

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung  
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Albrecht Müller

**Charakterisierung und Weiterentwicklung  
eines Balanced Lethal Systems in *Salmonella spp.***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Christian Rechtenwald  
aus Schweigern

Würzburg, März 2011

Referent: Priv.-Doz. Dr. Jörg Wischhusen

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Hünig

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2011

Der Promovend ist Arzt

Für Felicitas

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Krebs und seine Therapie .....	1
1.1.1	Gesellschaftsproblem Krebs .....	1
1.1.2	Chance Immuntherapie.....	2
1.1.3	Bakterielle Tumorthherapie.....	3
1.2	Bestandteile des Projektes .....	4
1.2.1	Salmonella Typhi Ty21a .....	4
1.2.2	Salmonella Typhimurium AroA SL 7207 .....	6
1.2.3	Hämolysin- $\alpha$ Sekretionssystem.....	7
1.2.4	Antigendeliveryplasmid pMO .....	8
1.2.5	Balanced Lethal System .....	8
1.3	Ziel der Arbeit .....	10
2	Material.....	12
2.1	Geräte .....	12
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	13
2.3	Bakterienstämme.....	13
2.4	Plasmide.....	14
2.5	Primer .....	14
2.6	Enzyme .....	16
2.7	Antikörper .....	16
2.8	Kulturmedien .....	16
2.9	Antibiotika .....	17
2.10	Chemikalien .....	17
2.11	Kits .....	18
2.12	Größenmarker.....	18
3	Methoden .....	20
3.1	Arbeiten mit Bakterien .....	20

3.1.1	Sterilisation der Medien und Geräte .....	20
3.1.2	Kultivierung von Bakterienstämmen in Flüssigmedien .....	20
3.1.3	Kultivierung von Bakterienstämmen auf Kulturplatten .....	20
3.1.4	Herstellung von Glycerinstocks .....	20
3.1.5	Erzeugung elektrokompetenter Zellen .....	21
3.2	Molekulargenetische Arbeiten .....	21
3.2.1	Aufreinigung von DNA .....	21
3.2.2	Isolation von Plasmid-DNA .....	23
3.2.3	Isolation von genomischer DNA aus Bakterien .....	24
3.2.4	Polymerasekettenreaktion .....	25
3.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	28
3.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	29
3.2.7	Restriktionsverdau von DNA-Sequenzen .....	30
3.2.8	Elektroporation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen .....	30
3.2.9	Photometrische Messungen .....	31
3.2.10	Sequenzierung von DNA-Abschnitten .....	31
3.3	Proteinanalytische Methoden .....	32
3.3.1	Proteinisolierung aus dem Bakterienpellet .....	32
3.3.2	Proteinisolierung aus dem Bakterienüberstand .....	32
3.3.3	SDS-Gelelektrophorese .....	33
3.3.4	Western Blot .....	34
4	Ergebnisse .....	35
4.1	Charakterisierung der Vakzinkandidaten in Salmonella typhi Ty21a .....	35
4.1.1	Wachstumskurven .....	35
4.1.2	Proteinexpression .....	37
4.1.3	Plasmidstabilität .....	39
4.1.4	Sequenzierung chromosomaler tyrS-Knockout .....	40

4.2 Vorbereitung des chromosomalen Knockouts der tyrS-Kassette in Salmonella typhimurium AroA SL 7207 .....	40
4.2.1 Gewinnung des tyrS-Cm-Fragments .....	41
4.2.2 Integration des tyrS-Cm-Fragments in das Salmonella typhimurium-Genom.....	42
4.3 Variation der Lage des lacI-Promotors.....	44
5 Diskussion .....	49
6 Zusammenfassung .....	54
7 Literaturverzeichnis .....	56
Bildnachweis.....	59
Danksagung .....	60
Lebenslauf .....	61

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs und seine Therapie

### 1.1.1 Gesellschaftsproblem Krebs

Wie das folgende Diagramm illustriert rangieren die bösartigen Neubildungen nach den Herz- und Kreislauferkrankungen auf dem zweiten Rang der Todesursachen in Deutschland. Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich zudem ihr Anteil an der Gesamtsterblichkeit erhöht.

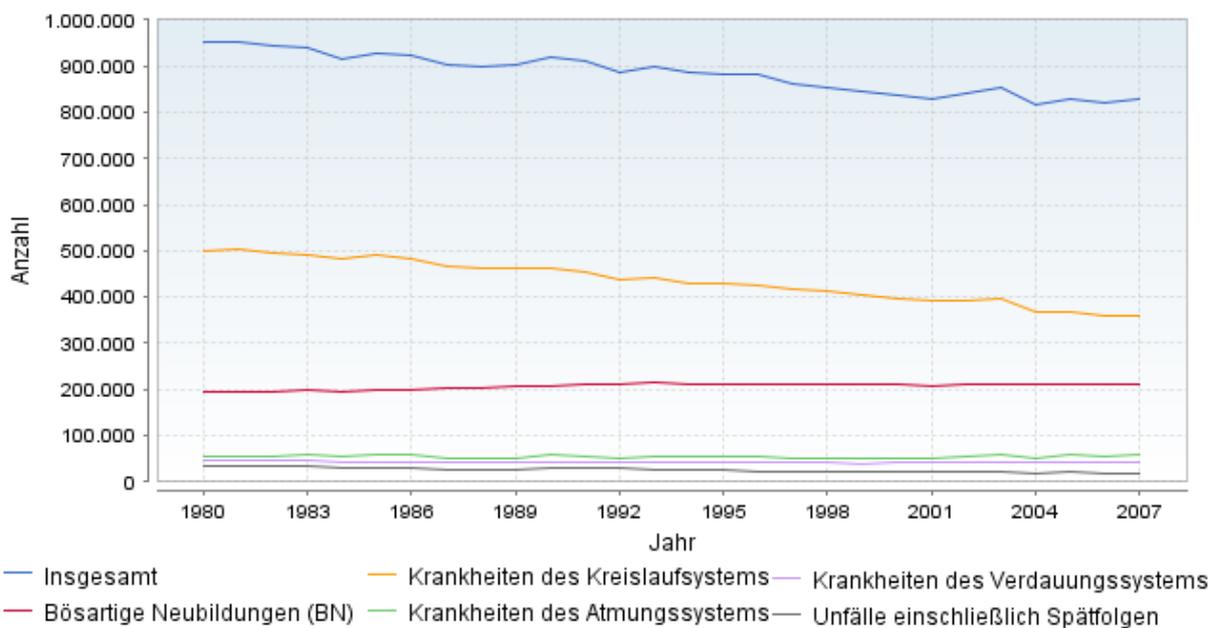


Abbildung 1: Anzahl der Todesfälle und häufigste Ursachen in Deutschland

Diese unbefriedigende Situation verlangt nach neuen Therapiekonzepten, die auf ein möglichst breites Spektrum der Variationsbreite an Neoplasien anwendbar sind und der Diagnose Krebs einen Teil ihres Schreckens nehmen können.

Der Begriff Tumor bezeichnet eine autonom proliferierende, vom Normalgewebe abgrenzbare Gewebsmasse, welche von den physiologischen Regulations-Mechanismen des Organismus entkoppelt ist, das Aussehen und die Funktion des Ursprungsgewebes aber in unterschiedlichem Ausmaß nachahmen kann. Es werden gutartige (benigne) von bösartigen (malignen) Tumoren unterschieden. Erstere zeichnen sich durch gute Differenzierung und gute Abgrenzungen zur Umgebung bei geringer Veränderung der Zellstruktur aus, letztere bilden das aggressiv-destruktivere Gegenstück (Krams 2010). Aufgrund der grundsätzlichen

Gemeinsamkeiten nahezu aller menschlichen Zellen benötigen Tumorzellen durch Veränderungen des Genoms eine definierte Reihe an Fähigkeiten, um sich von schützenden Regulationsmechanismen zu befreien, unter anderem diejenigen zur unabhängigen Wachstumsstimulation, Verhinderung der Apoptose und Aufrechterhaltung der Gefäßneubildung (Hanahan und Weinberg 2000).

### 1.1.2 Chance Immuntherapie

Etablierte Tumortheraieverfahren sind v.a. die operative Entfernung, die durch Lage, Ausdehnung und Metastasierung der Neoplasien sowie den Allgemeinzustand des Patienten begrenzt ist, die Strahlentherapie mit limitierender Radiotoxizität, die supportive Therapie und die konventionelle Gabe von Chemotherapeutika.

Die konventionelle Chemotherapie aktiviert intakte Tumorsuppressor-Mechanismen in malignen Zellen. Neben den massiven Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe ist sie durch die Selektion dysfunktionaler Tumorzellen limitiert, was mittelfristig zu hoher Therapieresistenz führt und nach neuen Therapiestrategien verlangt (Stagg, Johnstone et al. 2007).

Das Ziel der Immuntherapie liegt in der Steigerung der Immunabwehr. Zur unspezifischen globalen Aktivierung werden Thymuspeptide, Zytokine, pflanzliche und bakterielle Substanzen verwendet. Zur spezifischen Therapie wird z.B. Herceptin eingesetzt, bei der blockierende Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor *erbB2* die Wirkung seiner Überexpression dämpfen und das Wachstum des Mammakarzinoms hemmen. In Spezialfällen wie dem Leberzellkarzinom wird durch Vakzinierung mit abgetöteten, diesen Tumor induzierenden Viren, eine Immunprophylaxe erreicht. Ein weiterer Weg liegt in der Steigerung der Antigenität durch Infektion mit apathogenen Erregern (Böcker und Aguzzi 2008).

Ein früher Beleg für die Wirksamkeit der Immuntherapie bot die Gabe des von T-Helferzellen sezernierten Interleukin-2 bei Patienten mit metastasiertem Nierenkrebs oder Melanom, das über die Aktivierung von Lymphozyten mit Antitumor-Aktivität in nahezu der Hälfte der Fälle zu deutlicher Tumorregression führte. (Rosenberg, Lotze et al. 1985)

Nach den Erfolgen der aktiven Vakzinierung gegen Pocken und Polio eröffnete die molekulare Identifizierung humaner Krebsantigene die Aussicht, Krebspatienten aktiv gegen ihren Tumor zu immunisieren. Krebszellen, deren Teile oder spezifische Antigenstrukturen lassen sich in Kombination mit Adjuvantien und Zytokinen zur

gepulsten Stimulierung des Immunsystems einsetzen. In klinischen Studien hat die Immunisierung von Patienten mit Krebsantigenen nachempfundenen Peptiden die Isolation von Lymphozyten mit Antitumor-Aktivität ermöglicht, mit anschließender *in vitro* Züchtung zur Zelltransfer-Therapie. Auch mit Malignomen verknüpfte Infektionserreger wie *Helicobacter pylori* beim Magenkarzinom, *Schistosoma mansoni* beim Blasenkrebs oder Epstein-Barr-Virus beim Lymphom bergen Chancen für die Immuntherapie (Rosenberg 2001).

Nach dem Konzept des Cancer Immunoediting hat das Immunsystem Überwachungs- und Schutzfunktion, fördert durch den immunologischen Druck aber auch die Entstehung Therapie-refraktärer Tumore (Stagg, Johnstone et al. 2007). Ein Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapien liegt in der Aufklärung molekularer Verbindungen zwischen Tumorsuppressor-Mechanismen und Malignomen. Zudem scheinen einige Tumoren trotz der Überwindung der Suppressormechanismen regelrecht abhängig von spezifischen onkogenen Signalen zu sein. Zukünftige Therapiekonzepte sollten neben zytotoxischen, pro-immunogenen Substanzen die immunologische Induktion des Tumorzelltodes, die zielgerichtete Blockade immunregulatorischer Checkpoints und eine Verbesserung der Tumorantigenpräsentation umfassen (Stagg, Johnstone et al. 2007).

Krebszellen bieten zahllose genetische Abweichungen und damit Ansatzpunkte für die Entwicklung von immunaktivierenden Krebsantigenen. Anhand von genomischen Untersuchungen an prämaligen colorektalen Polypen und Karzinomzellen wird deren Zahl pro Karzinomzelle auf etwa 11000 geschätzt. (Stoler, Chen et al. 1999) Therapeutisch nutzbare Antigene können beispielsweise überexprimiert, mutiert oder viralen Ursprungs sein (Old 2003).

Derzeit durchlaufen 6 verschiedene immunologische Vakzintypen fortgeschrittene klinische Studien, als Vektoren werden dabei ganze Zellen, Viren, Konjugate oder Proteine verwendet. Auch Salmonellen befinden sich in der klinischen Erprobungsphase (Old 2008).

### **1.1.3 Bakterielle Tumorthherapie**

Die Beobachtung, dass Tumorpatienten in fortgeschrittenen Stadien nach einer Infektion spontan genesen regte intensive Nachforschungen an. Bereits 1868 versuchte Busch inoperable Tumoren durch Provokation von Erysipelen zu behandeln. Fehleisen identifizierte 1882 möglicherweise *Streptococcus pyogenes* als Verursacher des Erysipels. Anhand dieser Grundlagen entwickelte William Coley

ab 1890 Coley's Toxin, eine Kombination hitzeinaktivierter *Streptococcus pyogenes* mit *Serratia marcescens*, die lange Zeit zur Therapie von Sarkomen eingesetzt wurde. Erst 1976 gelang Morales, Eidinger und Bruce mit *Bacillus Calmette-Guerin* ein weiterer Durchbruch, welcher heute die Therapie der Wahl des oberflächlichen Blasenkrebses darstellt. Auch weiteren Bakteriengattungen wurden bevorzugte Replikation im Tumorgewebe und tumorlytische Eigenschaften nachgewiesen, unter anderem den grampositiven, anaeroben Bifidobakterien, den gramnegativen fakultativ anaeroben intrazellulären Salmonellen und Listerien, sowie den grampositiven, obligat anaeroben Clostridien. (Wei, Mengesha et al. 2008)

Auch bei einem auf seine Antitumor-Aktivität *in vivo* hin selektierten genetisch modifizierten *Salmonella Typhimurium* A1-Stamm konnte im Mausversuch nach i.v. Applikation ein Wachstumsstopp von Prostatatumoren erreicht werden, intratumorale Applikation führte gar zu kompletter Remission. Besonders ausgeprägt war das auf den Tumor beschränkte Wachstum der Bakterien, die sich extratumoral nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisen ließen (Zhao, Yang et al. 2005). Mit *Clostridium novyi-NT* wird derzeit ein weiterer genetisch modifizierter Stamm klinisch getestet (Wei, Mengesha et al. 2008).

Ein aktuelles Erfolgsbeispiel ist die Induktion von Apoptose in tumorassoziierten Makrophagen mit einem dafür entwickelten attenuierten Stamm von *Shigella flexneri*, was im Mausmodell zu einer deutlichen Reduktion der Tumormasse und sogar zu kompletter Regression von Brusttumoren führte (Galmbacher, Heisig et al. 2010).

## 1.2 Bestandteile des Projektes

### 1.2.1 Salmonella Typhi Ty21a

Salmonellen gehören zu den Enterobakterien. Es handelt sich um peritrich begeißelte obligat pathogene gramnegative Stäbchenbakterien, die nach dem Kauffmann-White-Schema klassifiziert werden, welches die Salmonellen mittels der Gruber-Agglutinationsreaktion anhand ihres Antigenmusters serologisch in mehr als 2200 Serovaren unterteilt. Je nach Art verursachen sie relativ harmlose Enteritiden, aber auch schwere septische und schwerste zyklische Allgemeininfektionen. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *Typhi*, kurz *Salmonella Typhi*, ist Verursacher des Typhus abdominalis, wobei nach oraler Infektion die M-Zellen der Dünndarmmukosa durchdrungen werden. Dazu bindet das *InvA* Protein an den EGF-Rezeptor und aktiviert die MAP-Kinase, welche die Phospholipase A2 und

Kalziumkanäle aktiviert, was zur Membranfaltung und Aufnahme der Bakterien führt. Die Erreger vermehren sich in den lymphatischen Systemen des Darmes, können praktisch alle Organe besiedeln, was zu Granulombildung führt. Die Aktivierung des Immunsystems führt zu Nekrotisierungen mit Darmblutungen und –Perforationen. Typisch sind stufenförmiger Fieberanstieg bis über 40°C mit Übergang in ein mehrwöchiges Kontinuum, sog. Typhusroseolen, toxische Organschäden und erbsbreiartige Stuhlentleerungen. Weltweit sind jährlich mehr als 20 Mio. Menschen von Typhus betroffen (Jones, Ghori et al. 1994; Lengeler 1999; Hahn 2009; Hof und Dörries 2009).

Beim Einsatz von Salmonellen in der Tumortherapie gereicht ihnen im Vergleich zu anderen Kandidaten zum Vorteil, dass sie fakultativ anaerob sind, wodurch sie gleichermaßen sauerstoffreiche Metastasen und hypoxische Tumorzentren besiedeln können (Vassaux, Nitchou et al. 2006).

