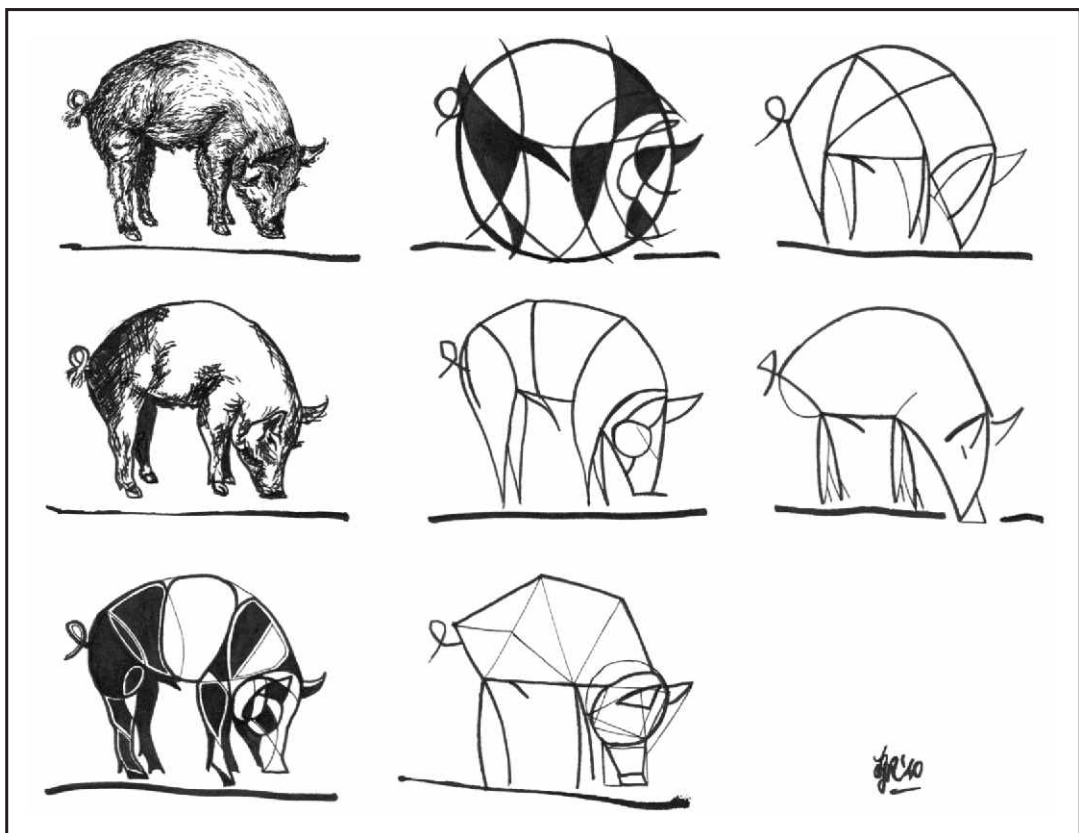


GENTECHNISCHE HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER EXOTOXINE BETA UND BETA2 VON *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

CARSTEN HEYDEL



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2010

© 2010 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-0003-8

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gentechnische Herstellung und Charakterisierung der Exotoxine Beta und Beta2 von *Clostridium perfringens*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Carsten Heydel

Tierarzt aus Bonn

Gießen, 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
Prof. Dr. Dr. habil. H. Eisgruber

Tag der Disputation: 21.10.2010

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Heydel, C., Kießling, A., Sommer, A., Willems, H., Schoepe, H., Baljer, G.

Bedeutung des Beta2-Toxins in der Pathogenese der Nekrotisierenden Enteritis der Ferkel – Nachweishäufigkeit, rekombinante Expression und Studien zur Biologischen Wirkung

Poster-Präsentation im Rahmen der Veranstaltung „Forschung für die Lehre“ am Fachbereich Veterinärmedizin, Gießen, 20.10.2007

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Impfstoffwerke Dessau-Tornau GmbH.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1	EINLEITUNG.....1
2	SCHRIFTTUM3
2.1	<i>C. perfringens</i> Toxine Beta und Beta2 3
2.1.1	Biologische Aktivität des Beta-Toxins 3
2.1.2	Biologische Aktivität des Beta2-Toxins 4
2.1.3	Die Gewinnung der Toxine..... 6
2.2	Expressionswirte <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>10
2.3	Proteine12
2.3.1	Struktur12
2.3.2	Biologische Aktivität und native Konformation12
2.3.3	Inaktivierung und Denaturierung13
2.4	Mögliche Einflüsse auf die biologische Aktivität von rekombinanten Proteinen14
2.4.1	Expressionswirt14
2.4.2	Sequenzmodifikationen und Affinitätsanhängsel18
2.4.3	Einschlußkörperchen.....20
2.4.4	Temperatur21
2.4.5	Einfrier- und Auftauprozesse.....21
2.4.6	Mechanische und physikalische Einflüsse22
2.4.7	Chemische Interaktionen und Einflüsse des Lösungsmittels24
2.4.8	Sauerstoff25
2.4.9	pH-Wert26
3	MATERIAL UND METHODEN.....28
3.1	Materialien und Versuchstiere28
3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Puffer.....28
3.1.2	Geräte28
3.1.3	Bakterienstämme und GVO28
3.1.4	Zelllinien28
3.1.5	Versuchstiere28

