty21a liefert (Gerdes *et al.* 2003), befindet sich der *Salmonella typhi* Knockoutstamm in obligater Abhängigkeit von dem Antigenelivery Plasmid pMO mit der *tyrS*-Komplementationskassette. Wie die Wachstumskurven und Plasmidstabilitätstests zeigen, kann der chromosomale Knockout erfolgreich komplementiert werden.

Ebenfalls konnte bereits eine 100 % Plasmidstabilität des pMO-Plasmids *in vitro* bewiesen werden. *In vivo* Studien befinden sich derzeit in Planung bzw. Vorbereitung.

Das im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Verfahren zur Stabilisierung des Antigenelivery Plasmids pMO in *Salmonella typhi* Ty21a ist jedoch nicht auf diesen Bakterienstamm beschränkt.

Die entwickelte Methode kann analog verwendet werden, um Plasmide in zahlreichen anderen Bakterienstämmen zu stabilisieren.

Es besteht nun weiterhin die Aufgabe das Balanced lethal System zu optimieren, das System für andere Bakterienstämme wie z.B. *Salmonella typhimurium* SL7207 aroA, TAD *Salmonella vac*^{®T}, TAD *Salmonella vac*^{®E} und *Salmonella enteritidis* zu adaptieren und entsprechende *in vivo* Versuchsreihen durchzuführen.

7. Literatur-, Buch- und Bildnachweis

- Baba, T., T. Ara, et al. (2006). "Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bedouelle, H., V. Guez, et al. (1990). "Overproduction of tyrosyl-tRNA synthetase is toxic to Escherichia coli: a genetic analysis." J Bacteriol **172**(7): 3940-5.
- Belas, R., A. Mileham, et al. (1982). "Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from Vibrio harveyi." Science **218**(4574): 791-3.
- Bermudes, D., L. M. Zheng, et al. (2002). "Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors." Curr Opin Drug Discov Devel **5**(2): 194-9.
- Biassoni, R., C. Cantoni, et al. (2000). "Human natural killer cell activating receptors." Mol Immunol **37**(17): 1015-24.
- Biassoni, R., C. Cantoni, et al. (2001). "Human natural killer cell receptors and co-receptors." Immunol Rev **181**: 203-14.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Boon, T., J. C. Cerottini, et al. (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." Annu Rev Immunol **12**: 337-65.
- Boon, T., P. Coulie, et al. (1994). "Genes coding for tumor rejection antigens: perspectives for specific immunotherapy." Important Adv Oncol: 53-69.
- Bronte, V., M. W. Carroll, et al. (1997). "Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3183-8.
- Castelli, C., L. Rivoltini, et al. (2000). "T-cell recognition of melanoma-associated antigens." J Cell Physiol **182**(3): 323-31.
- Chabalgoity, J. A., G. Dougan, et al. (2002). "Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer." Expert Rev Vaccines **1**(4): 495-505.
- Chabalgoity, J. A., B. Villareal-Ramos, et al. (1995). "Influence of preimmunization with tetanus toxoid on immune responses to tetanus toxin fragment C-guest antigen fusions in a Salmonella vaccine carrier." Infect Immun **63**(7): 2564-9.
- Chakrabarty, A. M. (2003). "Microorganisms and cancer: quest for a therapy." J Bacteriol **185**(9): 2683-6.
- Chatfield, S., M. Roberts, et al. (1994). "The use of live attenuated Salmonella for oral vaccination." Dev Biol Stand **82**: 35-42.
- Chatfield, S., M. Roberts, et al. (1993). "The development of oral vaccines based on live attenuated Salmonella strains." FEMS Immunol Med Microbiol **7**(1): 1-7.
- Chatfield, S. N., N. Fairweather, et al. (1992). "Construction of a genetically defined Salmonella typhi Ty2 aroA, aroC mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine." Vaccine **10**(1): 53-60.