Die Attenuierung von *Salmonella Typhi* Ty21a ist hauptsächlich auf die sog. *gal E* Mutation zurückzuführen, deren gestörte Galaktoseverwertung *in vivo* durch Galaktoseaufnahme zu einer toxischen, nach Tagen zur Bakterienlyse führenden Akkumulation von Stoffwechselprodukten führt. Bei klinischen Studien und kontrollierten Feldversuchen am Menschen erwies sie sich als geeignet mittels oraler Vakzinierung Immunität gegenüber Typhus abdominalis zu erzeugen. Dabei traten keine nennenswerten Nebenwirkungen auf (Germanier und Furer 1971; Germanier und Furer 1975; Gilman, Hornick et al. 1977; Germanier und Furer 1983). *Salmonella Typhi* Ty21a ist Hauptbestandteil von Vivotif, dem einzigen attenuierten oralen Lebendimpfstoff gegen Typhus, dem in großen klinischen Studien exzellente Verträglichkeit und eine Protektivität von 70-80% nachgewiesen wurden. Diese Daten bestätigten sich innerhalb von mehr als 2 Jahrzehnten bei über 200 Millionen Impfungen (Gentschev, Spreng et al. 2007). *Salmonella Typhi* Ty21a wurde in klinischen Studien als Träger für Antigene von *Helicobacter Pylori* eingesetzt, wobei teilweise eine zelluläre Immunantwort nachgewiesen wurde (Bumann, Metzger et al. 2001; Metzger, Mansouri et al. 2004). Salmonellen ermöglichen als bakterielle Lebendvakzine bei geringen Nebenwirkungen über die Präsentation heterologer Antigene eine lang anhaltende Immunitätsinduktion. Diese wird durch die zusätzlich mucosale Immunstimulation, folglich direkt an einem Hauptinfektionsweg, weiter verbessert (Spreng, Dietrich et al. 2006).

Die Arbeitsgruppe „Bakterielle Tumorthherapie“ nutzt attenuierte Salmonellen als Tumorimpfstoffe, die tumorspezifische Antigene wie das prostataspezifische Antigen produzieren und diese über das sehr flexible, aus *Escherichia coli* stammende Hämolysin- $\alpha$  Sekretionssystem sezernieren, womit eine zytotoxische T-Zell-Antwort hervorgerufen und damit Tumorwachstum verhindert werden kann (Fensterle, Bergmann et al. 2008; Hotz, Fensterle et al. 2009).

### 1.2.2 *Salmonella Typhimurium* AroA SL 7207

*Salmonella Typhimurium* AroA SL 7207 soll aufgrund seiner Ähnlichkeit zu *Salmonella Typhi* die Grundlage für *in vivo* Versuche im Mausmodell bilden.

*Salmonella enterica ssp. enterica serovar Typhimurium*, kurz *Salmonella Typhimurium*, ist eine ebenfalls humanpathogene Art, die beim Menschen jedoch lokale Enteritiden hervorruft. Desweiteren wird *Salmonella Typhimurium* im verbreiteten Ames Test zur Bestimmung des Karzinogenese-Risikos als mutagen eingestufte Chemikalien verwendet (Lim 1998; Lengeler 1999).

Neben der Fähigkeit, multiple Tumororte zu erreichen beträgt die bevorzugte Replikation attenuierter *Salmonella Typhimurium* im Tumorgewebe in der Maus mehr als 1000:1, was zu verlangsamtem Tumorwachstum und verlängertem Überleben führt. Der Effekt lässt sich durch bakterielle, plasmidgestützte Aktivierung von applizierten Prodrugs im Tumorgewebe verstärken. Zahlreich vorhandene genetische Techniken für Enterobacteriaceae sind eine gute Grundlage für künftige Vakzinierungsprojekte (Pawelek, Low et al. 1997).

Zur Attenuierung werden, wie beim verwendeten Vakzinestamm, am häufigsten AroA-Mutationen eingesetzt, wodurch keine aromatischen Komponenten produziert werden können. Im Mausversuch wurde diesen exzellente Verträglichkeit bei gleichzeitigem Schutz vor virulenten Stämmen bestätigt (Hoiseth und Stocker 1981).

*Salmonella Typhimurium* AroA SL 7207 ist gut geeignet eine mucosale Immunreaktion hervorzurufen sowie Antigendeliveryplasmide und damit deren Produkte an für Lymphozyten erreichbare Orte zu tragen. (Gentshev, Mollenkopf et al. 1996). Durch Klonierung des humanen Tumorantigens Raf in das Vektorplasmid pMOhly1 und dessen Sekretion über das Hämolysin- $\alpha$  Sekretionssystem konnte im Mausversuch mit *Salmonella Typhimurium* AroA SL 7207 eine humorale

Immunantwort mit Raf-spezifischen Antikörpern und ein partieller Schutz vor Lungenkrebs induziert werden (Gentshev, Fensterle et al. 2005).

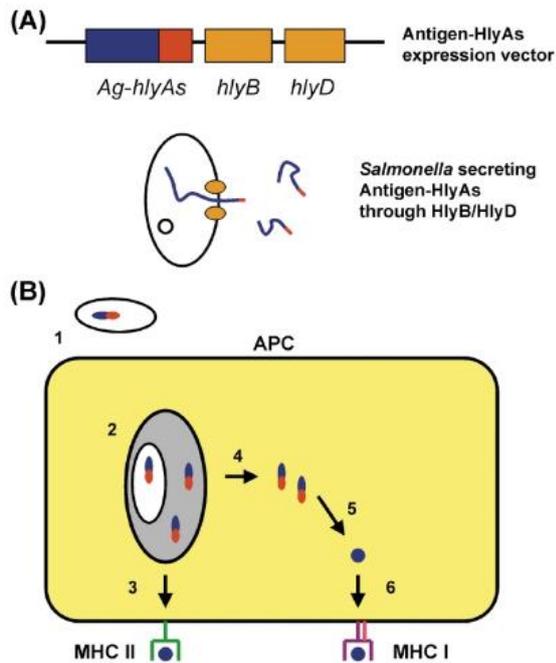
### 1.2.3 Hämolyisin- $\alpha$ Sekretionssystem

Im Gegensatz zu anderen Sekretionssystemen besitzen Typ 1-Sekretionssysteme lediglich drei verschiedene Transportkomponenten, die eine Art Tunnel zwischen äußerer und innerer Membran bilden und Proteine direkt ins extrazelluläre Medium sezernieren. Dadurch können attenuierte bakterielle Impfstoffe dem Immunsystem heterologe Antigene ohne vorherige Desintegration präsentieren. Beim Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystem von *Escherichia coli* handelt es sich um das am besten charakterisierte Typ 1-Sekretionssystem. Interessanterweise transportiert dieses System verschiedenste Proteine zwischen 20 und >1000 Aminosäure Länge, sowohl pro- als auch eukaryotischen Ursprungs. Über 400 Fusionsproteine mit HlyA 3' Ende wurden angefertigt. Das Sekretionssystem arbeitet zudem in zahlreichen *Salmonella*-Stämmen vergleichbar effektiv wie in *Escherichia coli*.

Am Carboxyende kovalent mit HlyA verknüpfte Proteine werden an der inneren Membran vom HlyB-D-Komplex erkannt. Entscheidend für die Erkennung ist die HlyA-Signalsequenz, welche aus 60 Aminosäuren besteht. HlyD bildet mit dem an der Außenmembran lokalisierten TolC, welches Bestandteil mindestens 4 verschiedener Exportsysteme ist, einen durchgehenden Tunnel. Dafür ist keine Konformationsänderung notwendig (Gentshev, Dietrich et al. 2002; Dietrich, Viret et al. 2003).

Im Mausversuch induzierten attenuierte Stämme von *Salmonella Typhimurium* mittels über das Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystem sezerniertem Listeriolysin- oder p60-HlyA-Fusionsproteinen eine protektive Immunität gegen Infektion mit *Listeria monocytogenes* (Gentshev, Mollenkopf et al. 1996).

Das Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystem konnte erfolgreich und mit effizienter Sekretionsleistung in *Salmonella Typhi* Ty21a, den einzigen oralen Salmonellen-Impfstamm, der zur Anwendung beim Menschen zugelassen ist, übertragen werden (Gentshev, Dietrich et al. 2004).



**Abbildung 2: Expression und Sekretion heterologer Antigene in *Salmonella* mittels des Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystems von *Escherichia coli***

(A) Eine ein Zielantigen kodierende Sequenz (blau) wird zusammen mit den Sequenzen für HlyB und HlyD in frame in einen Vektor geklont. Das Zielantigen wird über das Hämolyisin- $\alpha$  System sezerniert.

(B) Das rot-blaue HlyAs-Fusionsprotein exprimierende *Salmonellen* infizieren eine Wirtszelle (1), sezernieren das Fusionsprotein ins phagosomale Kompartiment (2), was zur Antigenpräsentation mit der MHC Klasse II führt (3). Zusätzlich kann das Antigen teilweise Zugang zur MHC Klasse I-Präsentation über die alternative Route erhalten.

#### 1.2.4 Antigeneliveryplasmid pMO

Im Vergleich zur Kodierung auf dem Bakteriengenom ermöglicht die Verwendung mehrfach vorhandener Plasmide eine höhere Antigenexpression und damit eine stärkere Immunantwort (Curtiss 2002).

Das ca. 14000 bp große Plasmid pMOhly-CtxB-PSA kodiert für ein Fusionsprotein aus CtxB, dem tumorspezifischen Antigen PSA sowie der HlyA-Signalsequenz des Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystems. Außerdem enthält es eine Kanamycin-Resistenzkassette (Fensterle, Bergmann et al. 2008).

#### 1.2.5 Balanced Lethal System

Um dem Immunsystem mit Hilfe von Bakterien wie *Salmonellen* effektiv verschiedene Antigene präsentieren zu können, muss das Grundproblem der Stabilität des antigentragenden Plasmides gelöst werden. Extrachromosomale Replikons tragen zur eigenen Replikation bei, doch bleiben nur dann über Generationen erhalten wenn sie einen Selektionsvorteil für das Wirtsbakterium, dessen Replikationssysteme sie intensiv benutzen, mit sich bringen (del Solar, Giraldo et al. 1998).

Die stabile Replikation des Antigeneliveryplasmides pMO in den *Salmonella*-Stämmen des Vakzinprojektes ist unbedingte Voraussetzung für die Funktion des Gesamtsystems. Der weitverbreite Weg, die Stabilisierung mittels Antibiotikaresistenzgenen zu erreichen, verbietet sich *in vivo*, da dort kein permanenter Antibiotikaselektionsdruck ausgeübt werden kann. Zudem sollte der sich verschlechternden Resistenzlage nicht unnötig Vorschub geleistet werden, was sich auch in wachsenden administrativen Restriktionen ausdrückt.

Ein alternativer, antibiotikafreier Weg zur Plasmidstabilisierung führt über die Erstellung eines Balanced Lethal Systems. Das erste derartige System in *Salmonellen* beinhaltete eine chromosomale Deletion, die zum Mangel an 2,6-Diaminopimelinsäure, eines essentiellen Bestandteils der bakteriellen Zellwand, führte. Das wildtypische Gen wurde auf dem zu stabilisierenden Plasmid komplementiert. Da DAP weder im Wirt noch außerhalb natürlich vorkommt kann das Bakterium nicht ohne Plasmid überleben. Spätere *in vivo*-Versuche zeigten jedoch mangelnde Antigenexpression und einen zu schnellen Antigenabbau (Curtiss, Galan et al. 1990; Spreng und Viret 2005).

Analog der etablierten Methode zur direkten Deletion von Genen in Hefen (Baudin, Ozier-Kalogeropoulos et al. 1993) existiert ein in *Escherichia coli* entwickeltes Verfahren, welches in einem Schritt den Ersatz eines nicht essentiellen, chromosomal lokalisierten Gens durch ein lineares PCR-Fragment mittels homologer Rekombination ermöglicht. Dabei wird zunächst via PCR ein Fragment amplifiziert, das neben einer Antibiotikaresistenzkassette zwei Flipase-Recognition-Sites und zu dem zu deletierenden chromosomalen Gen komplementäre flankierende Enden besitzt. Über die auf dem Hilfsplasmid pKD46 kodierte Rekombinase wird das PCR-Fragment gegen das Zielgen ausgetauscht. Im folgenden Schritt wird die Antibiotikaresistenz mittels einer Flipase-Rekombinase, die auf dem Hilfsplasmid pCP20 kodiert ist und eine homologe Rekombination herbeiführt, ausgeschnitten. Die temperatursensitiven Hilfsplasmide können durch anschließende Inkubation bei 37°C entfernt werden (Datsenko und Wanner 2000).

Dieses Verfahren wurde in der Vorgängerarbeit zur Erstellung eines Balanced lethal Systems in *Salmonella Typhi* modifiziert. Der Verlust des essentiellen Gens *tyrS*, welches die Tyrosyl-tRNA-Synthetase kodiert, führt zum Absterben der Bakterien. Das Absterben kann folglich nur vermieden werden, wenn bei chromosomaler

Deletion des *tyrS*-Gens dieses gleichzeitig auf einem Plasmid komplementiert wird. Zuerst wurde das chromosomale *tyrS*-Gen durch eine von FRT-Sites begrenzte *tyrS*-Chloramphenicol-Kassette ersetzt. Auf dem Antigendeliveryplasmid pMO wurden das *tyrS*-Gen und eine von FRT-Sites flankierte Kanamycinresistenzkassette eingefügt. Im finalen Schritt wurden mittels homologer Rekombination durch die Flipase-Rekombinase sowohl die chromosomale *tyrS*-Cm-Kassette als auch die auf dem Plasmid gelegene Kanamycinresistenz herausgeschnitten. Dieses Konstrukt erreicht ohne Antibiotikaresistenzgene einhundert Prozent Plasmidstabilität. Zur weiteren Erhöhung der Sicherheit wurde eine IS2-ähnliche Insertionssequenz, welche die Rekombination homologer Sequenzen auf Chromosomen und Plasmiden erleichtert, aus dem Plasmid entfernt. In eine dort angelegte *SpeI* Schnittstelle wurde das essentielle Gen *tyrS* zusammen mit einem HisTag zur Vereinfachung der Detektion mittels Western Blot integriert (Diessner 2009).

Die notwendigen Modifikationen führten zur dramatischen Abnahme der Funktion des Sekretionssystems. Zur Verbesserung der Sekretionsleistung wurden Lage und Art des Promotors variiert, die *tyrS*-Expressionskassette in eine *Sall*-Site und der Promotor *lacI* in die *SpeI*-Site integriert (Gesser 2010).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Das Hauptziel meiner Arbeit bestand in der Charakterisierung zweier von Martin Gesser erstellter *Salmonella Typhi* Knockout-Stämmen, die als Vakzinkandidaten in Frage kamen. Die entscheidende Fragestellung war neben der Plasmidstabilität, dem Wachstumsverhalten und der genetischen Integrität vor allem, ob die Optimierungen am Sekretionssystem zur erwünschten Steigerung der Sekretionsleistung geführt haben. Andernfalls können gewonnene Daten zur weiteren Optimierung des Systems genutzt werden.

Da die Ergebnisse der Charakterisierungen Optimierungsspielraum aufzeigten arbeitete ich zudem an einer weiteren Version des Impfstammes, die den schwächeren *lacI*-Promotor in der *Sall*-Schnittstelle trägt, um die vermutete Toxizität des *tyrS*-Genproduktes zu reduzieren und damit die Sekretionsleistung zu verbessern.