3.1.6	Primer	31
3.2	Bakteriologische Methoden	32
3.2.1	Anzucht von Bakterienstämmen	32
3.2.2	Expression der rekombinanten Toxine in <i>E. coli</i>	33
3.2.3	Expression des rekombinanten Beta2-Toxins in <i>B. subtilis</i>	33
3.2.4	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> mit der CaCl ₂ -Methode	33
3.2.5	Lagerung von Bakterien	33
3.3	Techniken für die <i>in-vitro</i>-Rekombination	34
3.3.1	Freisetzung und Aufreinigung von DNA	34
3.3.2	Bestimmung von Reinheit und Konzentration der DNA	35
3.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.3.4	Agarosegelelektrophorese	36
3.3.5	Restriktionsversuche	36
3.3.6	Ligationsversuche	36
3.3.7	Transformationsversuche	38
3.3.8	Untersuchung der Transformanten mittels PCR und Sequenzierung	39
3.4	Klonierungsstrategien	41
3.5	Proteinpräparative und -analytische Methoden	43
3.5.1	Gewinnung und Aufreinigung der rekombinanten Toxine aus <i>E. coli</i>	43
3.5.2	Teilaufreinigung des rBeta2-Toxins aus WB800N-(pHIT-Vlc-51)-Kulturüberständen	44
3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
3.5.4	SDS-PAGE	44
3.5.5	<i>Strep</i> -Tag® II-Western Blot	45
3.5.6	Immunblot	45
3.5.7	Bio-X Enterotoxämie ELISA Kit	46
3.5.8	Beta2-Toxin-Fangantikörper-ELISA	46
3.5.9	Renaturierungsversuche mit rekombinantem Beta2-Toxin	46
3.6	Zellkulturmethoden	48
3.6.1	Kultivierung der Zelllinien	48
3.6.2	Überprüfung der toxischen Wirkung der rBeta2-Toxine auf Caco-2-Zellen	48
3.6.3	Überprüfung der toxischen Wirkung der rBeta2-Toxine auf IPEC-J2-Zellen	49
3.7	Tierversuche	49
3.7.1	Tierhaltung	49
3.7.2	Injektionstechniken	49
3.7.3	Narkose	49
3.7.4	Belastungsversuche	50

4	ERGEBNISSE.....	51
4.1	Untersuchungen zum Beta-Toxin.....	51
4.1.1	Erzeugung des GVO TOP10F´-(pHIT-Vlc-42).....	51
4.1.2	Nachweis des rekombinanten Beta-Toxins.....	54
4.1.3	Bestimmung der Ausbeute und der Konzentration von rBeta-Präparationen.....	55
4.1.4	Nachweis der biologischen Aktivität des rekombinanten Beta-Toxins im Mausmodell	56
4.2	Untersuchungen zum Beta2-Toxin.....	57
4.2.1	Herstellung von GVO zur rekombinanten Expression des Beta2-Toxins	57
4.2.2	Nachweis von rekombinantem Beta2-Toxin in Expressionsprodukten der GVO	64
4.2.3	Nachweis der biologischen Wirkung der rBeta2-Toxine	71
5	DISKUSSION.....	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	89
7	SUMMARY.....	91
8	ANHANG	92
9	LITERATURVERZEICHNIS	98
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	112
10.1	Abbildungen	112
10.2	Tabellen	115

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	°Celsius
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
BCCP	Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein
GroEL	Chaperon-Protein aus der Hsp60-Familie
K	Kelvin
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
<i>A. deionisata</i>	<i>Aqua deionisata</i>
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
Amp ₁₀₀ ^R	Resistent gegenüber ≤ 100 µg/ml Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCA	Bicinchoninsäure, <i>bicinchoninic acid</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BME	2-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Cam ₃₄ ^R	Resistent gegenüber ≤ 34 µg/ml Chloramphenicol
Cam ₅ ^R	Resistent gegenüber ≤ 5 µg/ml Chloramphenicol
cfu	Koloniebildende Einheiten
<i>cfu</i>	colony forming units
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
<i>cpa</i>	Alpha-Toxigen
<i>cpb2</i>	Beta2-Toxigen
DLM	Dosis letalis minimalis
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i>
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i>
<i>etx</i>	Enterotoxigen
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GVO	Genetisch veränderter Organismus
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
HS-Medium	<i>high salt</i> SMM-Medium
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IDT	Impfstoffwerke Dessau-Tornau
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig –Universität Gießen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