- Cherepanov, P. P. and W. Wackernagel (1995). "Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant." Gene **158**(1): 9-14.
- Collins, F. M. (1974). "Vaccines and cell-mediated immunity." Bacteriol Rev **38**(4): 371-402.
- Coulie, P., P. Weynants, et al. (1993). "Genes coding for antigens recognized on human tumors by autologous cytolytic T lymphocytes." Ann N Y Acad Sci **690**: 113-9.
- Coulie, P. G., V. Brichard, et al. (1994). "A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." J Exp Med **180**(1): 35-42.
- Covone, M. G., M. Brocchi, et al. (1998). "Levels of expression and immunogenicity of attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium strains expressing Escherichia coli mutant heat-labile enterotoxin." Infect Immun **66**(1): 224-31.
- Cunningham, C. and J. Nemunaitis (2001). "A phase I trial of genetically modified Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. Protocol no: CL-017. Version: April 9, 2001." Hum Gene Ther **12**(12): 1594-6.
- Curtiss, R., 3rd (2002). "Bacterial infectious disease control by vaccine development." J Clin Invest **110**(8): 1061-6.
- Curtiss, R., 3rd, J. E. Galan, et al. (1990). "Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo." Res Microbiol **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." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-5.
- Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-54.
- Deng, W., S. R. Liou, et al. (2003). "Comparative genomics of Salmonella enterica serovar Typhi strains Ty2 and CT18." J Bacteriol **185**(7): 2330-7.
- De Plaen, E., C. Lurquin, et al. (1997). "Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes." Methods **12**(2): 125-42.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, et al. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-37.
- Di Salvo, M., E. Yang, et al. (1998). "Expression, purification, and characterization of recombinant Escherichia coli pyridoxine 5'-phosphate oxidase." Protein Expr Purif **13**(3): 349-56.
- Dietrich, G., A. Kolb-Maurer, et al. (2001). "Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines." Vaccine **19**(17-19): 2506-12.
- Dobereiner, A., A. Schmid, et al. (1996). "The effects of calcium and other polyvalent cations on channel formation by Escherichia coli alpha-hemolysin in red blood cells and lipid bilayer membranes." Eur J Biochem **240**(2): 454-60.

- Doggett, T. A., E. K. Jagusztyn-Krynicka, et al. (1993). "Immune responses to Streptococcus sobrinus surface protein antigen A expressed by recombinant Salmonella typhimurium." Infect Immun **61**(5): 1859-66.
- Dougan, G., S. Chatfield, et al. (1988). "Construction and characterization of vaccine strains of Salmonella harboring mutations in two different aro genes." J Infect Dis **158**(6): 1329-35.
- Dougan, G., D. Maskell, et al. (1988). "Oral vaccination." Antonie Van Leeuwenhoek **54**(5): 447-51.
- Fernandez, N. C., A. Lozier, et al. (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." Nat Med **5**(4): 405-11.
- Filloux, A., R. Voulhoux, et al. (2002). "Use of colicin-based genetic tools for studying bacterial protein transport." Biochimie **84**(5-6): 489-97.
- Fiszler, D. and M. Kurpisz (1998). "Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review." Am J Reprod Immunol **40**(3): 172-6.
- Flores, Escalante, et al.(2007). " New Insights into the Role of Sigma Factor RpoS as Revealed in Escherichia coli Strains Lacking the Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System" J Mol Microbiol Biotechnol
- Franch, T., M. Petersen, et al. (1999). "Antisense RNA regulation in prokaryotes: rapid RNA/RNA interaction facilitated by a general U-turn loop structure." J Mol Biol **294**(5): 1115-25.
- Galan, 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.
- Galen, J. E., J. Nair, et al. (1999). "Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain Salmonella typhi CVD 908-htrA." Infect Immun **67**(12): 6424-33.
- 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." Infect Immun **73**(4): 2005-11.
- Geldhof, A. B., J. A. Van Ginderachter, et al. (2002). "Antagonistic effect of NK cells on alternatively activated monocytes: a contribution of NK cells to CTL generation." Blood **100**(12): 4049-58.
- Gentschev, I., G. Dietrich, et al. (2002). "The E. coli alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development." Trends Microbiol **10**(1): 39-45.
- Gentschev, I., G. Dietrich, et al. (2000). "Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes." J Biotechnol **83**(1-2): 19-26.
- Gentschev, I., G. Dietrich, et al. (2004). "Use of the alpha-hemolysin secretion system of Escherichia coli for antigen delivery in the Salmonella typhi Ty21a vaccine strain." Int J Med Microbiol **294**(6): 363-71.
- Gentschev, I., G. Dietrich, et al. (2002). "Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria." Int J Med Microbiol **291**(6-7): 577-82.