Darüber hinaus begann ich mit der Übertragung des von Joachim Diessner erstellten Balanced Lethal Systems in *Salmonella Typhi* Ty21a auf *Salmonella Typhimurium* AroA SL 7207, um die Testung der verschiedenen Vakzinkandidaten im Mausmodell zu ermöglichen. Dazu etablierte ich den ersten Schritt der chromosomalen Deletion von *tyrS* in *Salmonella Typhimurium*.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	ScalTec
Blottingkammer	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- / 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 <sup>2</sup>	Schleicher und Schül
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 / 10 ml / 25 ml	Sarstedt

## 2.3 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Herkunft	Verwendungszweck
<i>Escherichia coli</i> DH5α Laborstamm	MSZ, Würzburg	Klonierungsarbeiten, Gewinnung von <i>tyrS</i> -Gen
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i> Ty 21a attenuierter Typhus-Impfstamm	Berna	Kontrollstamm
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i> Ty 21a + <i>pMO-CTX-PSA</i>	MSZ	Kontrollstamm
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i> Ty 21a mit <i>tyrS</i> - HisTag- <i>cat</i> -Kassette	MSZ	Kontrollstamm
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i> Ty 21a Δ <i>tyrS</i> + <i>pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS</i>	MSZ	Charakterisierung, Gewinnung lacI-Promotorfragment
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i> Ty 21a Δ <i>tyrS</i> + <i>pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>wT</sub>-TyrS</i>	MSZ	Charakterisierung
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> AroA SL 7207	MSZ	Ausgangsstamm für den chromosomalen Knockout

## 2.4 Plasmide

Plasmid	Charakteristik	Herkunft
pKD46	Ampicillin Resistenz ( $Amp^R$ ) rep (oriR 101, temperatursensitive Replikation) enthalt $\gamma$ , $\beta$ und $exo$ Gene für homologe Rekombination	Datsenko / Wanner 2000
pKD3 tyrS HisTag SpeI Klon 2	Chloramphenicol Resistenz ( $Cm^R$ ) $tyrS$ in Leserichtung des $cat$ -Gens HisTag-as FRT Sites	Diessner 2009
pMO-PSA-CTX	Kanamycin Resistenz ( $Kan^R$ ) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX	Fensterle <i>et al.</i> , 2009
pMO-PSA-CTX SpeI P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag	Kanamycin Resistenz ( $Kan^R$ ) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX	Gesser 2010
pMO-CTX-PSA Sall P <sub>WT</sub> TyrS HisTag	Kanamycin Resistenz ( $Kan^R$ ) Fusionsprotein Häm-PSA-CTX	Gesser 2010

## 2.5 Primer

Bezeichnung	Sequenz	Verwendungszweck
pdxHtyphimufor	5'-GTA-CCA-GCG-TAT-TGT- GTTGCT- CAA-GC-3'	Nachweis Integration TyrS-Cm-Kassette in S. typhimurium
pdxY-reverse2	5' – GGG ACT GGA TAG CGA GGA TAT TC – 3'	Nachweis Integration TyrS-Cm-Kassette in S. typhimurium, Nachweis & Sequenzierung des chromosomalen TyrS Knockouts
Knockout- forward	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'	Herstellung TyrS-HisTag-SpeI-Knockout-Fragment
Knockout-reverse	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'	Herstellung TyrS-HisTag-SpeI-Knockout-Fragment

pKD3-SpeI seq2-forward	5' – CCA GCT GAA CGG TCT GGT TAT AGG – 3'	Kontrolle Integrität pKD3-TyrS-HisTag-SpeI Klon 2, Nachweis Integration TyrS-Cm-Kassette in S. typhimurium
TyrS-reverse	5'-CTC-GTC-TGG-TTC-ACG- GTG-AAG-AAG-3'	Kontrolle Integrität pKD3-TyrS-HisTag-SpeI Klon 2, Nachweis Integration TyrS-Cm-Kassette in S. typhimurium
Is2-Del.seq1forward	5' – GCG TGG TGG CAT CAT GCT TTA TG – 3'	Nachweis pMO-PSA-CTX SpeI P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag, Plasmidstabilitätstest
TyrS seq 3 forward	5' – CAG ACA GGC GAA GTC ATA ACC – 3'	Nachweis pMO-PSA-CTX SpeI P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag
(pMO-)Sall-site forward	5'-GCT-CAA-CGG-CCT-CAA- CCTACT- ACT-G-3'	Nachweis pMO-CTX-PSA Sall P <sub>WT</sub> TyrS HisTag, Klonierung P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag EPK in Sall Schnittstelle, Sequenzierung der Klonierung P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag EPK in Sall Schnittstelle
(pMO-)Sall-site reverse	5'-GTC-ATA-AGT-GCG-GCG- ACGATA- GTC-ATG-3'	Klonierung P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag EPK in Sall Schnittstelle , Sequenzierung der Klonierung P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag EPK in Sall Schnittstelle
TyrS seq 2 forward	5' – CCA CCT GCT TAC GGA TTT TGT C – 3'	Nachweis pMO-CTX-PSA Sall P <sub>WT</sub> TyrS HisTag, Plasmidstabilitätstest
Kan-forward	5' – GTT CAT CCA TAG TTG CCT GAC TCC – 3'	Nachweis Ausschnitt Kanamycinresistenz
Kan-reverse	5' – CCT TTT TTG GTG TAG GCT GGA GCT G – 3'	Nachweis Ausschnitt Kanamycinresistenz
pdx forward 3	5' - CCA CAC TTG AGG TGG TGA GGT ATT TC – 3'	Nachweis & Sequenzierung des chromosomalen TyrS Knockouts
lacI prom forw	5'-AAA-AGT-CGA-CTA-GTG- CTA-GCG-ACA-CCA-TCG-AAT- GGC-3'	Klonierung P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag EPK in Sall Schnittstelle, Herstellung neuen Fragmentes aus Ursprungsplasmid pMO-PSA-CTX SpeI P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag
lacI term rev	5'-AAA-AAA-GTC-GAC-TAG- TGG-CAA-AAT-GCC-GCC-AGC- 3'	Klonierung P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag EPK in Sall Schnittstelle
lacI term rev.s	5'-AAA-AAA-GTC-GAC-TAG- TGG-TAC-CAA-AAT-GCC-GCC- AGC-3'	Klonierung P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag EPK in Sall Schnittstelle, Herstellung neuen Fragmentes aus Ursprungsplasmid pMO-PSA-CTX SpeI P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag
TyrS seq 4 forward	5' – CAC GAC TTT TCG CCA GAT GC – 3'	Nachweis Integration TyrS-Cm-Kassette in S. typhimurium
CM rev 2	5' – CCT ATA ACC AGA CCG	Nachweis Integration TyrS-Cm-Kassette in S.

	TTC AGC TGG – 3'	typhimurium
TyrS seq 1 forward	5' – GAG TCA CCT GCT CCG CCA GTA C – 3'	Sequenzierung der Klonierung P <sub>lacI</sub> TyrS HisTag EPK in SalI Schnittstelle

## 2.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
Pfu-Polymerase	Stratagene
Taq-Polymerase	NEB, Genecraft
Phusion-Polymerase	Finnzymes
T4-Ligase	MBI Fermentas
DpnI	Fermentas
CIAP	Fermentas
SalI-Endonuklease	Fermentas

## 2.7 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti- <i>HisTag</i> -AK Anti-Rabbit (1:1000 in 5% Magermilchlösung)	New England Biolabs
Anti- <i>HämolysinA</i> -AK Anti-Rabbit (1:1000 in 5% Magermilchlösung)	Immuno Globe
Anti- <i>PSA</i> -AK Polyclonal Rabbit Anti-Human(1:1000 in 5% Magermilchlösung)	Dako Cytomation
Anti- <i>TolC</i> -AK (1:1000 in 5% Magermilchlösung)	(Spreng, Dietrich et al. 1999)
Anti- <i>Mouse</i> -IgG, HRP-linked AK (1:1000 in 5% Magermilchlösung)	Amersham
Anti- <i>Rabbit</i> -IgG, HRP-linked AK (1:1000 in 5% Magermilchlösung)	Amersham

## 2.8 Kulturmedien

BHI-Medium	37 g Brain-Heart-Infusion Ad 11 H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>
LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Select-Peptone 140 5 g Yeast Extract Difco

	10 g Natriumchlorid Ad 11 H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>
2YT-Medium	16 g Select-Peptide 140 10 g Yeast Extract Difco 10 g Natriumchlorid Ad 11 H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>
TSA-Medium	2,5 g BBL Phytone-Peptide 12,5 g Yeast Extract Difco 5 g Natriumchlorid Ad 11 H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>

Zur Herstellung von Agarplatten wurden den Flüssigmedien je 12 g Agar zugegeben. Alle Medien wurden 20 min lang bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden die Agarmedien in Plastikschaalen gegossen.

## 2.9 Antibiotika

Diese wurden sterilfiltriert, bei -20°C gelagert und, falls benötigt, den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Aufgrund der Hitzeempfindlichkeit der Antibiotika ist dabei eine ausreichend lange Abkühlung der Medien nach dem Autoklavieren erforderlich.

Antibiotikum	Konzentration im Medium	Konzentration Stock-Lösung
Kanamycin	25 µg/ml	25 mg/ml
Chloramphenicol	5/7/8/10/20 µg/ml	20 mg/ml
Ampicillin	100 µg/ml	100 mg/ml

## 2.10 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 40%	Biorad
Agarose	Applichem
AgarAgar	Applichem
Ampicillin	Sigma

Brain Heart Infusion Medium	Difco
Chloramphenicol	Sigma
Desoxynukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DNA-Ladder 1kb	Invitrogen
DNA-Ladder GeneRuler 1kb	Fermentas
DNA Ladepuffer	Applichem
ECL <sup>†</sup> M Western Blotting Detection Reagents	Amersham
Ethanol	Applichem
Ethanol zur Analyse	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Glycerol	Sigma
Kanamycin	Sigma
LB Broth Base Medium	Sigma
Magermilchpulver	AppliChem
Mercaptoethanol	Sigma
Natriumchlorid	AppliChem
PBS	AppliChem
Ponceau S	Sigma
Protein Ladder BenchMark Prestained	Invitrogen
SDS	Roth
Tango-Puffer mit BSA	Fermentas
TBE-Puffer	AppliChem
Tween-20	Sigma

## 2.11 Kits

Kit	Hersteller
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
SPIN Miniprep Kit	QIAGEN
Plasmid Midi Kit	QIAGEN
DNEasy Tissue Kit	QIAGEN

## 2.12 Größenmarker

Ladder	Hersteller
--------	------------

GeneRuler 1kb DNA-Ladder	Fermentas
1 kb DNA-Ladder	Invitrogen
BenchMark Prestained Protein Ladder	Invitrogen

## **3 Methoden**

### **3.1 Arbeiten mit Bakterien**

#### **3.1.1 Sterilisation der Medien und Geräte**

Die Arbeiten fanden unter einer Sterilbank statt. Verwendete Materialien wurden, falls autoklavierbar, bei 121°C 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert. Daneben wurde steriles Einwegmaterial verwendet. Arbeitsflächen sowie Geräte, wurden, soweit möglich und notwendig, mit Bacillol desinfiziert. Um selektive Kulturplatten und Kulturmedien zu erstellen wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen das jeweils passende Antibiotikum zugegeben, bei Agarplatten nach Unterschreiten von 50°C vor dem Gießen, bei Kulturmedien bei Raumtemperatur. Eine frühere Applikation würde die hitzelabilen Antibiotika unbrauchbar machen.

#### **3.1.2 Kultivierung von Bakterienstämmen in Flüssigmedien**

Als Kulturmedien wurden LB, BHI, 2 fach konzentriertes YT und TSA verwendet. Zur Herstellung einer Übernacht-Flüssigkultur wurde mit einer sterilen Impföse eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte in ein steriles Flüssigmedium überführt. Bei vorhandenem Antibiotikaresistenzgen wurde dem Flüssigmedium das passende Antibiotikum zugesetzt. Inkubationsdauer und –Temperatur variierten nach Bedarf. Das Wachstum erfolgte in einem Schüttler bei 180 rpm und wurde durch Probenentnahmen zur Messung der optischen Dichte bis zum gewünschten Punkt verfolgt.

#### **3.1.3 Kultivierung von Bakterienstämmen auf Kulturplatten**

Die Anfertigung von Verdünnungsreihen, Einzelausstrichen und das gezielte Picken von Bakterienkolonien erfordern das Züchten von Bakterien auf Kultur-Agarplatten. Als Grundlage dienten Agarplatten mit LB- und BHI-Medien. Falls ein Antibiotikaselektionsdruck erforderlich war, wurden den Agarplatten bei der Herstellung entsprechende Antibiotika zugesetzt. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte bei je nach Bedarf variierender Temperatur und Dauer.

#### **3.1.4 Herstellung von Glycerinstocks**

Eine frisch ausgestrichene Bakterienkolonie diente als Grundlage für eine Übernachtkultur. Aus dieser wurden am nächsten Tag 700 µl Bakterienkultur entnommen, mit einer Glycerinlösung gemischt und in einem sterilen Gefäß bei -80°C eingefroren. Das Mischungsverhältnis betrug ein Teil sterile 80%

Glycerinlösung (da 100% schwierig exakt zu pipettieren sind) zu zwei Teilen  
Übernachtskultur.

### 3.1.5 Erzeugung elektrokompetenter Zellen

Zur Aufnahme von freien DNA-Fragmenten oder Plasmiden durch Elektroporation werden elektrokompetente Zellen benötigt. Das Herstellungsverfahren wurde sowohl zur Gewinnung elektrokompetenter *E. coli* als auch elektrokompetenter *Salmonella*-Stämme angewandt.

Die Anzucht der Bakterienzellen erfolgte aus einer frischen Übernachtskultur. Ein LB-Medium wurde im Verhältnis 1:50 mit dieser angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 kultiviert. Um die Bakterien in der Wachstumsphase zu halten wurde die Kultur 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 rpm 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml eiskalter 10% Glycerinlösung resuspendiert und mit weiterer Glycerinlösung auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm für 20 Minuten. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, wobei das Pellet bei der ersten Wiederholung in 25 ml 10% eiskaltem Glycerin, bei der zweiten in 10 ml 10% resuspendiert wurde. Die gewaschenen Pellets der elektrokompetenten Zellen wurden letztendlich in ca. 0,5 ml 10% Glycerinlösung/50 ml Kultur resuspendiert und als 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert bis sie zur Elektroporation benötigt wurden.

## 3.2 Molekulargenetische Arbeiten

### 3.2.1 Aufreinigung von DNA

#### 3.2.1.1 aus dem PCR-Ansatz

Nach erfolgter Polymerasekettenreaktion liegen die amplifizierten DNA-Fragmente nicht rein vor, sondern gemeinsam mit Störfaktoren wie Enzymen und Salzen. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das *Spin PCR Purification Kit* von Qiagen verwendet. Dieses bindet DNA-Fragmente in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, die der Puffer PB liefert, an eine spezielle Silikatmembran. Verunreinigungen wie Enzyme, Oligonukleotide und Primer adsorbieren nicht an der Membran und können durch Zentrifugation entfernt werden. In der Silikatmembran vorhandene Salze werden mittels ethanolhaltigem PE-Puffers gewaschen. Die aufgereinigte DNA wird mit EB-Puffer oder zweifach destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O bzw. Millipore Wasser)

in je nach gewünschter Konzentration wechselnder Menge eluiert. Abweichend vom gegebenen Protokoll wurde die Säule mit dem EB-Puffer respektive ddH<sub>2</sub>O vor der Elution 10 min bei 50°C inkubiert.

Zunächst wurden die DNA-Bindebedingungen eingestellt, indem ein Teil PCR-Produkt mit 5 Teilen PB-Puffer gemischt wurde, in aller Regel 100 µl PCR-Produkt mit 500 µl PB-Puffer. Zur DNA-Adsorption wurde das Gemisch in die QIAquick spin Säule übertragen und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Silikatmembran wurde mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Der Restethanol wurde durch erneute Zentrifugation der Säule für 1 min bei 14000 rpm entfernt. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule in ein neues 1,5 ml Cap gestellt. Zur DNA-Eluierung wurde in die Mitte der Säulenmembran 15 bis 50 µl EB-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O pipettiert und die Säule für 10 min bei 50°C inkubiert. Nach einer weiteren Minute Zentrifugation bei 14000 rpm lag die reine DNA im Durchfluss vor.

### *3.2.1.2 aus der Gelelektrophorese*

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Gleich große Fragmente liegen anschließend in Banden zusammen. Diese werden zur Gewinnung der reinen DNA aus dem Gel isoliert und aufgereinigt.

Es wurde das Verfahren *QIAquick Gel Extraction Kit* von *Qiagen* verwendet. Dessen Prinzip gleicht dem der Aufreinigung von PCR-Ansätzen.

Die Bande des DNA-Fragments das der Zielgröße entspricht wurde aus dem Gelelektrophoresegel ausgeschnitten. Dann wurden die DNA-Bindebedingungen durch Zugabe des dreifachen Gelgewichts an QG-Puffer und Inkubation des Gemisches bei 50°C für 10 min unter gelegentlichem Vortexen bis zur vollständigen Gelauflösung und Gelbfärbung der Lösung eingestellt. Zur DNA-Adsorption wurde das Gemisch in eine QIAquick spin Säule pipettiert und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Reste der Agarose wurden durch Zugabe von 0,5 ml QG-Puffer und Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm entfernt. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Silikatmembran wurde mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert. Zur Entfernung des Restethanols wurde die Säule 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues 1,5 ml Cap gestellt. Die DNA wurde eluiert in dem 15 bis 50 µl EB-Puffer

oder ddH<sub>2</sub>O in die Mitte der Säulenmembran pipettiert und die Säule für 10 min bei 50°C inkubiert wurde. Eine anschließende einminütige Zentrifugation bei 14000 rpm lieferte die gereinigte DNA im Durchfluss.

### 3.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

#### 3.2.2.1 via Miniprep

Um reine, isolierte Plasmid-DNA zu gewinnen wurde in dieser Arbeit je nach benötigter Menge auf standardisierte Verfahren mittels Kits der Firma QIAGEN zurückgegriffen. Für kleinere Mengen bietet diese das verwendete *QIAprep spin Miniprep Kit* an. Mit diesem lassen sich bis zu 20 µg Plasmid-DNA pro verwendete Säule isolieren.

Das Verfahren basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly, die die zirkulären Plasmide unbeschädigt lässt in dem die hochmolekulare chromosomale DNA selektiv denaturiert wird. Die Plasmide werden anschließend auf Silicat-Gel gebunden. Das folgende Waschverfahren entfernt Verunreinigungen des Lysats, wie Proteine, RNA oder Zellbestandteile. Zuletzt wird die membrangebundene Plasmid-DNA eluiert und in EB-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O ankonzentriert.