k. A.	keine Angaben
kDa	Kilodalton
kHz	Kiloherz
kV	Kilovolt
l	Liter
LBA	Luria-Bertani-Agar
LBM	Luria-Bertani-Medium
LD ₅₀	letale Dosis 50
LLO	Listeriolysin O
LPS	Lipopolysaccharid
LS-Medium	<i>low salt</i> SMM-Medium
M	molar
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MPa	Megapascal
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NE	Nekrotisierende Enteritis der Saugferkel
ng	Nanogramm
OD ₅₅₀	optische Dichte von 550 Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Puffer E	Elutionspuffer
Puffer W	Waschpuffer
rBeta	rekombinantes Beta-Toxin
rBeta2	rekombinantes Beta2-Toxin
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SCA	antidigoxin single-chain antibody-Fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SMM	Spizizen Minimalmedium Medium
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TPG-Medium	Tryptikase-Pepton-Glucose-Medium
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	internationale Einheiten
z. B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Die *C. (Clostridium) perfringens*-Toxovare A und C haben weltweit große Bedeutung als Erreger von Enteritiden bei Saugferkeln [1-4]. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion versterben die Tiere perakut (bis 2. Lebenstag), erkranken akut (bis 5. Lebenstag) an schweren, im Falle von Toxovar C-Infektionen oft blutigen Durchfällen oder entwickeln bei subakuter Erkrankung (bis 14. Lebenstag) unblutigen, gelblichen, schaumigen Durchfall. Die Morbidität liegt zwischen 30 und 50 %, die Mortalität kann 50 - 100 % erreichen, wobei überlebende Ferkel sich häufig zu Kümmerern entwickeln [2, 5, 6]. Aufgrund der für die akute Verlaufsform typischen hämorrhagisch-nekrotisierenden Veränderungen im Jejunum wird die Erkrankung auch als Nekrotisierende Enteritis (NE) bezeichnet.

Wichtige Virulenzfaktoren der *C. perfringens*-Stämme sind die Majortoxine Alpha (Toxovar A und C) und Beta (Toxovar C), sowie das Minortoxin Beta2. Während vor einigen Jahren bei durchfallkranken Ferkeln überwiegend Typ C-Stämme nachgewiesen wurden, werden heute meist Beta2-toxinogene Typ A-Stämme isoliert [7].

Das Beta2-Toxin ist eines von mindestens 13 Minor-Toxinen, die von *C. perfringens*-Stämmen fakultativ gebildet werden können. Seit seiner Entdeckung 1997 wurden Beta2-Toxin-bildende *C. perfringens*-Stämme mit Enteritiden von Jungtieren zahlreicher Spezies in Verbindung gebracht [7-18]. Besonders beim Ferkel korreliert die Nachweishäufigkeit einer hochkonservierten Beta2-Variante, dem Konsensus-Beta2-Toxin, mit Durchfallerkrankungen [19-22]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem nachweisen, dass *C. perfringens*-Toxovar A-Isolate erkrankter Saugferkel (n=60) deutlich mehr Beta2-Toxin exprimierten als Isolate gesunder Tiere (n=60) [23].

Bei anderen Tierarten wird häufiger das Gen des sogenannten atypischen Beta2-Toxins nachgewiesen, dessen Sequenz mit der des Konsensus-Beta2-Toxins zu 62,3 % identisch ist (Ähnlichkeit 80,4 %) [19]. Seine Bedeutung als Virulenzfaktor ist umstritten, zumal der Gen-Nachweis meist nicht mit dem Auftreten von Erkrankungen korreliert ist [22] und für viele Isolate zumindest *in vitro* die Expression des Toxins nicht nachgewiesen werden konnte [8, 13, 19, 24, 25].

In Deutschland sind für das Schwein zurzeit 6 Impfstoffe mit einer *C. perfringens*-Komponente zugelassen. Sie enthalten Beta-Toxoid und produktionsbedingt Alpha-Toxoid, welches nicht deklariert ist. Keiner der Impfstämme exprimiert Beta2-Toxin.

Als Muttertierschutzimpfung eingesetzt, können die zugelassenen Impfstoffe die Erkrankung der Ferkel häufig nicht verhindern [26]. Deshalb muss die Entwicklung eines Impfstoffes angestrebt werden, der Alpha-, Beta- und Beta2-Toxoid enthält. Hierfür sind aber im Rahmen des Zulassungsverfahrens Wirksamkeitsnachweise für alle 3 Toxine zu führen. Bislang steht nur Alpha-Toxin für Wirksamkeitsprüfungen zur Verfügung (Phospholipase C, Sigma-Aldrich). Die

Reingewinnung von Beta- und Beta2-Toxin bereitet auf Grund ihrer besonderen Empfindlichkeit und der vielen Major- und Minortoxine, die *C. perfringens*-Wildstämme bilden können, Probleme.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die clostridialen Toxine Beta und Beta2 durch rekombinante Überexpression in *Escherichia (E.) coli* und anschließende affinitätschromatographische Aufreinigung in biologisch aktiver, reiner Form zu gewinnen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 *C. perfringens* Toxine Beta und Beta2

2.1.1 Biologische Aktivität des Beta-Toxins

Schon früh wurde vermutet, dass der Wirkmechanismus des Beta-Toxins auf Porenbildung beruht, da Homologien der Sequenz und des Hydropathieprofils zu bekannten Porenbildnern, unter anderem dem Alpha-Toxin von *Staphylococcus aureus*, nachgewiesen wurden [27]. Untersuchungen von Steinthorsdottir, Shatursky und Nagahama belegten, dass Poren mit einem Durchmesser von 1,3 – 1,6 nm gebildet werden, die die Zellintegrität beeinflussen [28–30]. Beta-Toxin-Monomere binden an *Lipid Rafts* von Zellen und bilden die 228 kDa schwere heptamere Beta-Barrel-Pore, die einen Efflux von Kalium und einen Influx von Calcium-, Natrium- und Chloridionen bewirkt [30].