- 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**: 15.
- Gerdes, S. Y., M. D. Scholle, et al. (2003). "Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655." J Bacteriol **185**(19): 5673-84.
- Germanier, R. and E. Fuer (1975). "Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine." J Infect Dis **131**(5): 553-8.
- Gilman, R. H., R. B. Hornick, et al. (1977). "Evaluation of a UDP-glucose-4-epimeraseless mutant of *Salmonella typhi* as a liver oral vaccine." J Infect Dis **136**(6): 717-23.
- Graham, S. P., Y. Honda, et al. (2007). "A novel strategy for the identification of antigens that are recognised by bovine MHC class I restricted cytotoxic T cells in a protozoan infection using reverse vaccinology." Immunome Res **3**: 2.
- Graham, S. P., R. Pelle, et al. (2006). "Theileria parva candidate vaccine antigens recognized by immune bovine cytotoxic T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3286-91.
- Hagemann, C. and U. R. Rapp (1999). "Isotype-specific functions of Raf kinases." Exp Cell Res **253**(1): 34-46.
- Hamano-Takaku, F., T. Iwama, et al. (2000). "A mutant *Escherichia coli* tyrosyl-tRNA synthetase utilizes the unnatural amino acid azatyrosine more efficiently than tyrosine." J Biol Chem **275**(51): 40324-8.
- Heiser, A., D. Coleman, et al. (2002). "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors." J Clin Invest **109**(3): 409-17.
- Hinde, P., P. Deighan, et al. (2005). "Characterization of the detachable Rho-dependent transcription terminator of the *fimE* gene in *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **187**(24): 8256-66.
- Hoiseth, S. K. and B. A. Stocker (1981). "Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines." Nature **291**(5812): 238-9.
- Hone, D. M., A. M. Harris, et al. (1991). "Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*." Vaccine **9**(11): 810-6.
- Hoption Cann, S. A., J. P. van Netten, et al. (2003). "Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future." Postgrad Med J **79**(938): 672-80.
- Hormaeche, C. E. (1979). "Natural resistance to *Salmonella typhimurium* in different inbred mouse strains." Immunology **37**(2): 311-8.
- Hornick, R. B., H. L. DuPont, et al. (1976). "Efficacy of a live oral typhoid vaccine in human volunteers." Dev Biol Stand **33**: 89-92.
- Hoshino, R., Y. Chatani, et al. (1999). "Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors." Oncogene **18**(3): 813-22.
- Hueck, C. J. (1998). "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 379-433.

- Hurwitz, A. A., S. E. Townsend, et al. (1998). "Enhancement of the anti-tumor immune response using a combination of interferon-gamma and B7 expression in an experimental mammary carcinoma." Int J Cancer **77**(1): 107-13.
- Husseiny, M. I. and M. Hensel (2005). "Rapid method for the construction of Salmonella enterica Serovar Typhimurium vaccine carrier strains." Infect Immun **73**(3): 1598-605.
- Husseiny, M. I. and M. Hensel (2006). "Construction of highly attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium live vectors for delivering heterologous antigens by chromosomal integration." Microbiol Res.
- Ize, B., F. Gerard, et al. (2002). "In vivo dissection of the Tat translocation pathway in Escherichia coli." J Mol Biol **317**(3): 327-35.
- Jakes, R. and A. R. Fersht (1975). "Tyrosyl-tRNA synthetase from Escherichia coli. Stoichiometry of ligand binding and half-of-the-sites reactivity in aminoacylation." Biochemistry **14**(15): 3344-50.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Janeway, Travers, Walport (2005) "Immunobiology The Immune System in Health and Disease" B&T; Auflage 6 Pap/Cdr (2005)
- Janson, C. A., A. K. Konstantinidis, et al. (2000). "Crystallization of Escherichia coli beta-ketoacyl-ACP synthase III and the use of a dry flash-cooling technique for data collection." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 6): 747-8.
- Kang, H. Y., J. Srinivasan, et al. (2002). "Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium vaccine." Infect Immun **70**(4): 1739-49.
- Kasinskas, R. W. and N. S. Forbes (2006). "Salmonella typhimurium specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro." Biotechnol Bioeng **94**(4): 710-21.
- Kiga, D., K. Sakamoto, et al. (2002). "An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9715-20.
- Kobayashi, T., C. Lonchay, et al. (2003). "New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells." Tissue Antigens **62**(5): 426-32.
- Köhler, Eggers, Fleischer Urban & Fischer Bei Elsevier ; Auflage 8 (Januar 2001)
- Kuby, Goldsby, Kindt, Osborne (2003) "Immunology" Palgrave Macmillan Auflage : 5 (Januar 2003)
- Lam, H. M. and M. E. Winkler (1992). "Characterization of the complex pdxH-tyrS operon of Escherichia coli K-12 and pleiotropic phenotypes caused by pdxH insertion mutations." J Bacteriol **174**(19): 6033-45.
- Liu, S. C., N. P. Minton, et al. (2002). "Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis." Gene Ther **9**(4): 291-6.