Zunächst wurde in LB-Medium eine Bakterienübernachtskultur angezchtet. Ist ein Resistenzgen vorhanden wurde antibiotischer Selektionsdruck ausgeübt. Zur Bakterienkonzentration wurden 4-6 ml der Übernachtskultur bei 14000 rpm eine Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl P1-Puffer resuspendiert, anschließend 250 µl P2-Puffer zugegeben. Die Puffer führen zur alkalischen Bakterienlyse. Nach 4 Minuten wurde durch Zugaben von 350 µl N3-Puffer unter Schütteln das Lysat neutralisiert. Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm führte zur Pelletbildung der denaturierten chromosomalen DNA und der Zellrestbestandteile. Der Überstand mit enthaltener Plasmid-DNA wurde auf eine QIAprep Spin Miniprep Säule pipettiert und eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA band an die Säulenmembran, der Durchfluss wurde verworfen. Zur Ankonzentration können mehrere Bakterienlysate auf einer Säule gebunden werden. Die Membran wurde mit 0,5 ml PB-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert, was vorhandene Nukleasen inaktiviert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Membran wurde anschließend mit 0,75 ml PE-Puffer versetzt und zentrifugiert, der Durchfluss wurde

verworfen. Eine weitere Zentrifugation entfernt Überreste an Puffer und Ethanol. Die adsorbierte Plasmid-DNA wurde mit 15-50 µl EB-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O, je nach gewünschter Konzentration, aus der Membran eluiert. Die Säule wurde zur Verbesserung der Elution für 10 min bei 50°C inkubiert. Zuletzt wurde die Säule 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss enthält die gelöste Plasmid-DNA. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **3.2.2.2 via Midiprep**

Das verwendete Standardverfahren QIAGEN *Plasmid Purification Midi Kit* ermöglicht die Gewinnung von bis zu 100 µg Plasmid DNA pro Säule.

Zunächst wurde in 150 ml LB-Medium eine Bakterienübernachtkultur angezchtet. War ein Resistenzgen vorhanden wurde antibiotischer Selektionsdruck ausgeübt. Zur Bakterienkonzentration wurde die Übernachtkultur bei 4000 rpm und 4°C 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 4 ml P1-Puffer resuspendiert, anschließend 4 ml P2-Puffer zugegeben. Nach 5 Minuten wurde durch Zugabe von 4 ml P3-Puffer unter Schütteln und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur das Lysat neutralisiert. Das Gemisch wurde filtriert, wobei die denaturierte chromosomale DNA und die Zellrestbestandteile im Filter verbleiben. Auf die Säule QIAGEN-tip100 wurde 10 ml QBT-Puffer pipettiert und dessen völliges Durchsickern abgewartet. Der Filtrationsdurchfluss wurde auf die Säule aufgebracht, die die Plasmid-DNA bindet. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Die adsorbierte Plasmid-DNA wurde mit 5 ml QF-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O aus der Membran eluiert, der Durchfluss in sterilen Greiner-Röhrchen aufgefangen. Diesen wurde 3,5 ml Isopropanol zugegeben. Die Zentrifugation für 60 min bei 4000 rpm und 4°C führte zur Präzipitation der DNA, die eine gläserne Ablagerung am Boden des Röhrchens bildete. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Das Pellet wurde mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen und für 60 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Nach 10 Minuten Lufttrocknung wurden die Pellets in EB-Puffer oder 10 mM Tris-HCl gelöst, wobei sich das Lösungsvolumen nach der benötigten DNA-Konzentration richtete. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **3.2.3 Isolation von genomischer DNA aus Bakterien**

Um chromosomale DNA aus Bakterien zu gewinnen wurde auf das *DNEasy Tissue Kit* der Firma QIAGEN zurückgegriffen. Das Verfahren basiert auf Lyse der Bakterien

mittels chaotroper Salze, einem Verdau der Proteine durch Proteinkinase K und darauffolgender selektiver Bindung der frei gewordenen DNA auf einer Matrix.

Zunächst wurde in LB-Medium eine Bakterienübernachtskultur angezchtet. War ein Resistenzgen vorhanden wurde antibiotischer Selektionsdruck ausgeübt. Zur Bakterienkonzentration wurden 5 ml der Übernachtskultur bei 14000 rpm eine Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 180 µl ATL-Puffer resuspendiert, das Gemisch anschließend mit 20 µl Proteinkinase K versetzt und mindestens 3 Stunden bei 55°C inkubiert um die Bakterien zu lysieren. Zur Vorbereitung der DNA-Adsorption wurde das Lysat mit 200 µl AL-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nun wurden 200 µl Ethanol zugemischt und das Produkt auf die DNEasy Mini spin-Säule aufgebracht. Diese wurde 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und anschließend nacheinander mit je 500 µl AW1 und AW2-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur Elution der DNA wurde AE-Puffer in der gewünschten Konzentration entsprechender Menge aufpipettiert und die Säule 10 min bei 50°C inkubiert. Durch abschließende Zentrifugation mit 8000 rpm wurde die im Puffer gelöste genomische DNA in einem Eppendorf-Cap aufgefangen und bei 4°C gelagert.

### 3.2.4 Polymerasekettenreaktion

#### 3.2.4.1 Prinzipien

Die Polymerasekettenreaktion wurde erstmals 1983 durch Kary Banks Mullis beschrieben. Als sehr sensitive und robuste Methode zur Amplifizierung von DNA gewann sie schnell an Verbreitung und gehört heute zu den absoluten Standardverfahren. Es ist in der Lage aus einem geschlossenen DNA-Strang nach  $n$  Zyklen  $2^n$  Kopien des Ausgangsstranges herzustellen. Für die Replikation ist die thermostabile Taq-DNA-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde, verantwortlich. Ihr Nachteil liegt in einer gelegentlich fehlerhaften Kopie der DNA-Sequenzen. Deshalb wird für eine sequenzexakte DNA-Amplifikation gerne die Pfu-Polymerase eingesetzt, die aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* stammt und eine proof-reading-Funktion besitzt. Diese wurde durch Fusion mit einer zusätzlichen Bindedomäne für doppelsträngige DNA zur noch schnelleren und um den Faktor 6 genaueren Phusion-Taq weiterentwickelt.

Ein Reaktionszyklus benötigt folgende Bestandteile: Das zu vervielfältigende Template, Oligonukleotidprimer, Desoxynukleosidtriphosphate und eine thermostabile DNA-Polymerase. Zum Erreichen entsprechender Produktmengen wird dieser Zyklus innerhalb eines Thermocyclers 20- bis 40-mal durchlaufen. Dieser bringt den Ansatz immer exakt auf die für einzelne Reaktionsschritte (Denaturierung, Annealing und Elongation) passenden Temperaturen.

Zur **Denaturierung** wird die doppelsträngige DNA auf 94 bis 98°C erhitzt. Das führt zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen, so dass die DNA in Einzelstrangform vorliegt.

Beim **Annealing** wird die Temperatur auf etwa 48 bis 65°C reduziert, damit die Primer an ihre komplementäre Bindungsstelle am DNA-Strang anlagern können. Die Temperatur sollte knapp unterhalb der Schmelztemperatur der Primer liegen, um eine möglichst spezifische Bindung herbeizuführen.

Die anschließende **Elongation** benötigt Temperaturen zwischen 60 und 72°C, bei denen die DNA-Polymerasen optimal arbeiten. Sie lagern sich an die gebundenen Primer an und komplementieren den DNA-Einzelstrang mit Hilfe der im Ansatz befindlichen Nukleotidtriphosphate. Die Dauer dieses Schrittes ist abhängig von der Anzahl an Basenpaaren des gewünschten Produkts und der verwendeten Polymerase. Die Taq-Polymerase schafft etwa 1000 Basenpaare pro Minute, die Pfu deren 500, die Phusion-Taq 4000.

Nach Beendigung der Reaktionszyklen folgt eine Inkubationsphase von 10 Minuten, in welcher die Polymerase nicht vollständig synthetisierte DNA-Stränge komplettieren kann.

Das Produkt wird bei 4°C bzw. -20°C aufbewahrt.

#### ***3.2.4.2 Gewinnung eines Bakterienschnelllysats***

Ein Schnelllysats liefert auf einfache Weise aus Bakterien sowohl genomische als auch Plasmid-DNA für PCR-Ansätze.

Zur Bakteriengewinnung wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie von einer Agarplatte gepickt und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Zerstörung der Bakterienmembran wurde durch die hypotonen Bedingungen sowie durch Inkubation der Suspension für 5 min bei 100°C und Abkühlung auf Eis erreicht. Die für ein Schnellscreeningverfahren via PCR einsetzbare DNA befand sich nach zweiminütiger Zentrifugation bei 14000 rpm im Überstand. Der Zelldetritus sammelte

sich am Boden, der Überstand wurde nach erneuter zweiminütiger Inkubation auf Eis abgenommen und im PCR-Ansatz eingesetzt oder bei -20°C zur späteren Verwendung weggefroren.

### **3.2.4.3 Klonierungs PCR**

Eine Klonierungs PCR liefert in Form eines selektiv amplifizierten DNA-Fragments das Ausgangsmaterial zur Integration desselben in einen Vektor, z.B. ein Plasmid. Da eine exakte Sequenz gewünscht ist, wurden in aller Regel die Pfu- oder Phusion Taq- Polymerase verwendet, da diese eine „proof-reading“ Aktivität besitzen.

Ansatz für eine Klonierungs-PCR mit Phusion-Polymerase:

20 µl	5x Puffer Phusion
1 µl	20 mM dNTPs-Mix
0,5 µl	Phusion-Polymerase
1 µl	Primer 1
1 µl	Primer 2
74,5 µl	dd H <sub>2</sub> O („Millipore-Wasser“)
2 µl	Template

Ablauf des Programms im Thermocycler:

95°C 5 min Denaturierung	}	x Zyklen
95°C 1 min Denaturierung		
50°C 1 min Annealing		
72°C x min Elongation		
72°C 10 min Vervollständigung		
4°C ∞ min Lagerung		

### **3.2.4.5 Screening PCR**

Zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung muss die DNA der zugehörigen Bakterienkolonien mittels Screening PCR überprüft werden.

Eine zu untersuchende Kolonie wurde zur Sicherung auf einer neuen, eindeutig gekennzeichneten Agarplatte ausgestrichen. Dann wurde ein Schnelllysat der Kolonie für die PCR erzeugt. Zur Sichtung größerer Mengen an Kolonien wurden 5 bis 10 Kolonien in einem Schnelllysat kumuliert und bei positivem Ergebnis einzeln überprüft.

Ansatz für eine Screening-PCR (Menge pro Probe):

1 µl	10x Puffer Biotherm GeneCraft
0,2 µl	20 mM dNTPs-Mix
0,1 µl	Taq-Polymerase Biotherm 5 U/ µl
0,2 µl	Primer 1
0,2 µl	Primer 2
16,3 µl	dd H <sub>2</sub> O
4 µl	Schnelllysatüberstand

### 3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Gelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Verfahren zur spezifischen Auftrennung von DNA oder Proteinen. Die – im Gegensatz zu Proteinen – relativ pH-Wert-unabhängige, hauptsächlich durch die zahlreichen negativen Zucker-Phosphatgruppen determinierte Ladung des DNA-Stranges ermöglicht eine Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Basis ihrer Größe. Mit Hilfe standardisierter Größenmarker kann die Länge der Nukleinsäuresequenz abgeschätzt werden.

Die Basis der DNA-Auftrennung bildet eine Gelmatrix, die wie ein Molekularsieb funktioniert. Ein anliegendes elektrisches Feld zieht die negativ geladene DNA zur Anode. Kleine DNA-Fragmente wandern schneller durch das Gel als große, die durch das engmaschige Gel mehr behindert werden. Mehrere Parameter beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente, namentlich deren Größe, die angelegte Spannung, die Agarosekonzentration der Gelmatrix, die Wahl des Laufpuffers, dessen Salzkonzentration und die Interkalation mit Farbstoffen.

Die Herstellung geeigneter Gele wurde nach folgendem Verfahren durchgeführt.

Zunächst wurde TBE-Puffer im gewünschten Verhältnis mit Agarose gemischt, beispielsweise 200 ml TBE mit 2 g Agarose. Die Agarosemenge wurde der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente angepasst. Bei kleinen Fragmenten wurde mehr Agarose zugesetzt, um einen dichteren Molekularsieb zu erhalten.

Das Gemisch wurde für so lange in der Mikrowelle gekocht bis keine Schlieren mehr zu sehen waren, üblicherweise 2 bis 3 min. Unter ständigem Rühren mit dem Rührfisch wurde die Lösung auf 60°C abgekühlt. Nun wurde im Verhältnis 1 µl zu 10 ml Ethidiumbromidlösung beigemischt. Diese lagert sich in die Nukleinsäuresequenz ein und kann unter UV-Licht (254-366 nm) zur Emission von orange-rotem Licht (590

nm) angeregt werden. Das noch flüssige Gel wurde in Schlitten gegossen und Kämme zur Freihaltung der Geltaschen eingesetzt. Die Abkühlung ließ das Gel fest werden, so dass es als Gelplatte aus dem Schlitten entnommen und im Kühlschrank gelagert werden konnte.

Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden diese mit 10-fachem Ladepuffer im Verhältnis 1/10 Puffer, 9/10 Probenansatz gemischt. Diesem ist ein sichtbarer Farbmarker beigemischt, der den Fortschritt der gelelektrophoretischen Auftrennung visualisiert. Hauptfunktion des Ladepuffers ist es für ein Absinken des Puffer-Probengemisches in der Tasche zu sorgen. Neben den Proben wurde auch ein Massenstandard (Ladder) aufgetragen, um eine Größenabschätzung der getrennten DNA-Fragmente zu ermöglichen.

In einer Elektrophoresekammer wurde das beladene Gel 30 bis 60 Minuten einer Spannung von 160 bis 200 Volt ausgesetzt. Dabei müssen die Geltaschen auf der Kathodenseite der Kammer liegen und das Gel vollständig mit Puffer bedeckt sein. Ist die Farbfront des Ladepuffers die gesamte Strecke gewandert kann die Elektrophorese beendet werden. Unter einer UV-Lampe sind die gewanderten DNA-Fragmente sichtbar.

### 3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe einer DNA-Ligation können geeignete Nukleotidsequenzen in einen Vektor wie z.B. ein Plasmid integriert und somit biologisch nutzbar gemacht werden. Die namensgebende Ligase, ein Produkt virusinfizierter *Escherichia coli*-Bakterien, katalysiert die Verbindung der 3'- und 5'-Enden der beteiligten DNA. Ein Plasmid wird zuvor durch Restriktionsenzyme geschnitten und damit linearisiert. Um eine Religation des geschnittenen Vektors zu verhindern wurde dieser mit dem Enzym Ciap (calf intestine alkaline phosphatase) behandelt, welches dessen 5'-Phosphatgruppe abspaltet.

Im Ligationsansatz sollte das Verhältnis der Molekulargewichte von Vektor und Fragment 1:3-5 betragen. Er wurde für 16 h bei 16°C inkubiert, anschließend zur Inaktivierung der Ligase für 15 min auf 65°C erhitzt. Das Produkt konnte in elektrokompente Zellen elektroporiert oder bei -20°C gelagert werden.

Ansatz für eine Ligation:

1 µl	T4 DNA Ligase
2 µl	Ligase Puffer
x µl	Vektor-DNA
y µl	Fragment-DNA
ad 20 µl	dd H <sub>2</sub> O

### 3.2.7 Restriktionsverdau von DNA-Sequenzen

Mit Hilfe der ursprünglich bakteriellen Restriktionsendonukleasen kann die DNA-Doppelhelix an definierten Nukleotidsequenzen geschnitten und zu neuen Konstrukten zusammengesetzt werden. Dabei entstehen „sticky ends“ mit 5' / 3' Überhängen oder „blunt ends“ ohne Überhänge. Restriktionsenzyme erkennen punktspiegelnde Sequenzen, sogenannte Palindrome. In Molekularbiologie und Gentechnik werden Enzyme vom Typ II eingesetzt, welche die DNA innerhalb der Erkennungssequenz spalten, keine Methylierungsfunktion haben und kein ATP benötigen.

Die Restriktionsansätze wurden je nach Star-Aktivität des Enzyms bei 37°C für bis zu 16 h inkubiert. Zur Sicherung optimaler Ergebnisse wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet.

### 3.2.8 Elektroporation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Die Veränderung der Eigenschaften einer Zelle durch Einbringen fremder DNA wird Transformation genannt. Die Elektroporation bietet auf Basis elektrokompetenter Zellen eine hohe Transformationsrate. Diese Zellen werden von Verunreinigungen befreit und mittels eines Kondensators kurzzeitig einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Zellmembran wird dabei für Sekundenbruchteile permeabel und ermöglicht die erwünschte Aufnahme von DNA-Fragmenten und Plasmiden. Um eine bei der Herstellung erfolgte Kontamination elektrokompetenter Zellen zu erkennen ist bei jeder frischen Charge eine Negativkontrolle durchzuführen, bei der die Bakterien ohne Transformations-DNA elektroporiert werden.

Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 100 µl davon für 45 Sekunden mit 1-10 µl DNA inkubiert, anschließend in eiskalte Elektroporationsküvetten pipettiert. Diese wurden im Elektroporator einer Spannung von 1,8 kV ausgesetzt. Die dabei gemessene Pulsdauer sollte 4 ms nicht unterschreiten. Nach dem Puls wurden die Bakterien sofort mit 1 ml nährstoffreichem BHI-Medium versetzt. Es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank, bei der sich unter adäquater

Temperatur eine in der elektroporierten DNA enthaltene Antibiotikaresistenz ausbilden kann. Deren Dauer war abhängig vom verwendeten Antibiotikum, wobei für Kanamycin, Ampicillin und Chloramphenicol eine Stunde ausreichen. Danach wurden die Zellen auf Agarplatten ausplattiert, die zur Selektion passende Antibiotika enthalten. Zuletzt wurden die Platten im Brutschrank bei variierender Dauer und Temperatur inkubiert.