Trotz seiner Verwandtschaft mit anderen Porenbildnern ist Beta-Toxin, nativ und rekombinant gewonnen, nicht wie diese für Erythrozyten und auch ansonsten nur für wenige Zelllinien toxisch. CHO-Zellen wurden von Jolivet-Reynaud *et al.* [31] als empfindlich beschrieben, später stellte sich jedoch heraus, dass die verwendete Toxinpräparation Beta2- und nicht Beta-Toxin enthielt [10]. Zellen der humanen intestinalen Epithelzelllinie I407 zeigten unter Toxineinfluss (0,4 µg/ml) Abrundung. Daher vermuteten Gibert *et al.*, dass der Wirkort des Beta-Toxins das Darmepithel sein könnte [10]. Allerdings gelang es anderen Arbeitsgruppen nicht die Ergebnisse zu reproduzieren [29, 30]. Zudem ist mittlerweile bekannt, dass mit I407-Zellen tatsächlich eine durch Kontamination entstandene HeLa-Zelllinie, also Epithel eines Cervixkarzinoms, untersucht wurde (ATCC® Number: CCL-6™).

Zwei weitere Zelllinien wurden als Beta-Toxin-empfindlich beschrieben. Nagahama *et al.* registrierten Ionenflüsse an HL60-Zellen (Promyelozytenzelllinie), die zum Anschwellen der Zellen und schließlich zum Tod führten [30]. Humane Endothelzellen aus der Nabelvene (HUVEC) reagierten mit einem Verlust von Inositol und Arachidonsäure aus dem Zytoplasma [28]. Nekrosen von Endothelzellen nach Anlagerung des Beta-Toxins konnten auch in immunhistochemischen Studien an natürlich infiziertem Darmgewebe von Mensch und Ferkel beobachtet werden, sodass das Endothel als Zielgewebe identifiziert zu sein scheint [32, 33].

Im Tierversuch zeigte das Beta-Toxin an Mäusen letale Wirkung. Für aufgereinigtes Toxin darf eine Maus-LD₅₀ von ca. 310 ng/kg bei intravenöser bzw. 4,5 µg/kg bei intraperitonealer Applikation angenommen werden [34]. Die intrakutane Injektion von > 2 ng Toxin führte bei Meerschweinchen innerhalb von Stunden zu nekrotischen Veränderungen [34]. In der Haut von Mäusen induzierte Beta-Toxin eine neurogene, durch Aktivierung von Tachykinin NK₁-Rezeptoren vermittelte Plasma-Extravasation [35, 36].

Der Nachweis einer Wirkung des Beta-Toxins im Darm gestaltete sich schwierig. Nekrotische Veränderungen wiesen zwar in einer Reihe von Studien auf eine Bedeutung des Toxins hin [37, 38], konnten aber stets nur mit *C. perfringens*-Kulturen oder „kruden“ Überständen und nicht mit aufgereinigtem Beta-Toxin induziert werden [2, 39]. Erst vor Kurzem gelang in Versuchen am Kaninchendarm, bei denen das aufgereinigte Toxin durch Trypsin-Inhibitoren geschützt wurde, die Reproduktion typischer Läsionen [40, 41], die zudem, wie bei der NE, auf den Dünndarm beschränkt waren [42]. Die Autoren vermuten, dass in Versuchen anderer Arbeitsgruppen geringe Trypsin-Mengen, die auf den Schleimhäuten nach Spülung verblieben, die Inaktivierung des hochempfindlichen Toxins [43] bewirkt haben könnten. Die Verabreichung niedriger Toxindosen (1 µg) führte innerhalb von sechs Stunden zur Akkumulation blutiger Flüssigkeit im Lumen, Nekrose von Epithelium und Lamina propria mucosae, Abstumpfung der Zotten und neutrophiler Infiltration des Gewebes [41].

Die letale Wirkung des Beta-Toxins beruht vermutlich auf einer neurotoxischen Wirkung im Rahmen der Toxämie [32]. Belastungsversuche an Ratten führten nach i. v.-Injektion zur Blutdrucksteigerung bei gleichzeitiger Abnahme der Herzfrequenz, Arteriolenkonstriktion und resultierender Mangeldurchblutung in der Peripherie [44, 45]. Die Autoren vermuten die Ursache der Hypertension in der Wirkung des Toxins auf das autonome Nervensystem, welches über die Freisetzung von Katecholaminen aus sympathischen Nerven und dem Nebennierenmark arterielle Konstriktion in der Körperperipherie und hierdurch den Anstieg des Blutdruckes bewirkt [46].