- Lonchay, C., P. van der Bruggen, et al. (2004). "Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **101 Suppl 2**: 14631-8.
- Maskell, D., K. Sweeney, et al. (1986). "Attenuated salmonellae as vaccines and carriers of foreign antigens." Ann Sclavo Collana Monogr **3**(1-2): 133-41.
- Maskell, D. J., K. J. Sweeney, et al. (1987). "Salmonella typhimurium aroA mutants as carriers of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit to the murine secretory and systemic immune systems." Microb Pathog **2**(3): 211-21.
- Mastroeni, P., J. A. Chabalgoity, et al. (2001). "Salmonella: immune responses and vaccines." Vet J **161**(2): 132-64.
- Matsumoto, Y., K. Shigesada, et al. (1986). "Autogenous regulation of the gene for transcription termination factor rho in Escherichia coli: localization and function of its attenuators." J Bacteriol **166**(3): 945-58.
- Medina, E., C. A. Guzman, et al. (1999). "Salmonella vaccine carrier strains: effective delivery system to trigger anti-tumor immunity by oral route." Eur J Immunol **29**(2): 693-9.
- Medina, E., P. Paglia, et al. (2000). "Modulation of host immune responses stimulated by Salmonella vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen." Eur J Immunol **30**(3): 768-77.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N Engl J Med **343**(5): 338-44.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1999). "Innate immune induction of the adaptive immune response." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **64**: 429-35.
- Molina, N. C. and C. D. Parker (1990). "Murine antibody response to oral infection with live aroA recombinant Salmonella dublin vaccine strains expressing filamentous hemagglutinin antigen from Bordetella pertussis." Infect Immun **58**(8): 2523-8.
- Murphy, K. C. (1998). "Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli." J Bacteriol **180**(8): 2063-71.
- Murphy, K. C. and K. G. Campellone (2003). "Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic E. coli." BMC Mol Biol **4**: 11.
- Murphy, K. C., K. G. Campellone, et al. (2000). "PCR-mediated gene replacement in Escherichia coli." Gene **246**(1-2): 321-30.
- Naoki, K., T. H. Chen, et al. (2002). "Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma." Cancer Res **62**(23): 7001-3.
- Nardelli-Haeffliger, D., J. P. Kraehenbuhl, et al. (1996). "Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated Salmonella typhi vaccine strain." Infect Immun **64**(12): 5219-24.
- New England Bio Labs® GmbH
- O'Callaghan, D., D. Maskell, et al. (1988). "Characterization of aromatic- and purine-dependent Salmonella typhimurium: attention, persistence, and

- ability to induce protective immunity in BALB/c mice." Infect Immun **56**(2): 419-23.
- O'Donoghue, P. and Z. Luthey-Schulten (2003). "On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases." Microbiol Mol Biol Rev **67**(4): 550-73.
- Ohl, M. E. and S. I. Miller (2001). "Salmonella: a model for bacterial pathogenesis." Annu Rev Med **52**: 259-74.
- Oscarsson, J., M. Westermark, et al. (2002). "Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by Salmonella enterica serovars typhi and paratyphi A." Infect Immun **70**(10): 5759-69.
- Ottaviani, S., D. Colau, et al. (2006). "A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells." Cancer Immunol Immunother **55**(7): 867-72.
- Ottaviani, S., Y. Zhang, et al. (2005). "A MAGE-1 antigenic peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 tumor cells." Cancer Immunol Immunother **54**(12): 1214-20.
- Overwijk, W. W., D. S. Lee, et al. (1999). "Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2982-7.
- Paglia, P., E. Medina, et al. (1998). "Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with Salmonella typhimurium, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma." Blood **92**(9): 3172-6.
- Parkhurst, M. R., M. L. Salgaller, et al. (1996). "Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues." J Immunol **157**(6): 2539-48.
- Pasetti, M. F., T. E. Pickett, et al. (2000). "A comparison of immunogenicity and in vivo distribution of Salmonella enterica serovar Typhi and Typhimurium live vector vaccines delivered by mucosal routes in the murine model." Vaccine **18**(28): 3208-13.
- Pawelek, J. M., K. B. Low, et al. (2003). "Bacteria as tumour-targeting vectors." Lancet Oncol **4**(9): 548-56.
- Phillips, Mc Mullen, et al (2001) "Association of c-Raf expression with survival and its targeting with antisense oligonucleotides in ovarian cancer" British Journal of Cancer (2001) **85**, 1753-1758 doi: 1054/bjoc.2001.2139
- Pickett, T. E., M. F. Pasetti, et al. (2000). "In vivo characterization of the murine intranasal model for assessing the immunogenicity of attenuated Salmonella enterica serovar Typhi strains as live mucosal vaccines and as live vectors." Infect Immun **68**(1): 205-13.
- Pilgrim, S., J. Stritzker, et al. (2003). "Bactofection of mammalian cells by Listeria monocytogenes: improvement and mechanism of DNA delivery." Gene Ther **10**(24): 2036-45.
- Putzer Laalami Springer US; Auflage 1 (2003) Hrsg. von Jacques Lapointe , Lea Brakier-Gigras
- Rapp, Gentshev "Bakterien gegen Krebs " (2005)
www.abayfor.de/abayfor/_media/pdf/ZIB4/08Rapp.pdf
- Renkvist, N., C. Castelli, et al. (2001). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells." Cancer Immunol Immunother **50**(1): 3-15.