### **3.2.9 Photometrische Messungen**

#### **3.2.9.1 der DNA-Konzentration**

Bei der Ermittlung der DNA-Konzentration wird die Absorption der Probe mittels UV-Spektralphotometrie gegen einen Leerwert gemessen. Das Lambert-Beer'sche Gesetz ermöglicht gemäß der Formel  $E = \epsilon \cdot c \cdot d$  den Rückschluss von der Extinktion auf die Konzentration an DNA. Dabei steht  $\epsilon$  für den Extinktionskoeffizienten in  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1} = \text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ,  $c$  für die Konzentration und  $d$  für den Lichtweg.

Es wurden 2  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung mit 98  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gemischt und das Absorptionsverhalten bei 260 und 280 nm gemessen. Mit der Absorption bei 260 nm erhält man die DNA-Konzentration, durch das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280 nm kann die Reinheit der DNA bestimmt werden. Ein OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Quotient von 2,0 entspricht reiner RNA, 1,8 reiner DNA. Ein niedrigerer Quotient lässt auf eine Proteinverunreinigung schließen.

#### **3.2.9.2 der Bakterienkulturdichte**

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde bei 600 nm Wellenlänge gemessen. Das Absorptionsverhältnis von 1 ml Bakterienkultur wurde gegen unbewachsenes Nährmedium gemessen.

### **3.2.10 Sequenzierung von DNA-Abschnitten**

Klonierungen und chromosomale Integrationen, die in der Screening PCR positive Ergebnisse zeigten, wurden per Sequenzierung auf die gewünschte DNA-Modifikation überprüft. Die Sequenzierungsreaktionen wurden im MSZ Würzburg durchgeführt und ermöglichten das Ablesen von 400 bis 700 Basenpaaren, welche mit bekannten Sequenzen auf die durchgeführten Modifikationen überprüft wurden.

Sequenzierungsansatz:

1 µg DNA (entspricht z.B. 10 µl DNA-Ansatz der Konzentration 100 ng/ µl)

1 µl Sequenzierungsprimer (Konzentration 10 pmol/ µl)

ad 14 µl ddH<sub>2</sub>O

### 3.3 Proteinanalytische Methoden

#### 3.3.1 Proteinisolierung aus dem Bakterienpellet

Zur quantitativen Analyse der Proteinbildung einer Zelle mittels Western Blot müssen die Proteinprodukte aus dem Zellpellet isoliert werden. Als Basis dienen sowohl eine Übernachtskultur als auch Kulturen verschiedener definierter optischer Wachstumsdichte.

Aus der Kultur wurden 2 ml abgenommen und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 150 µl 5x Lämmli Puffer resuspendiert und nachfolgend 5 min bei 110°C gekocht, was zur Denaturierung der Proteine führte. Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm führte zur Pelletierung des Zelldetritus während die Proteinprodukte der Zelle im Überstand verblieben. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 3.3.2 Proteinisolierung aus dem Bakterienüberstand

Zur quantitativen Analyse der Proteinsekretion einer Zelle mittels Western Blot müssen die Proteinprodukte aus dem Zellüberstand isoliert werden. Als Basis dienen sowohl eine Übernachtskultur als auch Kulturen verschiedener definierter optischer Wachstumsdichte.

Aus der Kultur wurden 25 ml abgenommen und für 1 h bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. 20 ml des Überstandes wurden abgenommen, mit 2 ml 100% TCA (Trichloressigsäure) versetzt und für 16h auf Eis im Kühlraum inkubiert. Danach wurde das Gemisch erneut 1h bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml Aceton versetzt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde den Proteinen 200 µl 5x Lämmli Puffer zugegeben. Sobald sich das Gemisch gelb färbte wurde es mit 5 µl Tris HCl Lösung versetzt und färbte sich erneut blau. Die Proteinproben wurden 5 min bei 100°C gekocht und bei -20°C gelagert.

### 3.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese ermöglicht die gröÙenspezifische Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel. Anschließend können die Proteine mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

Die nichtkovalenten Bindungen der im Lämmli-Puffer gelösten Proteinprodukte wurden durch den vorangegangenen Kochvorgang und das im Puffer enthaltene anionische Tensid SDS gelöst. Disulfidbrücken werden durch den Pufferbestandteil  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgebrochen. Die starke negative Ladung des gebundenen SDS maskiert die Eigenladung der Proteine und führt zu einer rein gröÙenabhängigen Auftrennung der denaturierten Proteine. Deren Molekulargewicht kann mittels Markern wie der BenchMark Prestained Protein Ladder von Invitrogen bestimmt werden.

Basis der Elektrophorese war eine mit 1% SDS Puffer gefüllte Laufkammer.

Zwischen zwei vertikal eingespannte Glasscheiben wurde das Gel gegossen. Beim Auftrennungsvorgang durchliefen die Proteinproben zur Aufkonzentrierung zunächst ein vierprozentiges Sammelgel, um anschließend in einem zehnprozentigen Laufgel nach ihrer Größe aufgetrennt zu werden. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
H <sub>2</sub> O	12,1 ml	7,55 ml
Acrylamid / Bisacrylamid 40%	5 ml	1,1 ml
20% SDS	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l
3 M Tris pH 9	2,5 ml	
1 M Tris pH 6,8		1,25 ml
APS	200 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Die Geltaschen wurden mit 20  $\mu$ l Proteinproben beladen. Danach wurde eine Spannung von 120 V angelegt bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront den unteren Rand des Gels erreichte. Eine Darstellung der aufgetrennten Proteine war unspezifisch mittels Coomassie-Färbung oder immunologisch mittels Western Blot möglich.

### 3.3.4 Western Blot

Das Western Blot Verfahren ermöglicht die Proteinübertragung vom Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran. In dieser Arbeit wurden die Proteine mittels elektrischen Feldes in einem halbtrockenen Blot-System auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf dieser können Proteinbanden immunologisch identifiziert werden.

Zunächst wurde das Polyacrylamidgel durch 30 minütige Inkubation in Towbin Puffer von SDS Puffer gereinigt. Whatman-Paper und Nitrozellulosemembran wurden in Towbin-Puffer getränkt. Anschließend wurde das Blot-System im Sandwich-Stil zwischen Anoden- und Kathodenplatte zusammengebaut. Auf 2 Lagen Whatman-Paper folgte das Gel, die Nitrozellulosemembran und erneut 2 Lagen Whatman-Paper. Eingeschlossene Luftblasen mussten ausgestrichen werden, da sie sonst den Blottingvorgang an dieser Stelle verhinderten. Es wurde eine Spannung von 25 V für 40 bis 75 min angelegt. Nach dem Blotvorgang wurde die Nitrozellulosemembran zur Blockade freier Membranbildungsstellen für 60 min mit 5 % Magermilchpulver in PBS geblockt. Über Nacht wurde die Membran bei 4 °C mit dem ersten Antikörper, der gegen jeweils ein bestimmtes Protein gerichtet war, inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 30 min auf dem Schüttler mit jeweils frischem PBS-Tween gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurde die Membran für 120 min mit dem Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper, der an den F<sub>c</sub>-Teil des ersten Antikörpers bindet und die Röntgendetektion ermöglicht, inkubiert. Es schlossen sich drei weitere dreißigminütige Waschvorgänge mit PBS-Tween an. Von ungebundenem Zweitantikörper befreit konnte die Membran für 1 min mit je 2 ml der beiden Entwicklungsflüssigkeiten versetzt werden. Anschließend wurde sie mit Whatman-Paper getrocknet und in eine Entwicklungskassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm für 5 s bis 1 h, je nach Signalintensität des Antikörpers, auf die Membran gelegt. Die spezifisch markierten Proteine wurden auf dem entwickelten Film sichtbar.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Vakzinkandidaten in *Salmonella typhi* Ty21a

Das in *Salmonella typhi* Ty21a elektroporierte Antigeneliveryplasmid pMO-CTX-PSA trägt das Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystem, welches in der Lage ist verschiedenste Antigene zu sezernieren. Das Plasmid wird über das von Joachim Diessner in der AG Tumorstudien etablierte Balanced Lethal System stabilisiert. Die Antigenexpression des Antigeneliveryplasmides pMO-CTX-PSA nahm nach notwendigen Modifikationen – der Entfernung eines Insertionselementes (Is2), um unerwünschte Rekombinationen zu verhindern sowie der Kanamycinresistenz-Kassette – dramatisch ab. Gemäß der Arbeitshypothese einer toxischen Überproduktion des *tyrS*-Genproduktes ersetzte Martin Gesser den wildtypischen Promotor durch den *lacI*-Promotor, der eine schwächere Expression bewirkt. Ein weiterer Ansatz war die Integration des *tyrS*-Gens in eine *Sall*-Schnittstelle an Stelle der zuvor verwendeten *SpeI*-Schnittstelle. Die auf diese Weise erstellten Knockout-Stämme *S. typhi* *k.o. tyrS* + pMO-CTX-PSA/*SpeI*  $P_{lacI}$ -*TyrS* sowie *S. typhi* *k.o. tyrS* + pMO-CTX-PSA/*Sall*  $P_{wt}$ -*TyrS* wurden mit dem ursprünglichen Stamm *S. typhi* Ty21a und dem Stamm *S. typhi* + pMO-CTX-PSA (mit Kan<sup>R</sup>) in Bezug auf Wachstumsverhalten, Proteinexpression, Plasmidstabilität und Integrität der Knockout-Sequenz verglichen.

#### 4.1.1 Wachstumskurven

Der Einfluss der Promotorvariationen auf das Wachstumsverhalten der zu untersuchenden Stämme wurde anhand von Messungen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm in LB-Medium untersucht.

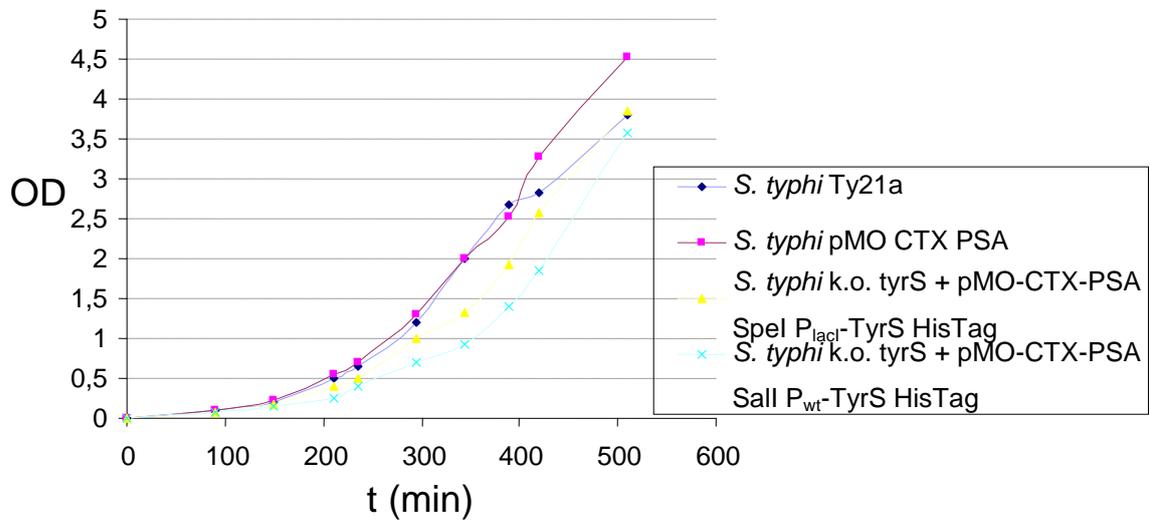


Abbildung 3: Wachstumskurve bei 37°C

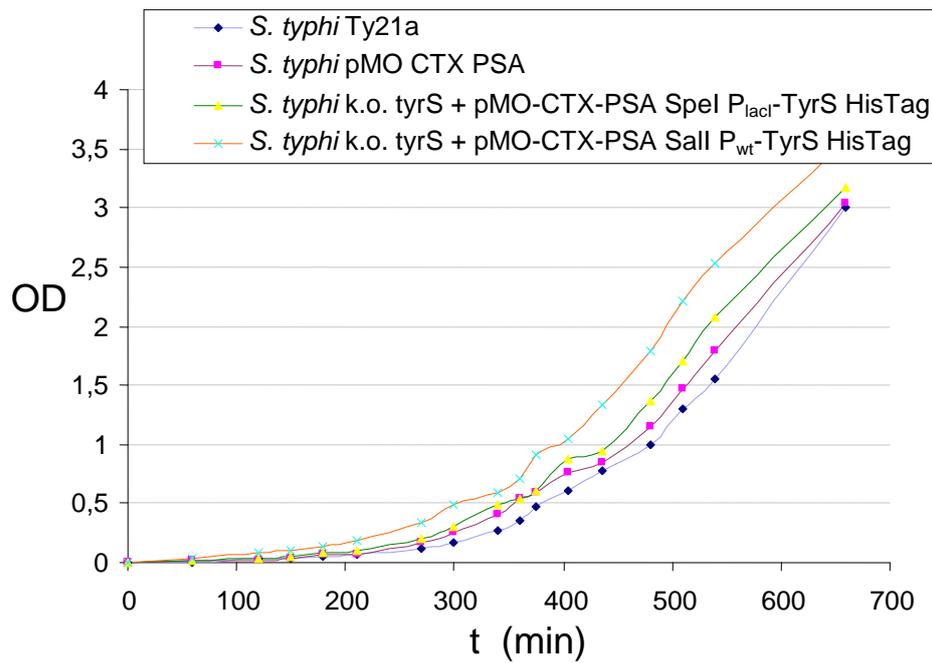
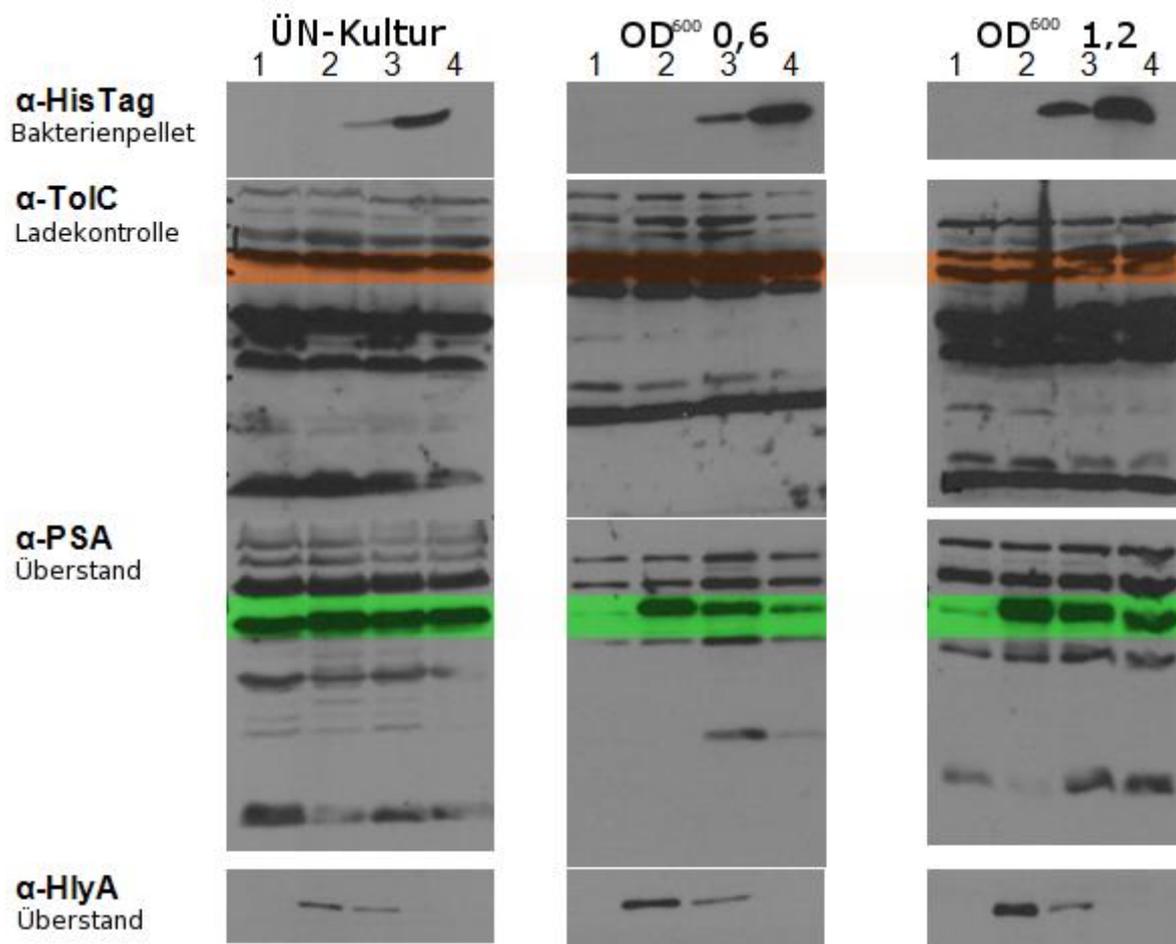


Abbildung 4: Wachstumskurve bei 30°C

Alle vier Stämme wachsen bei 37°C deutlich schneller als bei 30°C. Bei 37°C sind die beiden Knockout-Stämme länger in der lag-Phase als diejenigen mit chromosomalem *tyrS*, *S. typhi* k.o. *tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* ist dabei der deutlich schnelle wachsende.