2.1.2 Biologische Aktivität des Beta2-Toxins

Erste Studien zur Toxizität wurden bereits 1986 veröffentlicht [31], 11 Jahre vor der offiziellen Beschreibung des Toxins durch Gibert *et al.* [10]. Jolivet-Reynaud *et al.* wollten Beta-Toxin aufreinen, gewannen jedoch unbemerkt Beta2-Toxin. Dieser Irrtum beeinflusste auch die Namensgebung des neuen Toxins, welches lediglich hinsichtlich des toxischen Effekts und der Inaktivierungsempfindlichkeit dem Beta-Toxin ähnelt, allerdings auf genetischer Ebene nicht mit ihm verwandt ist (Identität von lediglich 15 %) [10].

Beta2-Toxin ist toxisch für Mäuse, die in Belastungsversuchen Paralysesymptome entwickelten. Die minimale letale Dosis lag nach intravenöser Applikation von Wildtypotoxin bei ~4 µg / Tier [31]. Für ein rekombinantes Produkt wurde eine LD₅₀ von 3 µg / Tier ermittelt [10]. Bei intraperitonealer Injektion besaß rekombinantes Beta2 aus ammoniumsulfatgefälltem Kulturüberstand eine LD₅₀ von 200 µg / Tier [47]. Studien mit intravenös injizierten *C. perfringens*-Kulturüberständen, die verschiedene Major- und Minortoxine enthielten, deuteten eine bestenfalls schwachpositive Korrelation der Beta2-Konzentration mit der letalen Wirkung für Mäuse an [48-51].

Beim Meerschweinchen führte die intradermale Injektion von 2 µg Toxin zur Ausbildung von Hautnekrosen [31]. In ligierten Darmschlingen verursachte die Applikation von 4 µg Beta2-Toxin

innerhalb von 6 Stunden eine Ansammlung klarer Flüssigkeit. Größere Toxinmengen (bis 100 µg) führten bereits nach zwei Stunden zur hämorrhagischen Zerstörung der oberflächlichen Mucosa, sowie zu Ödemen der Submukosa [31].

Die Injektion von rekombinantem, atypischem Beta2-Toxin in die Haut von Kaninchen bewirkte leichte Nekrosen, Ödeme und Leukozytenimmigration. In ligierten Ileumschlingen konnte mit dem Toxin in einigen Fällen eine Abstumpfung und Zerstörung von Zotten provoziert werden, Colonschlingen bildeten zudem vermehrt Schleim [50].

Manteca *et al.* überprüften die Bedeutung des Beta2-Toxins für die Bovine Enterotoxämie [16]. Die von *cpb2*-positiven *C. perfringens*-Stämmen verursachten Läsionen an Darmschlingen von Kälbern waren deutlicher, als die von *cpb2*-negativen und hatten zudem teilweise einen hämorrhagisch-nekrotisierenden Charakter. Das Gewebe war infiltriert mit polymorphkernigen und mononukleären Zellen. Die beobachteten Effekte sind jedoch vermutlich vor allem durch andere Minortoxine verursacht [50].

Auch im Zellkulturassay kann eine biologische Wirkung des Beta2-Toxins beobachtet werden. Während sich viele Zellen gegenüber dem Toxin resistent zeigten (Vero-Zellen, humane und murine Fibroblasten, Hep-Zellen, transformierte Intestinalzellen [31]) wurde für drei Zelllinien ein zytotoxischer Effekt beschrieben.

Für CHO und I407-Zellen konnte eine Abrundung im Phasenkontrastmikroskop und eine Inhibition der Thymidininkorporation nach Inkubation mit 20 µg Toxin / ml beobachtet werden [10]. In ersten Versuchen hatten CHO-Zellen sogar noch deutlich sensibler reagiert (zytotoxischer Effekt bei 0,2 µg Toxin / ml) [31]. Eine dritte Zelllinie, Caco-2-Zellen, zeigte nach Inkubation mit zwei rekombinant gewonnenen Varianten des Beta2-Toxins, dem Konsensus- und dem atypischen Beta2-Toxin, eine Kondensation des Kerns, Zellschwellung, Zeiosis und Ablösung vom Untergrund. Die Reduktion der Zellvitalität auf 50 % wurde durch Inkubation der Zellen mit 0,4 µg atypischem bzw. 6 µg Konsensus-Beta2-Toxin, ihre vollständige Lyse durch Zugabe von 10 µg/ml eines jeden Toxins erreicht [52].