- 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." *Appl Environ Microbiol* **73**(3): 1029-32.
- 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 Microbiol Lett* **126**(2): 171-6.
- Robbe-Saule, V. and F. Norel (1999). "The *rpoS* mutant allele of *Salmonella typhi* Ty2 is identical to that of the live typhoid vaccine Ty21a." *FEMS Microbiol Lett* **170**(1): 141-3.
- Rosenberg Surgery Branch, Division of Clinical Sciences, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA. sar@nih.gov „A New Era of Cancer Immunotherapy: Converting Theory to Performance“
- Ryan, E. T., T. I. Crean, et al. (2000). "Development of a DeltagInA balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*." *Infect Immun* **68**(1): 221-6.
- Sanda, M. G., D. C. Smith, et al. (1999). "Recombinant vaccinia-PSA (PROSTVAC) can induce a prostate-specific immune response in androgen-modulated human prostate cancer." *Urology* **53**(2): 260-6.
- Shigesada, K., N. Tsurushita, et al. (1984). "Overproduction of transcription termination factor Rho in *Escherichia coli*." *Gene* **29**(1-2): 199-209.
- Smyth, M. J., E. Cretney, et al. (2005). "Activation of NK cell cytotoxicity." *Mol Immunol* **42**(4): 501-10.
- del Solar, G., R. Giraldo, et al. (1998). "Replication and control of circular bacterial plasmids." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(2): 434-64.
- del Solar, G. and M. Espinosa (2000). "Plasmid copy number control: an ever-growing story." *Mol Microbiol* **37**(3): 492-500.
- Sotillo, R., J. F. Garcia, et al. (2001). "Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13312-7.
- 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." *Mol Microbiol* **31**(5): 1596-8.
- Spreng, S., G. Dietrich, et al. (2000). "Novel bacterial systems for the delivery of recombinant protein or DNA." *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**(4): 299-304.
- Spreng, S. and J. F. Viret (2005). "Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines." *Vaccine* **23**(17-18): 2060-5.
- Springer, Lehouritis, Marais, Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics "The Institute of Cancer Research (2005) http://www.sgm.ac.uk/pubs/micro_today/pdf/080502.pdf
- Srinivasan, J., S. Tinge, et al. (1995). "Oral immunization with attenuated *Salmonella* expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract." *Biol Reprod* **53**(2): 462-71.
- Stanley, Koronakis, V. Hughes, C. (1998) " Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function" *Microbiol Mol Biol Rev*

- Stocker, B. A., S. K. Hoiseth, et al. (1983). "Aromatic-dependent "Salmonella sp." as live vaccine in mice and calves." Dev Biol Stand **53**: 47-54.
- Tacket, C. O., S. M. 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): 3381-5.
- Tjuvajev, J., R. Blasberg, et al. (2001). "Salmonella-based tumor-targeted cancer therapy: tumor amplified protein expression therapy (TAPET) for diagnostic imaging." J Control Release **74**(1-3): 313-5.
- Townsend, S. E. and J. P. Allison (1993). "Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells." Science **259**(5093): 368-70.
- Townsend, S. E., F. W. Su, et al. (1994). "Specificity and longevity of antitumor immune responses induced by B7-transfected tumors." Cancer Res **54**(24): 6477-83.
- Urashima, M., H. Suzuki, et al. (2000). "An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated Salmonella typhimurium." Blood **95**(4): 1258-63.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, et al. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-7.
- van der Bruggen, P. and B. J. Van den Eynde (2006). "Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies." Curr Opin Immunol **18**(1): 98-104.
- Vogel, Hess, Then, Juarez, Goebel (1988) "Characterization of a sequence (hlyR) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in Escherichia coli" Mol Gen Genet
- Vrtala, S., M. Grote, et al. (1995). "Humoral immune responses to recombinant tree pollen allergens (Bet v I and Bet v II) in mice: construction of a live oral allergy vaccine." Int Arch Allergy Immunol **107**(1-3): 290-4.
- Wahlsten, J. L. and S. Ramakrishnan (1996). "Expression and purification of recombinant toxicshock-syndrome toxin I." Biotechnol Appl Biochem **24** (Pt 2): 155-9.
- Wakasugi, K., C. L. Quinn, et al. (1998). "Genetic code in evolution: switching species-specific aminoacylation with a peptide transplant." Embo J **17**(1): 297-305.
- Wang, Y., Y. A. Yu, et al. (2002). "Renilla luciferase- Aequorea GFP (Ruc-GFP) fusion protein, a novel dual reporter for real-time imaging of gene expression in cell cultures and in live animals." Mol Genet Genomics **268**(2): 160-8.
- Westwood, J. A., J. M. Kelly, et al. (2004). "Cutting edge: novel priming of tumor-specific immunity by NKG2D-triggered NK cell-mediated tumor rejection and Th1-independent CD4+ T cell pathway." J Immunol **172**(2): 757-61.
- Woese, C. R., G. J. Olsen, et al. (2000). "Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process." Microbiol Mol Biol Rev **64**(1): 202-36.