#### 4.1.2 Proteinexpression

Aus den Kulturen für obige Wachstumskurven wurden aus Bakterienpellet und Überstand Proteine isoliert, direkt aus der Übernachtskultur sowie bei OD 0,6 und 1,0 bzw. 1,2. Mittels Western Blot wurden im Zellpellet die Expression von *tyrS*, im Überstand diejenige der Antigene PSA und HlyA gemessen. Der Nachweis von *tyrS* erfolgte indirekt durch den Antikörper  $\alpha$ -HisTag, zur Ladekontrolle diente der Nachweis von TolC.



**Abbildung 5:** *tyrS*- und Antigenexpression bei 37°C

$\alpha$ -HisTag: Vergleich der *tyrS*-Expression über Nachweis des HisTags im Zellpellet, Zielgröße 47 kD

$\alpha$ -TolC: Ladekontrolle, Zielgröße 48 kD

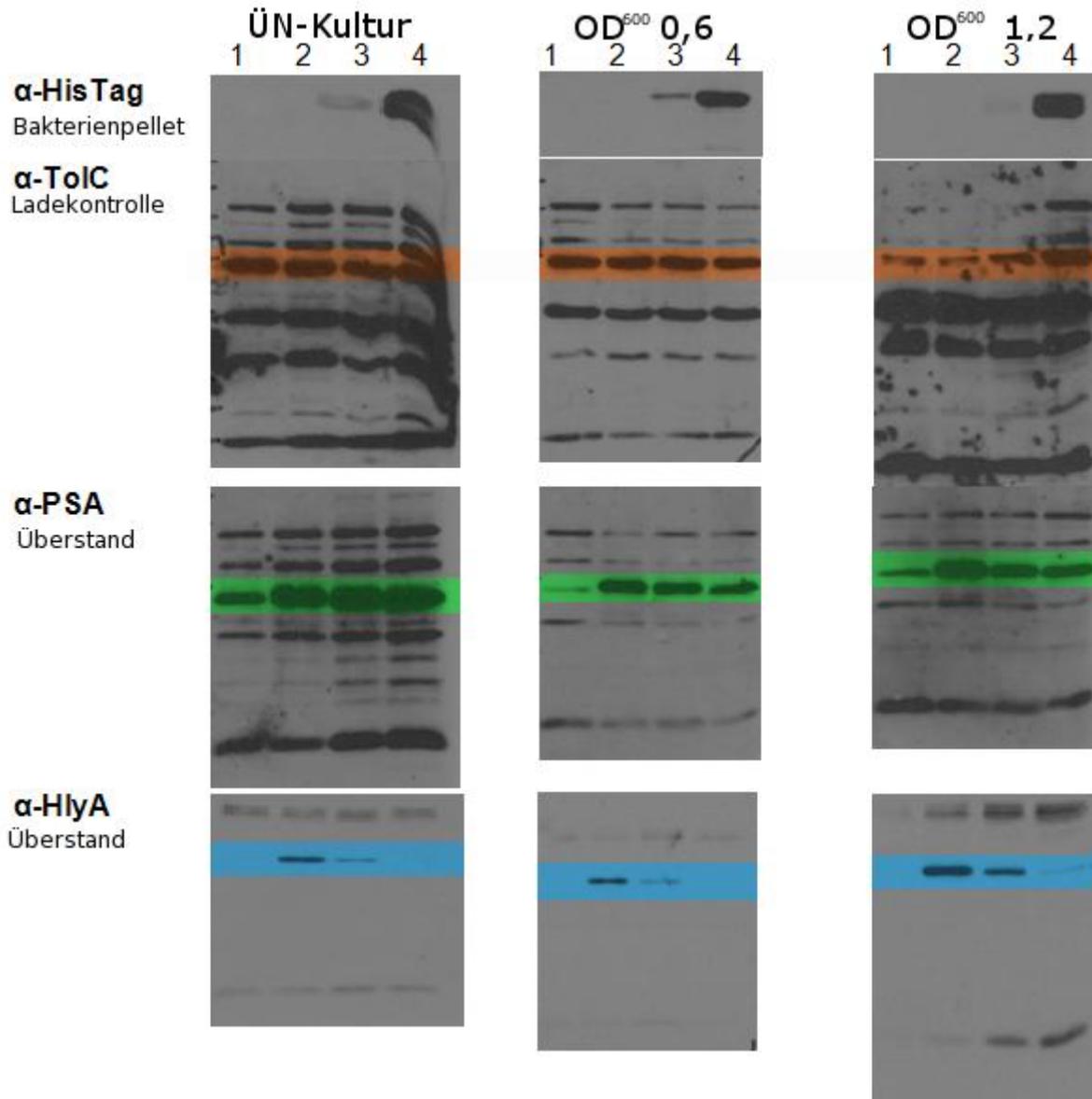
$\alpha$ -PSA /  $\alpha$ -HlyA: Vergleich der Antigenexpression, Messung im Überstand, Zielgröße 48,8 kD

1: *S. typhi* Ty21a

2: *S.t.* +*pMO-CTX-PSA*

3: *S.t.* k.o. *tyrS*+*pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-tyrS*

4: *S.t.* k.o. *tyrS*+*pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>WT</sub>-tyrS*



**Abbildung 6:** *tyrS*- und Antigenexpression bei 30°C

α-HisTag: Vergleich der *tyrS*-Expression über Nachweis des HisTags im Zellpellet, Zielgröße 47 kD

α-TolC: Ladekontrolle, Zielgröße 48 kD

α-PSA / α-HlyA: Vergleich der Antigenexpression, Messung im Überstand, Zielgröße 48,8 kD

1: *S. typhi* Ty21a

2: *S.t.* +pMO-CTX-PSA

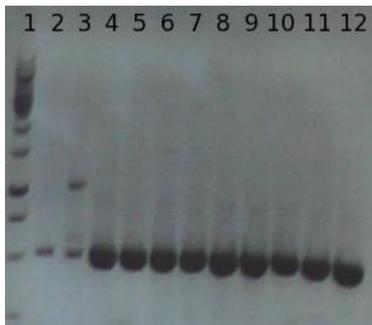
3: *S.t. k.o. tyrS*+pMO-CTX-PSA/Spel  $P_{lacI}$ -*tyrS*

4: *S.t. k.o. tyrS*+pMO-CTX-PSA/Sall  $P_{wt}$ -*tyrS*

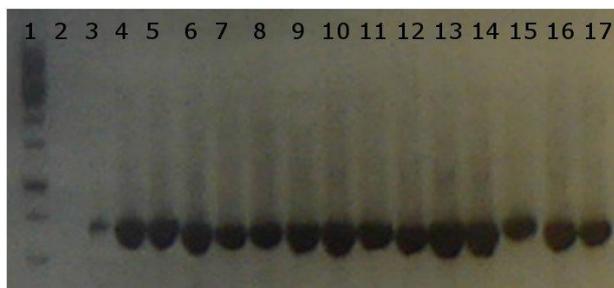
Der Knockout-Stamm *S. t. k.o. tyrS* + pMO-CTX-PSA/Sall  $P_{wt}$ -*tyrS* zeigte im Vergleich zu *S. t. k.o. tyrS* + pMO-CTX-PSA/Spel  $P_{lacI}$ -*tyrS* eine wesentlich stärkere Expression des im Bakterienpellet gemessenen *tyrS*, insbesondere bei 30°C wo diese bei letzterem kaum nachweisbar ist. Die im Überstand gemessene Antigenexpression von *PSA* und *HlyA* war dagegen bei *S. t. k.o. tyrS* + pMO-CTX-PSA/Spel  $P_{lacI}$ -*tyrS* erheblich stärker.

### 4.1.3 Plasmidstabilität

Die Stabilität des Plasmids, und damit die Funktionsfähigkeit des Balanced Lethal Systems, wurde wie folgt getestet. Aus einer Übernachtskultur der Knockout-Stämme *S. t. k.o. tyrS + pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* sowie *S. t. k.o. tyrS + pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>WT</sub>-TyrS* wurden Verdünnungsreihen bis zur Stufe  $10^{-6}$  erstellt, von welcher erneut eine Übernachtskultur angelegt wurde. Diese Sequenz wurde bei ersterem fünfmal, bei letzterem aufgrund einmalig fehlerhaft angeimpfter Übernachtskulturen viermal durchlaufen. Die Verdünnungen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  der letzten Reihe wurden ausplattiert und mittels PCR und den Primer-Kombinationen *Is2 Del seq2for/TyrS seq2for* bzw. *pMO-Sal1sitefor/TyrS seq2for* auf Plasmidvorhandensein überprüft. In jeder der 179 bzw. 104 getesteten Bakterienkolonien wurde das jeweilige Plasmid nachgewiesen, dessen Stabilität nach ca. 90 Generationen folglich 100% betrug.



**Abbildung 7:** Plasmidstabilität *S. typhi* k.o. *tyrS + pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-tyrS*  
Spur 1 1kb DNA Ladder  
Spur 2 H<sub>2</sub>O  
Spur 3 Negativkontrolle *s.typhi* Ty 21a  
Spur 4 Positivkontrolle (~500 bp) *s. typhi* SpeI lacI  
Spur 5-12 untersuchte Kolonien



**Abbildung 8:** Plasmidstabilität *S. typhi* k.o. *tyrS + pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>WT</sub>-tyrS*  
Spur 1 1kb DNA Ladder  
Spur 2 H<sub>2</sub>O  
Spur 3 Negativkontrolle *s.typhi* Ty 21a (leichte Bande durch übergelaufenes Probenmaterial aus benachbarter Tasche)  
Spur 4 Positivkontrolle (~700 bp) *s. typhi* SalI P<sub>WT</sub>  
Spur 5-17 untersuchte Kolonien

#### 4.1.4 Sequenzierung chromosomaler *tyrS*-Knockout

Die Sequenzierung der Stämme *S. t. k.o. tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* sowie *S. t. k.o. tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>wt</sub>-TyrS* zeigte einen fehlerfreien Knockout. Dabei wurden die Primer *pdxfor3* und *pdxYrevers2* verwendet.

#### 4.2 Vorbereitung des chromosomalen Knockouts der *tyrS*-Kassette in *Salmonella typhimurium* AroA SL 7207

Zur Durchführung von *in-vivo*-Untersuchungen im Tiermodell ist es notwendig das Balanced Lethal System von *Salmonella typhi* Ty21a auf *Salmonella typhimurium* AroA SL 7207 zu übertragen. Als Grundlage dient die von Diessner modifizierte Methode von Datsenko und Wanner zur chromosomalen Deletion des essentiellen Gens der Tyrosyl-tRNA-Synthetase bei gleichzeitiger Komplementierung auf dem Antigendeliveryplasmid. Zur Vorbereitung des chromosomalen Knockouts wurde für das BLS-Projekt eine *tyrS*-Chloramphenicol-Resistenz-Kassette mit FRT-Sites auf dem Trägerplasmid *pKD3* konstruiert. Diese wurde amplifiziert, um unter Einwirkung des Enzyms Rekombinase gegen das wildtypische *tyrS*-Gen des *Salmonella typhimurium*-Genoms ausgetauscht zu werden.

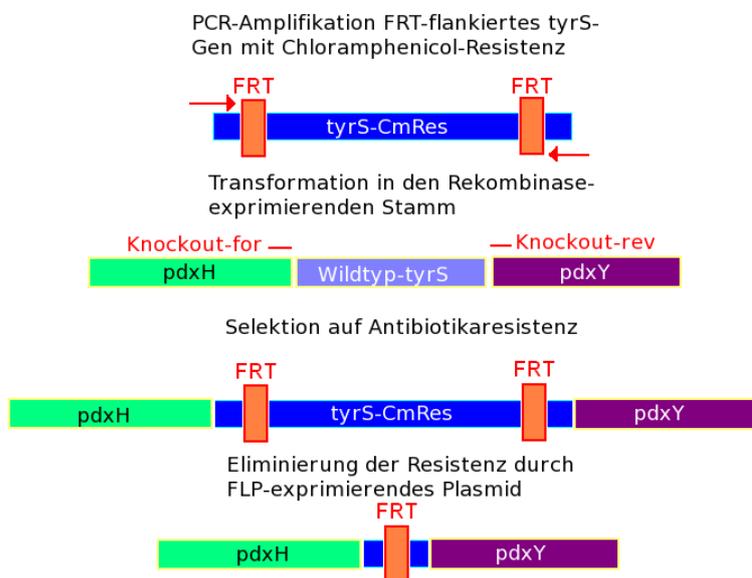


Abbildung 9: Deletion nach Datsenko und Wanner, modifiziert nach Diessner

#### 4.2.1 Gewinnung des tyrS-Cm-Fragments

Als Grundlage für die folgende PCR wurde das Trägerplasmid pKD3-Spel mit tyrS-HisTag-Kassette in Leserichtung des cat-Gens entweder mittels Midiprep oder Miniprep (siehe 3.2.2) isoliert. Die Amplifizierung des benötigten tyrS-Cm-Fragments wurde mit Taq-Polymerase und den Primern Knockout-forward und Knockout-reverse durchgeführt. Versuche mit den weniger fehleranfälligen Phusion- und Taq-Polymerasen ergaben nicht das gewünschte Resultat. Zur Optimierung wurden außerdem Temperaturen und Elongationszeit der PCR variiert sowie Template, Primer und dNTPs ausgetauscht. Am erfolgreichsten waren eine Annealingtemperatur von 50°C und eine Elongationszeit von 4 Minuten für die Taq-Polymerase.

Es wurde ein 800µl Mastermix für 8 Ansätze a 100 µl zusammengestellt.

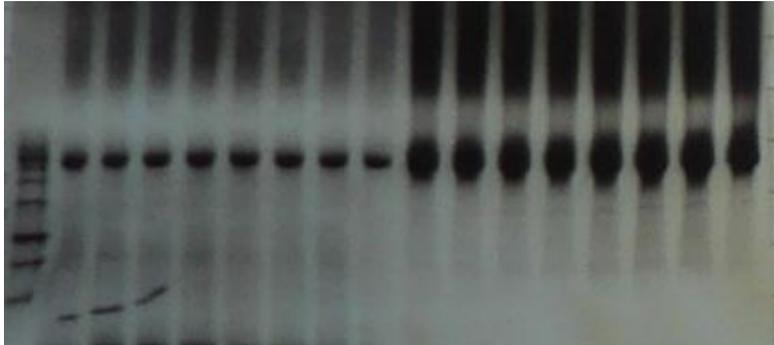
<b>Ansatz Taq Polymerase</b>	10 µl	10x Taq Puffer
<b>(je 100 µl)</b>	2 µl	Taq Polymerase
	1 µl	dNTPs-Mix (20mM)
	1 µl	Primer Knockout-forward
	1 µl	Primer Knockout-reverse
	6 µl	pKD3 tyrS HisTag Spel Klon2
	79 µl	ddH <sub>2</sub> O

Zur Aufreinigung des 2803 Basenpaare lange PCR-Produktes wurde das PCR Purification Kit verwendet (3.2.1.1), wobei 200 µl Ansatz je Säule aufgereinigt und die DNA jeder Säule mit 43 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert wurde. Das Eluat wurde zur Entfernung des Template-Plasmides pKD3 bei 37°C 16 Stunden in 4 Ansätzen mit dem Enzym DPNI verdaut.

<b>Ansatz DPNI-Verdau</b>	8 µl	10x Puffer Tango
<b>(je 80 µl)</b>	40 µl	aufgereinigter PCR-Ansatz
	4 µl	DPNI
	28 µl	ddH <sub>2</sub> O

Das Produkt des Verdau wurde in 8 Spuren gelektrophoretisch aufgetrennt, die Banden bei 2803 Basenpaaren ausgeschnitten und mit dem Gelextraktions-Kit

aufgereinigt (siehe 3.2.1.2). Zur Ankonzentrierung wurden alle Banden über eine Säule mit 43 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.



**Abbildung 10:** gelektrophoretische Auftrennung des aufgereinigten PCR-Produkts  
Das *tyrS*-HisTag-cat-Fragment der Größe 2803 bp wurde anschließend ausgeschnitten

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

#### 4.2.2 Integration des *tyrS*-Cm-Fragments in das *Salmonella typhimurium*- Genom

Um die benötigten Bakterien vom Stamm *S. typhimurium* optimal auf die Aufnahme des *tyrS*-Cm-Fragments vorzubereiten, wurde der Herstellungsprozess der elektrokompenten Zellen (siehe 3.1.5) an mehreren Stellen variiert. So wurden als Medien LB oder TSA gewählt, die Menge Glycerin zur Resuspendierung zwischen 1 und 2 ml sowie die Ziel-OD zwischen 0,7 und 1,0 variiert, die Ausgangskulturmenge verdoppelt, in unterschiedlichem Verhältnis angeimpft und mit höher konzentriertem Glycerin (15% statt 10%) gewaschen. Die elektrokompenten *S. typhimurium*-Zellen tragen das Plasmid pKD46, dessen Enzym Rekombinase über einen durch Arabinose induzierbaren Promotor aktivierbar ist und welches über eine Ampicillinresistenz verfügt. Es soll die Rekombination zwischen dem *tyrS*-Cm-Fragment und dem *tyrS*-Gen des *S. typhimurium*-Genoms erreichen. Folglich wurde die 300 ml ÜN-Kultur um 3ml L-(+)Arabinose 20% und 0,3 ml Ampicillin ergänzt und bei 30°C inkubiert, um auf das Plasmid zu selektieren welches bei höheren Temperaturen nicht repliziert.