Der Wirkmechanismus des Beta2-Toxins ist bislang nicht geklärt. Gibert *et al.* schlossen eine zytolytische Wirkung des Beta2-Toxins aus, da nach fünfständiger Inkubation mit dem Toxin die Integrität der Zellen in einem Versuch mit inkorporierten Radioisotopen erhalten blieb [31]. Eine Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts und ADP-Ribosylierungs- oder UDP-Glucosylierungs-Aktivitäten, wie sie für verschiedene clostridiale Toxine beschrieben sind, wurden ebenfalls nicht beobachtet [10]. Schon bald nach seiner Entdeckung wurde eine porenbildende Aktivität des Toxins vermutet [53]. Diese würde den beobachteten zytotoxischen Effekt des Toxins, das Anschwellen der Zellen unter blasenartigem Auftreiben ihrer Membranen bis zum Platzen, erklären [50]. Fisher konnte nach Inkubation von Caco-2-Zellen mit rekombinantem Beta2-Toxin eine erhöhte Permeabilität für ⁸⁶Rubidium nachweisen. Durch Zugabe von Dextran (~1500 Da) zum Medium, nicht aber durch Zugabe von Saccharose (~342 Da), konnte die Integrität der

Zellen gewahrt werden. Die Ergebnisse bekräftigen den Verdacht, dass es sich beim Beta2-Toxin um ein membranaktives Toxin, wenn nicht sogar um einen Porenbildner handelt [50].

2.1.3 Die Gewinnung der Toxine

Für beide Toxine wurde die Gewinnung aus *C. perfringens*-Wildtypstämmen beschrieben [31, 54, 55]. Die Reinheit der gewonnenen Präparationen darf jedoch angezweifelt werden, da *C. perfringens* neben dem obligat gebildeten Alpha-Toxin toxovarabhängig auch Epsilon- oder Iota-Toxin bzw. diverse Minor-Toxine exprimieren kann [2, 56, 57]. Werden die coexprimierten Toxine nicht durch eine hochspezifische Aufreinigung entfernt, können sie beispielsweise die Ergebnisse eines Toxizitätsassays beeinträchtigen. Die Verwendung von Defektmutanten oder Toxingenen negativen Stämmen [10, 47, 58] kann die Problematik nur teilweise umgehen, zumal deren vollständiger Toxinstatus meist nicht bekannt ist. Sie müssen meist aufwendig transformiert werden. Einige *E. coli*-*C. perfringens*-Shuttle-Vektoren wurden hierfür entwickelt [59-63], die teils durch konjugativen Transfer vom Zwischenwirt *E. coli* direkt auf den Zielwirt übertragen werden können (pJIR1456 und 57 [63]). Die meisten Transformationsverfahren basieren jedoch auf Elektroporation der Zellen [62, 64, 65], eventuell auch erst im Anschluss an eine Lysostaphinbehandlung [66]. Die Effizienz solcher Protokolle ist stark Vektor- und Wirtszell-abhängig. Jirásková *et al.* [67] erzielten mit *C. perfringens* P90.2.2 und Plasmid pJIR750 eine nur geringe Transformationseffizienz von $1,37 \times 10^4$ cfu/ μ g DNA. Einige Stämme konnten mit gängigen Protokollen überhaupt nicht transformiert werden [64, 66, 68].

Aufgrund der genannten Nachteile werden zur Gewinnung von *C. perfringens*-Toxinen häufig fremde Expressionswirte genutzt.

Da Beta-Toxin leicht zu inaktivieren ist, war seine Reingewinnung, besonders in heterologem Milieu, erschwert. Selbst in Kulturüberständen von *C. perfringens*-Stämmen nimmt die Aktivität bereits mit Erreichen der stationären Wachstumsphase ab [46]. Beta-Toxin ist hochempfindlich gegenüber Proteinasen, kann durch Thiolgruppenreagenten und oxidierenden Agenzien inaktiviert werden und ist thermolabil. Die monomere, toxische Form dissoziiert zudem *in vitro* leicht in eine atoxische oligomere Form, die nicht mehr in der Lage ist, an die Zielzellen zu binden [43, 69].

Steinthorsdóttir *et al.* gelang als ersten die rekombinante Gewinnung von biologisch aktivem Beta-Toxin in einem heterologen Expressionswirt. Mit dem *E. coli*-*B. subtilis*-Shuttle Vektor pHB201 übertrug er die Nukleotide 58-1343 der von Hunter [27] veröffentlichten Sequenz, also das Toxin inklusive Signalpeptid, Promoter-Region und Ribosomen-Bindungs-Bereich, auf *B. subtilis* 1S53. Beta-Toxin konnte anschließend im Medium der Transformantenkulturen detektiert werden. Die LD₅₀ des Produktes war bei i. v.-Applikation um den Faktor 4 niedriger (1,1 μ g / kg) als die von Sakurai *et al.* [34] für Wildtyp-toxin ermittelte, entsprach allerdings der eines Wildtyp-Beta-Toxins aus eigener Aufreinigung [70].