- Wolfel, T., M. Hauer, et al. (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." Science **269**(5228): 1281-4.
- Wolfel, T., A. Van Pel, et al. (1987). "Immunogenic (tum-) variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. VIII. Detection of stable transfectants expressing a tum- antigen with a cytolytic T cell stimulation assay." Immunogenetics **26**(3): 178-87.
- Wyszynska, A., A. Raczko, et al. (2004). "Oral immunization of chickens with avirulent Salmonella vaccine strain carrying C. jejuni 72Dz/92 cjaA gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type Campylobacter." Vaccine **22**(11-12): 1379-89.
- Yang, Y., H. C. Tsui, et al. (1998). "Identification and function of the pdxY gene, which encodes a novel pyridoxal kinase involved in the salvage pathway of pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis in Escherichia coli K-12." J Bacteriol **180**(7): 1814-21.
- Yu, Timiryasova, Zhang, Beltz and Szalay (2003), „Optical imaging: bacteria, viruses, and mammalian cells encoding light-emitting proteins reveal the locations of primary tumors and metastases in animals“ Analytical and Bioanalytical Chemistry
- Yu, Y. A., S. Shabahang, et al. (2004). "Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins." Nat Biotechnol **22**(3): 313-20.
- Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit-ZKBS
- Zitvogel, L., N. Fernandez, et al. (1999). "Dendritic cells or their exosomes are effective biotherapies of cancer." Eur J Cancer **35 Suppl 3**: S36-8.
- Zoller, M. and O. Christ (2001). "Prophylactic tumor vaccination: comparison of effector mechanisms initiated by protein versus DNA vaccination." J Immunol **166**(5): 3440-50.

Aus Büchern:

- Alberts, Johnson, Lewis „Molekularbiologie der Zelle“ bei Wiley-VCH; Auflage: 4., Aufl. (Dez. 2003)
- Böcker, Denk, Heitz „Pathologie“ Urban & Fischer Bei Elsevier; Auflage: 3 (April 2004)
- Classen, Diehl, Kochsiek „Innere Medizin“ Urban & Fischer Bei Elsevier; Auflage: 5., völlig überarb. A. (August 2004)
- Fritsch, „Dermatologie und Venerologie“ Springer, Berlin; Auflage: 2., vollst. überarb. A. (September 2003)
- Huber, Rammensee, Wölfel „Krebsimmuntherapien“ Deutscher Ärzte-Verlag Auflage: 1 (2008)
- Köhler, Eggers, Fleischer „Medizinische Mikrobiologie“Urban & Fischer Bei Elsevier; Auflage: 8., Aufl. (Januar 2001)
- Kuby, Goldsby, Kindt, Osborne (2003) „Immunology“ Palgrave Macmillan; Auflage: 5. A. (11. Januar 2003)

Bildnachweis:

- Abbildung: 1 Bundesamt für politische Bildung
(http://www.bpb.de/wissen/68BSAD,0,Sterbef%E4lle_nach_Todesursachen.html)
- Abbildung 2: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)
Elektronenmikroskopaufnahme von *Salmonellen* (rot eingefärbt)
- Abbildung 3: Gentschev, I., G. Dietrich, *et al.* (2002). "Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria." Int J Med Microbiol **291**(6-7): 577-82.
- Abbildung 4: diese Arbeit; *hlyC*, *hlyB* und *hlyD* sind Bestandteile des Hämolyisin- α -Sekretionssystem; ori= origin of replication; Km-Res= Kanamycinresistenzgen
- Abbildung 5: diese Arbeit
- Abbildung 6: Modell der Tyrosyl-tRNA-Synthetase
<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/xtal/teach/trna/trna.html>
- Abbildung 7: Tyrosyl-tRNA-Synthetase
(NCBI Cn3C 4.1 molecule imaging)
- Abbildung 8: Reaktionsmechanismus; (<http://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=REACTION&object=TYROSINE--TRNA-LIGASE-ORXN>)
- Abbildung 9: Putzer Laalami Springer US; Auflage 1 (2003) Hrsg. von Jacques Lapointe , Lea Brakier-Gigras
- Abbildung 10: Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-5
- Abbildung 11: <http://de.wikipedia.org/wiki/PCR>)
- Abbildung 12: (Bild: <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2004/teichler/teichler.pdf>)
- Abbildung 13: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung 14: (<http://de.wikipedia.org/wiki/Restriktionsenzyme>)
- Abbildung 15: (<http://de.wikipedia.org/wiki/Klonierung>)
- Abbildung 16: <http://de.wikipedia.org/wiki/Photometer>
- Abbildung:17: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:18: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:19: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:20: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:21: Protein-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:22: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:23: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:24: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:25: DNA-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:26: Protein-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:27: Protein-Gelphoto, diese Arbeit
- Abbildung:28: Protein-Gelphoto, diese Arbeit