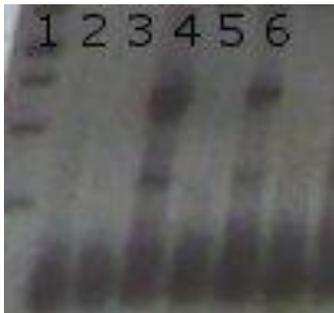
Anschließend erfolgte die Elektroporation (siehe 3.2.8) des *tyrS*-CM-Fragments in die elektrokompenten Zellen. Die durchschnittliche Porationsdauer variierte zwischen 4,6 und 5,8 ms bei 1,8 kV. Die Selektion erfolgreicher Transformanden erfolgte bei 30°C auf LB-Platten mit zwischen 5 und 10 µg/µl variierender Konzentration an Chloramphenicol.

Um die Kolonien mit erfolgreicher Rekombination zu identifizieren, wurden unter

Chloramphenicolselektion gewachsene Kolonien auf definierten Platten gesichert und via Screening-PCR untersucht.

<b>Ansatz Screening PCR</b>	2 µl	10x Taq Puffer
<b>(je 20 µl)</b>	0,1 µl	Taq Polymerase
	0,2 µl	dNTPs-Mix (20mM)
	0,2 µl	Primer pdxHtyphimufor
	0,2 µl	Primer pdxYreverse2
	1 µl	Schnelllysat zu untersuchende Kolonie
	16,3 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Primerkombinationen wurden im Verlauf variiert, so kamen die Kombinationen TyrSseq4forward/pdxYreverse2 (600 bp), pkD3-Spel-seq2for/TyrSreverse und pkD3-Spel-seq4for/TyrSreverse zum Einsatz. Über die Länge der nachgewiesenen Fragmente konnten mehrere Integrationen detektiert werden.



**Abbildung 11:** Screening PCR tyrS-Cm-Integration  
 Primer: TyrSseq4forward/pdxYreverse2  
 Spur 1: 1 kb DNA Ladder / Spur 2: H<sub>2</sub>O / Spur 3: - / Spur 4: +  
 Spur 5: Kolonie 154.1 / Spur 6: Kolonie 154.2 – positive Bande



**Abbildung 12:** Bestätigungs-PCR tyrS-Cm-Integration  
 Primer Spuren 2-6 pdxHstymforCR/pdxYreverse2  
 Primer Spuren 8-12 CMrev2/pdxHfor  
 Spuren 1,7: 1 kb DNA Ladder / Spuren 2,8: H<sub>2</sub>O / Spur 3: - / Spur 4: +  
 Spur 5: Kolonie 154.2 / Spur 6: Kolonie 154.32

Diese befanden sich jedoch gemäß der Bestätigungs-PCR mit mehreren weiteren Primerkombinationen, die in den angrenzenden Bereichen der gewünschten Integrationsstelle binden, nicht exakt an der gewünschten Stelle im Genom. Das Protokoll wurde regelmäßig variiert, die Zahl der untersuchten Klone sukzessiv vergrößert. Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Vorarbeiten, die im Labor fortgeführt wurden, gelang mittlerweile die vollständige Integration.

### 4.3 Variation der Lage des *lacI*-Promotors

Im Vergleich zum Ausgangsstamm führte der Austausch des wildtypischen Promotors von *tyrS* gegen den schwachen konstitutiven Promotor *lacI* beim Stamm *S. t. k.o. tyrS + pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-tyrS* zu einer Reduktion der *tyrS*-Produktion und zu einer Verbesserung der Sekretionsleistung. Die Klonierung des Promotors in die *Sall*-Site stellt einen Versuch dar, diese Leistung weiter zu verbessern.

Zunächst wurden die benötigten Plasmide via Miniprep (siehe 3.2.2.1) aus den vorhandenen *S. typhi*-Bakterienstämmen gewonnen. Mittels PCR wurde das *P<sub>lacI</sub>-tyrS*-HisTag-Fragment aus dem Plasmid *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-tyrS* amplifiziert. Dabei wurden zunächst Pfu- bzw. Phusion-Polymerase verwendet, die jedoch kein Produkt lieferten. So wurde im Verlauf die Taq-Polymerase eingesetzt, das Ergebnis aufgrund der fehlenden Proof-Reading-Fähigkeit per Sequenzierung überprüft.

<b>Ansatz PCR <i>lacI</i> Amplifikation (je 100 µl)</b>	10 µl	10x Taq Puffer
	0,5 µl	Taq Polymerase
	2 µl	dNTPs-Mix (20mM)
	1 µl	Primer <i>lacI</i> prom-for
	1 µl	Primer <i>lacI</i> prom-rev
	3 µl	Template <i>pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-tyrS</i>
	80,5 µl	ddH <sub>2</sub> O

Das PCR-Produkt wurde in 8 Spuren gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Banden bei 1467 Basenpaaren ausgeschnitten und mit dem Gelextraktions-Kit aufgereinigt (siehe 3.2.1.2). Zur Ankonzentrierung wurden alle Banden über eine Säule mit 43 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.



**Abbildung 13:** PCR *lacI* Amplifikation  
 links der 1 kb DNA Ladder: Ansatz mit Phusion-Polymerase  
 rechts davon: Ansatz mit Taq-Polymerase, Bande bei Zielgröße 1467 bp

Danach wurden Vektor und DNA-Fragment mit dem Restriktionsenzym *Sall* gespalten.

<b>Restriktionsansatz DNA-Fragment</b> (je 40 µl)	4 µl	O <sup>+</sup> Puffer
	2 µl	<i>Sall</i>
	15 µl	<i>P<sub>lacI</sub>-tyrS HisTag EPK</i>
	19 µl	ddH <sub>2</sub> O

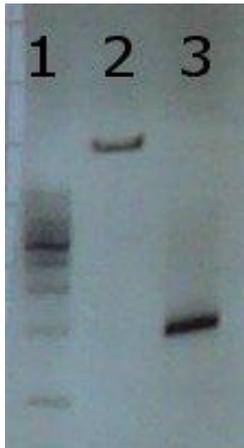
<b>Restriktionsansatz Vektor</b> (je 40 µl)	4 µl	O <sup>+</sup> Puffer
	2 µl	<i>Sall</i>
	5 µl	<i>pMO-CTX-PSA</i>
	29 µl	ddH <sub>2</sub> O

Beide Ansätze wurden bei 37°C 2h inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz des Vektors zweimal das Enzym CIAP (Calf Intestine Phosphatase) zugesetzt, um eine Selbstligation nach einem Schnitt mit Restriktionsenzymen zu verhindern.

<b>CIAP Behandlung</b>	1 µl	CIAP Puffer
	1 µl	CIAP
	8 µl	ddH <sub>2</sub> O

Es erfolgte jeweils eine Inkubation für 30' bei 37°C.

Nun wurden beide Ansätze mittels PCR Purification (siehe 3.2.1.1) aufgereinigt und zur Kontrolle und Abschätzung der Ligationsmengen je 4 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.



**Abbildung 14:** Kontrolle Ligationsbestandteile  
 Spur 1: 1 kb DNA Ladder  
 Spur 2: Vektor pMO-CTX-PSA  
 Spur 3: P<sub>lacI</sub>-tyrS HisTag EPK

Für die Ligation wurden folgende Ansätze gewählt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	
<b>Ansatz Ligation</b>	5 µl	5 µl	5 µl	Vektor pMO-CTX-PSA
<b>(je 20 µl)</b>	-	1 µl	5 µl	Fragment P <sub>lacI</sub> -tyrS HisTag EPK
	2 µl	2 µl	2 µl	Ligasepuffer
	1 µl	1 µl	1 µl	T4 DNA Ligase
	12 µl	11 µl	7 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert, morgens die DNA-Ligase bei 65°C 10 min hitzeinaktiviert.

Anschließend erfolgte die Elektroporation (siehe 3.2.8) des Ligationsansatzes in elektrokompetente E. Coli-Zellen. Die durchschnittliche Porationsdauer variierte zwischen 5,1 und 5,9 ms bei 1,8 kV. Die Selektion erfolgreicher Insertionen erfolgte bei 37°C auf LB- oder BHI-Platten mit einer Kanamycinkonzentration von 25 µg/ µl.

Um die Kolonien mit erfolgreicher Insertion zu identifizieren, wurden Kolonien auf definierten Platten gesichert und via Screening-PCR untersucht.

<b>Ansatz Screening PCR</b>	2 µl	10x Taq Puffer
<b>(je 20 µl)</b>	0,1 µl	Taq Polymerase
	0,2 µl	dNTPs-Mix (20mM)
	0,2 µl	Primer Sallsitefor

0,2 µl Primer Sallsiterev  
1 µl Schnelllysat zu untersuchende Kolonie  
16,3 µl ddH<sub>2</sub>O

Nach mehreren Zyklen wurden in der Gelelektrophorese positive Klone im Bereich der erwarteten Fragmentlänge von 1467 bp gefunden.



**Abbildung 15:** Screening PCR Klonierung P<sub>lacI</sub> in Sall-Site

Spur 1: 1 kb DNA Ladder

Spur 2: H<sub>2</sub>O

Spur 3: -

Spur 4: +

Spur 5: Klon 3.10.3

Spur 6: Klon 3.10.6

Spur 7: Klon 3.10.10

Spur 8: Klon 3.10.19

Spur 9: Klon 3.10.26A

Diese wurden mit den Primerkombinationen Sallsitefor/lacIpromf und Sallsiterev/lacIpromf auf die richtige Orientierung des Fragments im Vektor überprüft.



**Abbildung 16: Bestätigungs-PCR** Klonierung P<sub>lacI</sub> in Sall-Site

Spur 1: 1 kb DNA Ladder

Spur 3: -

Spur 4: +

Spur 5: Klon3.10.26A.p1

Spur 6: Klon 3.10.26A.p2

Spur 7: Klon 11.10.3Y.p1

Spur 8: Klon 11.10.3Y.p1

Im Verlauf meiner Arbeit wurden 6 Klone sequenziert, bei allen war es zu mindestens einem Basenaustausch gekommen.

## 5 Diskussion

Im Zentrum meiner Arbeit stand die Charakterisierung zweier *Salmonella Typhi* Ty21a  $\Delta$  *tyrS*-Stämme, deren Plasmid über ein *tyrS* komplementierendes Balanced-Lethal-System stabilisiert ist, im Hinblick auf die Auswahl des passenden Vakzin Stammes für die Produktion und in vivo-Testung. Untersucht wurden *S. typhi* *k.o. tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* sowie *S. typhi* *k.o. tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>wT</sub>-TyrS* im Vergleich mit dem ursprünglichen Stamm *S. typhi* Ty21a und dem Stamm *S. typhi* + *pMO-CTX-PSA* (mit Kan<sup>R</sup>).

Die Plasmidstabilität der beiden Stämme, und damit die Funktion des Balanced Lethal Systems, wurde mit fünf Zyklen von Übernachtskulturen und jeweils angeschlossenen Verdünnungsreihen bis zur Stufe 10<sup>-6</sup> geprüft. Die ausplattierten Verdünnungen der letzten Reihe lieferten die Kolonien für die PCR-Testung, bei der in allen der jeweils über 100 getesteten das jeweilige Plasmid nachgewiesen wurde. Die Sequenzierung der beiden Stämme belegte zudem den fehlerfreien chromosomalen Knockout des essentiellen Gens *tyrS*.

Das Wachstumsverhalten wurde bei 30°C und 37°C über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Alle vier untersuchten Stämme wachsen bei 37°C deutlich schneller als bei 30°C. Bei 37°C sind die beiden  $\Delta$  *tyrS*-Stämme länger in der lag-Phase als diejenigen mit chromosomalem *tyrS*, *S. typhi* *k.o. tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* ist dabei der deutlich schnelle wachsende.

Der Knackpunkt und damit die wichtigste Zielsetzung bei der Erstellung der Knockout-Stämme *S. typhi* *k.o. tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* und *S. typhi* *k.o. tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>wT</sub>-TyrS* war eine Steigerung der Expression und Sekretion des CtxB-Tumorantigens. Die Sekretion des tumorantigentragenden Fusionsproteins bewegte sich beim vorherigen Knockout-Stamm am unteren Rand der Nachweisgrenze im Western Blot. Als maßgeblich für Expressierung und Sekretion des Tumorantigens wurden bereits die Wahl der Schnittstelle der *tyrS*-Cat-Kassette, der Abstand zwischen HlyR und HlyC, eine Komplementierung des Sigmafaktors RpoS und die Beschaffenheit des Promotors ausgemacht.

Modifikationen an Letzterer waren Untersuchungsgrundlage dieser Arbeit (Diessner 2009; Hotz, Fensterle et al. 2009; Gesser 2010).

Aus den Kulturen für die Wachstumskurven wurden bei OD 0,6 und 1,0 bzw. 1,2

Proteine isoliert, sowohl aus dem Bakterienpellet als auch aus dem Überstand. Mittels Western Blot wurden im Zellpellet die Expression von *tyrS*, im Überstand die der Antigene PSA und HlyA untersucht. TolC diente als Ladekontrolle, die Expression von *tyrS* wurde über den fusionierten HisTag bestimmt. Der Stamm mit dem schwächeren *lacI*-Promotor *S. typhi* *k.o.* *tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* exprimiert im Vergleich zu *S. typhi* *k.o.* *tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>wT</sub>-TyrS* deutlich geringere Mengen von *tyrS*. Die Sekretionsleistung beider Stämme ist im Vergleich zum Stamm *S. typhi* + *pMO-CTX-PSA* (mit Kan<sup>R</sup>) allgemein schwächer. Der PSA-Antikörper liefert viele unspezifische Banden, eine davon scheint auf Höhe der Zielbande zu liegen und erschwert die Beurteilung. Dafür spricht deren zunehmende Größe in der Übernachtskultur. Vor allem bei 37°C ist eine höhere Sekretionsleistung des Stammes *S. typhi* *k.o.* *tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* zu erkennen. Diese bestätigt sich auch bei der Bestimmung der Sekretionsleistung über den HlyA-Antikörper, der aufgrund fehlender Nebenbanden eine gute Beurteilung zuließ. Hier lassen sich beim Stamm *S. typhi* *k.o.* *tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SalI P<sub>wT</sub>-TyrS* nahezu keine Banden abgrenzen, der Stamm *S. typhi* *k.o.* *tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* liefert durchgehend bessere Resultate. Bei OD<sup>600</sup> 1,2 ist im Vergleich zu 0,6 eine höhere Sekretion festzustellen. Eine mögliche Erklärung wäre die Ausbildung der Salmonella-Pathogenitätsinseln mit konsekutiver Aktivierung der Sekretionssysteme beim Eintritt in die stationäre Phase (Lundberg, Vinatzer et al. 1999; Schmidt und Hensel 2004).

Als Ergebnis der Charakterisierung bleibt festzuhalten, dass der Stamm *S. typhi* *k.o.* *tyrS* + *pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* neben einer guten Replikationsfähigkeit und ohne Zuhilfenahme von Antibiotika erzielten Plasmidstabilität die erwünschte Leistungssteigerung des Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystems auf ein nutzbares Niveau mit sich bringt.

Da ein *in vitro* funktionierendes System existiert, besteht der nächste Schritt in der Testung der verschiedenen Varianten des Antigendeliveryplasmides *in vivo*. Im Mausmodell verwendete die Arbeitsgruppe Tumorstämme bereits *Salmonella Typhimurium* AroA SL 7207, um mit dem CtxB-gekoppelten, über das Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystem sezernierten PSA erfolgreich eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen (Fensterle, Bergmann et al. 2008). Nun galt es das Balanced Lethal System auf diesen Stamm zu übertragen. Da das Gen der Tyrosyl-tRNA-Synthetase

essentiell ist, muss es bei seiner chromosomalen Deletion gleichzeitig auf dem Antigendeliveryplasmid komplementiert werden (Wakasugi, Quinn et al. 1998; Woese, Olsen et al. 2000; Gerdes, Scholle et al. 2003; Diessner 2009). Dies wird auf Basis der von Diessner modifizierten Methode nach Datsenko und Wanner ermöglicht, bei der mittels Flipase sowohl die zuvor plasmidstabilisierende Kan-Resistenz als auch die zur Selektionierung eingefügte chromosomale Cm-Resistenz und das *tyrS*-Gen ausgeschnitten werden (Datsenko und Wanner 2000). Zur Vorbereitung wurde eine *tyrS*-Chloramphenicol-Resistenz-Kassette mit FRT-Sites konstruiert, damit diese unter Einwirkung von Rekombinase gegen das wildtypische *tyrS*-Gen ausgetauscht werden kann. Die Etablierung dieses ersten Schrittes stellte sich als äußerst schwierig heraus. Der offensichtlichste Grund hierfür ist die essentielle Natur des *tyrS*-Gens, welcher bereits die Rekombination in *Salmonella typhi* schwierig gestaltete. Die geringen Unterschiede in Sequenz und Konformation zwischen besagten Stämmen könnten die Integration des mehrere Tausend Basenpaare langen Moleküls zusätzlich erschweren. Einen weiteren Einflussfaktor mag die Existenz sog. Hot Spots darstellen. Dabei handelt es sich um eventuell strukturbedingt labile DNA-Bereiche, in denen häufiger Mutationen vorkommen, beispielsweise an Orten hoher Cytosinmethylierung wie dem *lacI* Gen von *Escherichia coli* (Wyszynski, Gabbara et al. 1994).