Von Hunter *et al.* gewonnenes Beta-Toxin (pUC19, Expression ins Periplasma von *E. coli* JM109) lag überwiegend in polymerer Form vor und besaß keine Aktivität [27]. Ein als GST-Fusionsprotein mit Hilfe von Vektor pGEX-3X exprimiertes Toxin zeigte nach affinitätschromatographischer Aufreinigung ebenfalls keine letale Wirkung in der Maus, auch nicht nachdem das N-terminale GST-Anhängsel proteolytisch (Faktor Xa) entfernt wurde [71]. Nagahama *et al.* vermuteten die Ursache in am Toxin verbliebenen Aminosäuren der Proteaseschnittstelle [72]. Später gelang mit dem Vektor pGEX-4T-1 die Expression von GST-Beta-Toxin, welches nach Entfernung des N-terminalen Tags durch Thrombinverdau bei intravenöser Applikation eine dem Wildtypotoxin entsprechende letale Wirkung für Mäuse hatte [30, 34]. Ein analog mit Vektor pGEX-4T-2 gewonnenes Produkt einer anderen Arbeitsgruppe besaß hingegen nach Entfernung des GSTs und intraperitonealer Applikation eine deutlich geringere (25 µg / kg) biologische Aktivität als das Wildtypotoxin [29, 34].

Auch für das Beta2-Toxin wurde die rekombinante Gewinnung in heterologen Expressionssystemen angestrebt. Bislang gelang jedoch lediglich mit *C. perfringens*-Stämmen die Gewinnung eines biologisch aktiven Produktes. Sämtliche Beta2-Toxine, die in *E. coli*- und *B. subtilis*-Expressionssystemen exprimiert wurden, waren inaktiv (Tabelle 1) was vermutlich in der Empfindlichkeit des Beta2-Toxins gegenüber äußeren Einflüssen begründet ist.

Gibert *et al.* beobachteten einen Aktivitätsverlust während der Aufreinigung, der auch durch Zugabe der Antiprotease Benzamidin (2 µg / ml) oder Glycerin (50 %) nicht zu verhindern war [10]. Vilei *et al.* verzichteten für Untersuchungen an Mäusen auf die Aufreinigung von Beta2-Toxin aus Kulturüberständen, da sie zur schnellen Inaktivierung führte [47]. Fisher bemerkte schon nach längerem „Vortexen“ oder wiederholtem Schwenken der Toxinlösung einen Einfluss auf die Aktivitätsassays und führte Untersuchungen zur Empfindlichkeit des Toxins durch [50]. Besonders die schnelle Inaktivierung durch Wärme war überraschend. Bei Temperaturen $\geq 45\text{ °C}$ verlor das rekombinante Toxin innerhalb von 20 Minuten seine Aktivität vollständig, aber auch bei 37 °C konnte noch ein deutlicher Aktivitätsverlust beobachtet werden. Bei Temperaturen von 30 und 22 °C war das Toxin über den Beobachtungszeitraum stabil.

Um die Sauerstoffempfindlichkeit des Beta2-Toxins zu überprüfen erhöhte Fisher den Lufteintrag in die Proteinlösung durch starkes Schwenken auf einem Schüttler (37 °C , 240 rpm). Innerhalb von fünf Minuten verlor die Probe ihre Toxizität für Caco-2-Zellen. Der Mechanismus dieser Inaktivierung ist ungeklärt. Eine Oxidation von Cysteinresten scheint unwahrscheinlich, da reduzierende Agenzien (DTT, L-Cystein, BME) den Aktivitätsverlust nicht begrenzen konnten.

Tabelle 1: Übersicht über die in der Literatur beschriebenen, rekombinant exprimierten Beta2-Toxine

Expressionswirt	Vektor	cpb2-Signalpeptid	Tag C-terminal	Tag N-terminal	Expressionsort	Angaben zur Gewinnung	Biologische Aktivität / Bemerkungen	Quelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pETHIS-1	-	His	His	Zytoplasma	k. A. zum Zellaufschluss, Affinitätschromatographie	k. A.	[14]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pTrcHis B	-	-	His	Zytoplasma	French press, Affinitätschromatographie	k. A.	[8]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pGEX-2T	+	GST	-	Zytoplasma	Ultraschall, Filtrierung, k. A. zur Affinitätschromatographie	keine Aktivität	[50]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pBAD	+	-	His	Zytoplasma	Ultraschall, Filtrierung, k. A. zur Affinitätschromatographie	keine Aktivität	[50]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pBAD	-	-	His	Zytoplasma	Ultraschall, Filtrierung, k. A. zur Affinitätschromatographie	keine Aktivität	[50]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pBAD/Thio-TOPO	+	Thioredoxin	His	Zytoplasma	Ultraschall, Filtrierung, k. A. zur Affinitätschromatographie	keine Aktivität	[50]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pBAD/Thio-TOPO	-	Thioredoxin	His	Zytoplasma	Ultraschall, Filtrierung, k. A. zur Affinitätschromatographie	keine Aktivität	[50]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pMAL-c2	+	MBP	-	Zytoplasma	Ultraschall, Filtrierung, k. A. zur Affinitätschromatographie	keine Aktivität	[50]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pMAL-c2	-	MBP	-	Zytoplasma	Ultraschall, Filtrierung, k. A. zur Affinitätschromatographie	keine Aktivität	[50]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pTrcHisB	+	His	-	Zytoplasma	Ultraschall, Filtrierung, k. A. zur Affinitätschromatographie	keine Aktivität	[50]
<i>C. perfringens</i> TypA ATCC 3624	pJIR751	+	-	-	Kulturbedstand	Ammoniumsulfatfällung, Dialyse, Ionenaustauschchromatographie	toxisch für Caco-2-Zellen	[50, 52]
<i>C. perfringens</i> TypA ATCC 3624	pJIR750	+	-	-	Kulturbedstand	Ammoniumsulfatfällung, Dialyse, Ionenaustauschchromatographie	toxisch für Caco-2-Zellen	[50, 52]
<i>C. perfringens</i> 667-76 Alpha-Toxin-Defektmutante	pAT19	+	-	-	Kulturbedstand	Ammoniumsulfatfällung, Dialyse, Anionenaustauschchromatographie, Isoelektrofokussierung, Ultrafiltration, Gelpermeationschromatographie	toxisch für Mäuse, CHO- und I407-Zellen	[10]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pGEX-4T	-	-	GST	Zytoplasma	Ultraschall, Affinitätschromatographie, Abspaltung des Tags mittels Thrombin	k. A.	[73]
<i>C. perfringens</i> F4969 [cpe]	pJIR751	+	-	-	Kulturbedstand	Ammoniumsulfatfällung	k. A.	[74]