Abbildung 29: modifizierte Grafik aus Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000).
 "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli
 K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12):
 6640-5

Abbildung:30: DNA-Gelphoto, diese Arbeit

Abbildung:31: DNA-Gelphoto, diese Arbeit

Abbildung:32: Protein-Gelphoto, diese Arbeit

Abbildung:33: DNA-Gelphoto, diese Arbeit

Abbildung:34: Protein-Gelphoto, diese Arbeit

Abbildung:35: Protein-Gelphoto, diese Arbeit

tyrS-Sequenz:

ATGGCAAGCA	GTAAC TTGAT	TAAACAATTG	CAAGAGCGGG	GGCTGGTAGC	CCAGGTGACG
GACGAGGAAG	CGTTAGCAGA	GCGACTGGCG	CAAGGCCCGA	TCGCGCTCTA	TTGCGGCTTC
GATCCTACCG	CTGACAGCTT	GCATTTGGGG	CATCTTG TTC	CATTGTTATG	CCTGAAACGC
TTCCAGCAGG	CGGGCCACAA	GCCGGTTGCG	CTGGTAGGCG	GCGCGACGGG	TCTGATTGGC
GACCCGAGCT	TCAAAGCTGC	CGAGCGTAAG	CTGAACACCG	AAGAAACTGT	TCAGGAGTGG
GTGGACAAAA	TCCGTAAGCA	GGTTGCCCCG	TTCTCGATT	TCGACTGTGG	AGAAAACTCT
GCTATCGCGG	CGAACAACTA	TGACTGGTTC	GGCAATATGA	ATGTGCTGAC	CTTCCTGCGC
GATATTGGCA	AACACTTCTC	CGTTAACCAG	ATGATCAACA	AAGAAGCGGT	TAAGCAGCGT
CTCAACCGTG	AAGATCAGGG	GATTCG TTC	ACTGAGTTTT	CCTACAACCT	GTTGCAGGGT
TATGACTTCG	CCTGTCTGAA	CAAACAGTAC	GGTGTGGTGC	TGCAAATTGG	TGGTTCTGAC
CAGTGGGGTA	ACATCACTTC	TGGTATCGAC	CTGACCCGTC	GTCTGCATCA	GAATCAGGTG
TTTGGCCTGA	CCGTTCCGCT	GATCACTAAA	GCAGATGGCA	CCAAATTGG	TAAAACTGAA
GGCGGCGCAG	TCTGGTTGGA	TCCGAAGAAA	ACCAGCCCGT	ACAAATTCTA	CCAGTTCTGG
ATCAACACTG	CGGATGCCGA	CGTTTACCGC	TTCCTGAAGT	TCTTCACCTT	TATGAGCATT
GAAGAGATCA	ACGCCCTGGA	AGAAGAAGAT	AAAAACAGCG	GTAAAGCACC	GCGCGCCCAG
TATGTA CTGG	CGGAGCAGGT	GACTCGTCTG	GTTACCGGTG	AAGAAGGTTT	ACAGGCGGCA
AAACGTATTA	CCGAATGCCT	GTTTCAGCGGT	TCTTTGAGTG	CGCTGAGTGA	AGCGGACTTC
GAACAGCTGG	CGCAGGACGG	CGTACCGATG	GTTGAGATGG	AAAAGGGCGC	AGACCTGATG
CAGGCACTGG	TCGATTCTGA	ACTGCAACCT	TCCC GTGGTC	AGGCACGTAA	AACTATCGCC
TCCAATGCCA	TCACCATTAA	CGGTGAAAAA	CAGTCCGATC	CTGAATACTT	CTTTAAAGAA
GAAGATCGTC	TGTTTGGTGC	TTTTACCTTA	CTGCGTGC GG	GTAAAAAGAA	TTACTGTCTG
ATTTGCTGGA	AATAA				(1275 bp)

8. Abkürzungen und DNA-Leiter

Allgemeine Abkürzungen

Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin Monophosphat
AS	Aminosäure
asd-Gen	Aspartat β -Semialdehyd Dehydrogenase
ATP	Adenosin Triphosphat
Atn	Attenuator
att.	attenuiert
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basen Paare
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cat.	Chloramphenicolacetyltransferase
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
CTX/CtxB	Choleratoxin
deion.	deionisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxy Nucleotidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetra Acetat
<i>et al.</i>	et altera
FLP	Flipase
FRT	Flipase Recognition
g	Gramm
IS2	Insertions Sequenz 2