Die Charakterisierung der bisherigen Knockout-Stämme lieferte mit dem Stamm *S. typhi k.o. tyrS + pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* einen vielversprechenden Vakzinkandidaten. Eine weitere Steigerung der sekretierten Menge an Tumorantigen ist dennoch erstrebenswert. Dafür sollte eine Version des Impfstammes erstellt werden, die den schwächeren *lacI*-Promotor in der *Sall*-Schnittstelle trägt. Grundlage dieser Entscheidung war die Beobachtung, dass der Stamm *S. typhi k.o. tyrS + pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* bei einer vergleichsweise niedrigen Expression von *tyrS* eine bessere Sekretionsleistung erzielte. Dass er zudem eine höhere Plasmidkopienzahl aufweist, spricht für eine Toxizität des *tyrS*-Genproduktes. Diese These wird durch die Ergebnisse der durchgeführten Westernblot-Analysen gestützt, bei welchen *S. typhi k.o. tyrS + pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS*, der Stamm mit der geringeren Expression von *tyrS* im Zellpellet, eine weitaus bessere Sekretionsleistung von *PSA* und *HlyA* im Überstand nachgewiesen wurde. Zudem wurde in früheren Untersuchungen eine toxische Wirkung der Überproduktion von Tyrosyl-tRNA Synthetase auf *Escherichia Coli* beobachtet (Bedouelle, Guez et al.

1990). Die *tyrS*-Expression soll durch die Variation der Lage des *lacI*-Promotors reduziert werden, um eine Steigerung der Plasmidkopienzahl und letztlich der Tumorantigensekretion zu erzielen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden 6 positive Klone sequenziert, diese wiesen jedoch mindestens einen Basenaustausch auf. Auf der Grundlage der dabei etablierten Methoden gelang im Verlauf die korrekte Integration des neuen Promotors (Bergmann, pers. Mitteilung).

Eine maximale Steigerung von Plasmidkopienzahl und Sekretionsleistung kann möglicherweise durch den kompletten Verzicht auf einen Promotor für das *tyrS*-Gen erreicht werden. Zu Anfang der stationären Wachstumsphase erfolgen wenige die Proteinbiosynthesekapazität belastende Aktivitäten wie Wachstum und Vermehrung, so dass ein Minimum an potentiell toxischem *tyrS* ausreichend wäre. Ein mögliches Problem bei der Variation des Promotors könnte entstehen, wenn dabei das im Stamm *S. typhi* *k.o. tyrS + pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* entfernte Insertionselement (IS2) im Genom verbleibt. Dieses erleichtert die Rekombination homologer Sequenzen auf Chromosomen und Plasmiden und birgt die grundsätzliche Gefahr der Rekombination mit dem humanen Genom.

Ein weiterer Weg zur Sekretionssteigerung wäre die Komplementierung von *rpoS*. Das *rpoS*-Gen kodiert einen RNA-Polymerase Sigmafaktor, der die bakterielle Proteinsekretion reguliert. Die Komplementierung von *rpoS* oder *rfaH*, welches in *S. typhi* Ty21a als ein *rpoS*-Zielprotein angesehen wird, verbesserte die Leistung des Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystems. Das *rpoS*-Gen in *S. typhi* Ty21a ist mutiert, was zu einer Verminderung der Stressresistenz führt. Somit ist es möglicherweise als Virulenzfaktor anzusehen. Vor einer Reintegration in einen potentiellen Impfstamm gilt es genau zu klären, ob dadurch dessen Virulenz gesteigert wird (Robbe-saule, Coynault et al. 1995; Flores, Escalante et al. 2008; Hotz, Fensterle et al. 2009; Gesser 2010).

Die *in vivo*-Versuche im Mausmodell zielen neben der Verträglichkeitsprüfung der Vakzinkandidaten auf das Erzeugen einer Immunantwort und eine daraus resultierende Antitumorwirkung ab. Bei Erfolg wäre dank der Integration des Balanced Lethal Systems der Weg für eine klinische Studie bereitet. Wenn sich der Stamm *S. typhi* *k.o. tyrS + pMO-CTX-PSA/SpeI P<sub>lacI</sub>-TyrS* bei Prostatatumoren als wirksam erweist, eröffnet die Flexibilität des Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystems eine Vielzahl an weiteren Angriffsmöglichkeiten. Da das System in der Lage ist Antigene

verschiedenster Größe zu sezernieren, kann ein immunogener Impfstamm mit Sekretionsfähigkeit auch Grundlage für eine effektivere Präsentation bereits erfolgreich zum Erzeugen einer Immunantwort eingesetzter Tumorantigene sein. Kandidaten gibt es reichlich, zum Beispiel B-Raf bei Lungentumoren, CD40-Ligand beim B-Zell-Lymphom oder modifizierte gp100-Peptide beim Melanom (Parkhurst, Salgaller et al. 1996; Urashima, Suzuki et al. 2000; Gentschev, Fensterle et al. 2005). Neben der Behandlung von Tumoren kann auch die Bekämpfung von Infektionskrankheiten, beispielsweise durch Verwendung Pneumokokken-Oberflächenproteins PspA (Kang, Srinivasan et al. 2002), von einer gezielteren Aktivierung des Immunsystems profitieren.

## 6 Zusammenfassung

Krebsimmuntherapie ist ein relativ junger Ansatz zur Tumorbehandlung und insbesondere durch die im Vergleich zu konventionellen Methoden höhere Spezifität interessant. Eine Herausforderung besteht dabei in der Provokation einer ausreichend starken zellulären Immunantwort, wobei frühere Studien die Sekretion tumorspezifischer Antigenstrukturen durch attenuierte Bakterien als aussichtsreich charakterisierten. In der Arbeitsgruppe „Bakterielle Tumorthherapie“ werden attenuierte Salmonellen als Tumoringfstoffe genutzt, die CtxB-fusionierte, tumorspezifische Antigene produzieren und diese mit Hilfe des Hämolyisin- $\alpha$  – Sekretionssystems sezernieren. Die für das Tumorantigen-Fusionsprotein sowie das Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystem kodierenden Gene sind auf dem Vakzineplasmid lokalisiert. Um dessen Stabilität auch ohne Verwendung einer Antibiotikaresistenz sicherstellen zu können, wurde von Joachim Diessner ein Balanced Lethal System in den Impfstamm *Salmonella Typhi* Ty21a eingeführt. Das essentielle Gen *tyrS*, welches die Tyrosyl-tRNA-Synthetase kodiert, wurde chromosomal deletiert und in das Antigeneliveryplasmid pMO eingesetzt. Dieses ist somit trotz Verzicht auf Antibiotikaresistenzgene einhundert Prozent stabil und ermöglicht über das ebenfalls darauf kodierte Hämolyisin- $\alpha$  Sekretionssystem die Sekretion tumorspezifischer Antigene, beispielsweise PSA. Allerdings führten die notwendigen Modifikationen zur dramatischen Abnahme der Funktion des Sekretionssystems. Martin Gesser widmete sich dessen Optimierung, indem er Lage und Art des Promotors variierte.

Hauptziel meiner Arbeit war die Charakterisierung zweier von Martin Gesser erstellter *Salmonella Typhi* Ty21a Knockout-Stämme, die als Vakzinkandidaten in Frage kamen. Die entscheidende Fragestellung war neben der Plasmidstabilität, dem Wachstumsverhalten und der genetischen Integrität vor allem, ob die Optimierungen am Sekretionssystem zur erwünschten Steigerung der Sekretionsleistung geführt haben. Andernfalls können gewonnene Daten zur weiteren Optimierung des Systems genutzt werden. Da die Ergebnisse der Charakterisierungen Optimierungsspielraum aufzeigten arbeitete ich zudem an einer weiteren Version des Impfstammes, die den schwächeren *lacI*-Promotor in der *Sall*-Schnittstelle trägt, um die vermutete Toxizität des *tyrS*-Genproduktes zu reduzieren und damit die Sekretionsleistung zu verbessern. Darüber hinaus begann ich mit der Übertragung des von Joachim Diessner in *Salmonella Typhi* Ty21a erstellten Balanced Lethal Systems, um die

Testung der verschiedenen Vakzinkandidaten im Mausmodell zu ermöglichen. Dazu etablierte ich den ersten Schritt der chromosomalen Deletion von *tyrS* in *Salmonella Typhimurium* AroA SL 7207.

## 7 Literaturverzeichnis

- Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulos, et al. (1993). "A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*." Nucleic Acids Res **21**(14): 3329-3330.
- Bedouelle, H., V. Guez, et al. (1990). "Overproduction of tyrosyl-tRNA synthetase is toxic to *Escherichia coli*: a genetic analysis." J Bacteriol **172**(7): 3940-3945.
- Böcker, W. und A. Aguzzi (2008). Pathologie mit über 200 Tabellen. München [u.a.], Elsevier Urban & Fischer.
- Bumann, D., W. G. Metzger, et al. (2001). "Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers." Vaccine **20**(5-6): 845-852.
- Curtiss, R., 3rd (2002). "Bacterial infectious disease control by vaccine development." J Clin Invest **110**(8): 1061-1066.
- 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. und B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products" Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(12): 6640-6645.
- del Solar, G., R. Giraldo, et al. (1998). "Replication and control of circular bacterial plasmids." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 434-464.
- Diessner, E.-J. (2009). Erstellung eines Balanced lethal Systems für *Salmonella typhi* Ty21a. Würzburg.
- Dietrich, G., J. F. Viret, et al. (2003). "Haemolysin A and listeriolysin--two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity." Int J Parasitol **33**(5-6): 495-505.
- Fensterle, J., B. Bergmann, et al. (2008). "Cancer immunotherapy based on recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B." Cancer Gene Ther **15**(2): 85-93.
- Flores, N., A. Escalante, et al. (2008). "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 **14**(4): 176-192.
- Galmbacher, K., M. Heisig, et al. (2010). "Shigella mediated depletion of macrophages in a murine breast cancer model is associated with tumor regression." PLoS One **5**(3): e9572.
- 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. (2004). "Use of the [alpha]-hemolysin secretion system of *Escherichia coli* for antigen delivery in the *Salmonella typhi* Ty21a vaccine strain." International Journal of Medical Microbiology **294**(6): 363-371.
- Gentschev, I., J. Fensterle, et al. (2005). "Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice." BMC Cancer **5**(1): 15.
- Gentschev, I., H. Mollenkopf, et al. (1996). "Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway." Gene **179**(1): 133-140.

- Gentschev, I., S. Spreng, et al. (2007). "Vivotif® -- A 'Magic Shield' for Protection against Typhoid Fever and Delivery of Heterologous Antigens." Chemotherapy **53**(3): 177-180.
- 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): 5673-5684.
- Germanier, R. und 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): 553-558.
- Germanier, R. und E. Furer (1971). "Immunity in Experimental Salmonellosis II. Basis for the Avirulence and Protective Capacity of gal E Mutants of Salmonella typhimurium." Infect. Immun. **4**(6): 663-673.
- Germanier, R. und E. Furer (1983). "Characteristics of the attenuated oral vaccine strain "S. typhi" Ty 21a." Dev Biol Stand **53**: 3-7.
- Gesser, M. (2010). "Optimierung eines Balanced Lethal Systems für Salmonella Typhi Ty21a."
- 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): 717-723.
- Hahn, H. (2009). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie mit ... 157 Tabellen. Heidelberg, Springer.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hof, H. und R. Dörries (2009). Medizinische Mikrobiologie 237 Tabellen ; [Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, klinische Infektiologie, Hygiene]. Stuttgart, Thieme.
- Hoiseh, S. K. und B. A. Stocker (1981). "Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines." Nature **291**(5812): 238-239.
- Hotz, C., J. Fensterle, et al. (2009). "Improvement of the live vaccine strain Salmonella enterica serovar Typhi Ty21a for antigen delivery via the hemolysin secretion system of Escherichia coli." Int J Med Microbiol **299**(2): 109-119.
- Jones, B. D., N. Ghori, et al. (1994). "Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches." J Exp Med **180**(1): 15-23.
- 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): 1739-1749.
- Krams, M. (2010). Kurzlehrbuch Pathologie 126 Tabellen. Stuttgart [u.a.], Thieme.
- Lengeler, J. W. (1999). Biology of the prokaryotes 150 tables. Stuttgart [u.a.], Thieme [u.a.].
- Lim, D. (1998). Microbiology. Boston, Mass. [u.a.], WCB McGraw-Hill.
- Lundberg, U., U. Vinatzer, et al. (1999). "Growth phase-regulated induction of Salmonella-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes." J Bacteriol **181**(11): 3433-3437.
- Metzger, W. G., E. Mansouri, et al. (2004). "Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant Salmonella enterica serovar typhi Ty21a vaccine expressing urease A and B from Helicobacter pylori in human volunteers." Vaccine **22**(17-18): 2273-2277.

- Old, L. J. (2003). "Cancer vaccines 2003: opening address." Cancer Immun **3 Suppl 2**: 1.
- Old, L. J. (2008). "Cancer vaccines: an overview." Cancer Immun **8 Suppl 1**: 1.
- 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): 2539-2548.
- Pawelek, J. M., K. B. Low, et al. (1997). "Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector." Cancer Res **57**(20): 4537-4544.
- Robbe-saule, V., C. Coynault, et al. (1995). "The live oral typhoid vaccine Ty21a is a rpoS mutant and is susceptible to various environmental stresses." FEMS Microbiology Letters **126**(2): 171-176.
- Rosenberg, S. A. (2001). "Progress in human tumour immunology and immunotherapy." Nature **411**(6835): 380-384.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1985). "Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer." N Engl J Med **313**(23): 1485-1492.
- Schmidt, H. und M. Hensel (2004). "Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis." Clin Microbiol Rev **17**(1): 14-56.
- 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): 1596-1598.
- Spreng, S., G. Dietrich, et al. (2006). "Rational design of Salmonella-based vaccination strategies." Methods **38**(2): 133-143.
- Spreng, S. und J. F. Viret (2005). "Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines." Vaccine **23**(17-18): 2060-2065.
- Stagg, J., R. W. Johnstone, et al. (2007). "From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy." Immunol Rev **220**: 82-101.
- Stoler, D. L., N. Chen, et al. (1999). "The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15121-15126.
- Urashima, M., H. Suzuki, et al. (2000). "An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated Salmonella typhimurium." Blood **95**(4): 1258-1263.
- Vassaux, G., J. Nitcheu, et al. (2006). "Bacterial gene therapy strategies." J Pathol **208**(2): 290-298.
- 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.
- Wei, M. Q., A. Mengesha, et al. (2008). "Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era." Cancer Lett **259**(1): 16-27.
- 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): 202-236.
- Wyszynski, M., S. Gabbara, et al. (1994). "Cytosine deaminations catalyzed by DNA cytosine methyltransferases are unlikely to be the major cause of mutational hot spots at sites of cytosine methylation in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1574-1578.
- Zhao, M., M. Yang, et al. (2005). "Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing Salmonella typhimurium." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 755-760.

## Bildnachweis

- Abb. 1 Statistisches Bundesamt, destatis.de, aus Datenbank erzeugt
- Abb. 2 Dietrich, G., J. F. Viret, et al. (2003). "Haemolysin A and listeriolysin--two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity." Int J Parasitol **33**(5-6): 495-505.
- Abb. 3-8 diese Arbeit
- Abb. 9 diese Arbeit, angelehnt an Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products 10.1073/pnas.120163297." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(12): 6640-6645.
- Abb. 10-16 diese Arbeit

## Danksagung

Folgenden Personen möchte ich für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit herzlich danken:

Dr. Birgit Bergmann für die Betreuung dieser Arbeit und die ausdauernde Unterstützung. Vielen Dank für all die Geduld und Kompetenz.

Prof. Dr. Ulf R. Rapp für die Ermöglichung der Doktorarbeit an seinem Institut.

Priv. Doz. Dr. Ivaylo Gentshev und Dr. Joachim Fensterle für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe.

Martin Gesser und Dr. Joachim Diessner für die Etablierung medizinischer Doktorarbeiten in der AG Tumorkvakzine.

Martin Heisig, Christian Hotz, Steve Wagner, Miriam Alb, Katharina Galmbacher, Susanne Meyer und den weiteren Mitgliedern der AG Tumorkvakzine für ihre Unterstützung und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Meiner Familie für ihre Unterstützung und Anteilnahme.

Und natürlich Felicitas, dem Licht in meinem Leben.