Kan	Kanamycin
KB-Leiter	Kilo Basenleiter
kg	Kilo Gramm
kV	Kilo Volt
LB	Luria-Bertani
m	Meter
MALT	Muccosa Associated Lymphoid Tissue
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
rpm	rounds per minute
SDS	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	Tyrosyl-tRNA-Synthetase-Gen
YT	Yeast Extract, Tryptone
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
Δ	ohne

Vorsilben

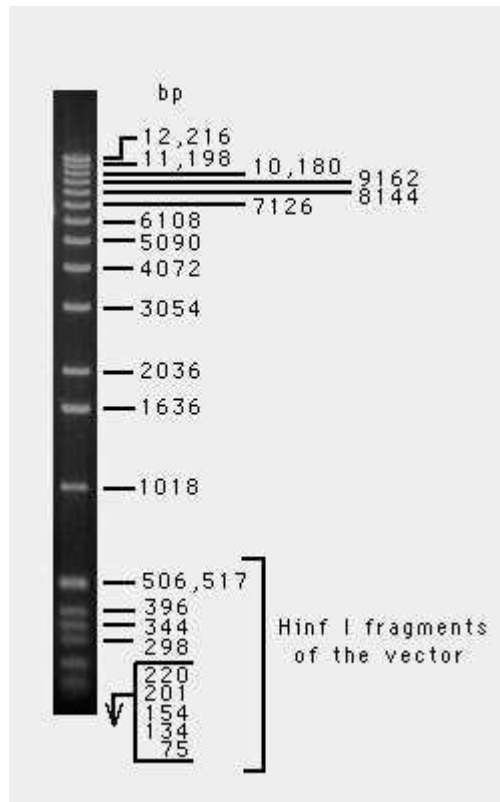
f	femto	10^{-15}
p	piko	10^{-12}
n	nano	10^{-9}
μ	mikro	10^{-6}
m	milli	10^{-3}
c	zenti	10^{-2}
d	dezi	10^{-1}
h	hekto	10^2
k	kilo	10^3
M	mega	10^6
G	giga	10^9

Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Asparagin	Asn	N
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	N
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F

Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

DNA-Leiter



9. Danksagung und Lebenslauf

Danksagung

Ich möchte mich bei folgenden Personen recht herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Frau Dr. Birgit Bergmann für die erstklassige Planung und Betreuung des gesamten Projektes. Durch ihre ständige Hilfsbereitschaft, viel Geduld und ihre große Fachkompetenz, die sich vor allem dann zeigte, wenn größere Probleme auftraten, hat sie das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht.

Noch mal vielen, vielen Dank dafür!

Bei Herrn Professor Dr. Ulf Rapp für die Möglichkeit meine medizinische Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Bei Dr. Joachim Fensterle und Priv. Doz. Dr. Ivaylo Gentshev für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Vergabe des interessanten Themas.

Ihre methodischen Tipps, ihre Erfahrung und die ständige Diskussionsbereitschaft haben das Projekt in schwierigen Phasen häufig weitergebracht.

Bei Martin Heisig, Christian Hotz, Susanne Meyer und Katharina Galmbacher für die große Unterstützung bei methodischen Problemen und die Geduld die große Menge an gestellten Fragen zu beantworten.

Weiterhin möchte ich mich bei Matthias, Katharina, Maureen, Tine, Martin Emanuele und Clarisse für ihre Ratschläge und ihre Laborerfahrung bedanken, die mir den Einstieg in die Laborarbeit erleichtert haben.

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

Mein größter Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern Maria Diessner und Dr. Reinhard Diessner, die mich in der gesamten Schul- und Studienzeit mit höchstem Engagement finanziell und moralisch unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.

Lebenslauf

persönliche Daten

Name: Diessner, Joachim Ernst

Geburtsdatum: 18. Februar 1982

Geburtsort: Rothenburg o. d. Tauber

Eltern: Maria Diessner
Dr. rer. pol. Reinhard Diessner

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: evangelisch

Schulbildung

Grundschule: Sept. 1988 - Juli 1992

Gymnasium: Sept. 1992 - Juli 2001
Georg-Wilhelm-Steller-Gymnasium,
Bad Windsheim

Schulabschluss: Abitur

Zivildienst: Juli 2001 - März 2002
Krankenpflege im Krankenhaus
Bad Windsheim

Auslandsaufenthalt: März 2002 – Juni 2002
Bell international language school Cambridge
Abschluss: Certificate in Advanced English

Studium: Oktober 2002 bis Juni 2009
Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Weitere Kenntnisse
und Interessen:** Fremdsprachen: Englisch, Französisch
Sport: Tennis, Schwimmen, Skifahren
Musik: Klavier
Führerschein: Klasse B

Bad Windsheim, 19. Mai 2009

(Ernst Joachim Diessner)