Fortsetzung Tabelle 1

Expressionswirt	Vektor	cpb2-Signalpeptid	Tag C-terminal	Tag N-terminal	Expressionsort	Angaben zur Gewinnung	Biologische Aktivität / Bemerkungen	Quelle
<i>E. coli</i> DH5alpha	pTrcHis B	-	-	His	Zytoplasma	k. A. zum Zellaufschluss, Affinitätschromatographie	k. A.	[19]
<i>E. coli</i> DH5alpha	pBLTS-72	-	-	-	Periplasma	Osmotischer Schock, Ultraschall	keine (Auskunft der Autorn)	[24]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pBLTS-72	-	-	-	Periplasma	Osmotischer Schock, Ultraschall	keine (Auskunft der Autorn)	[75]
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	pBLTS-72	-	-	-	Periplasma	Osmotischer Schock, Ultraschall	keine (Auskunft der Autorn)	[75]
<i>B. subtilis</i> ATCC 23867 = 168	pBLTS-72	-	-	-	Kulturbedstand	2 x Anionenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie, 2 x Dialyse	keine (Auskunft der Autorn)	[24]
<i>B. subtilis</i> 168 IS10	pBLTS-72	-	-	-	Kulturbedstand	2 x Anionenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie, 2 x Dialyse	keine (Auskunft der Autorn)	[75]
<i>B. subtilis</i> 168 IS10	pAC7	-	-	-	Kulturbedstand	2 x Anionenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie, 2 x Dialyse	keine (Auskunft der Autorn)	[75]
<i>E. coli</i> BL21	pET15b	k. A.	-	His	Zytoplasma	k. A. zum Zellaufschluss, Affinitätschromatographie	k. A.	[76]
<i>C. perfringens</i> 667-76 Alpha-Toxin-Defektmulante	pAT18	+	-	-	Kulturbedstand	Ammoniumsulfatfällung, Dialyse	toxisch für Mäuse	[47]
<i>C. perfringens</i> 667-76 Alpha-Toxin-Defektmulante	pAT19	+	-	-	Kulturbedstand	Ammoniumsulfatfällung, Dialyse	toxisch für Mäuse	[47]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pETHIS-1	-	His	His	Zytoplasma	Ultraschall, 6 M Guanidinhydrochlorid, Affinitätschromatographie, Dialyse	k. A.	[47]
<i>C. perfringens</i> 106902	pJIR751	+	-	-	Kulturbedstand	Ammoniumsulfatfällung	k. A.	[77]
<i>C. perfringens</i> 106903	pJIR751	+	-	-	Kulturbedstand	Ammoniumsulfatfällung	k. A.	[77]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pETX	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	Fusionsprotein Beta-Beta2	[78]

k. A. = keine Angaben

2.2 Expressionswirte *E. coli* und *B. subtilis*

E. coli ist, trotz der Überlegenheit anderer Expressionssysteme, das heutzutage immer noch meistgenutzte Bakterium zur industriellen Produktion pharmazeutischer Produkte [79]. Viele Eigenschaften machen *E. coli* für die rekombinante Gewinnung von Proteinen interessant [80]. Die meisten Expressionsstämme sind einfach, schnell und kostengünstig zu vermehren. *E. coli* besitzt zwar keine natürliche Kompetenz, kann aber nach Inkubation mit zweiwertigen Ionen oder Elektroporation hocheffizient transformiert werden. Das *E. coli*®-System von Lucigen beispielsweise erreicht eine Effizienz von $> 4 \times 10^{10}$ cfu/μg DNA. Zudem ist *E. coli* gut charakterisiert. Sein Genom wurde als eines der ersten bakteriellen Genome vollständig entschlüsselt [81]. *E. coli*-Feldisolate gehören zwar gemäß „Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten“ [82] der Risikogruppe 2 an. Einzelne Laborstämme sind jedoch der Risikogruppe 1 zugeordnet, wodurch resultierende gentechnisch veränderte Organismen (GVO) leichter zu handhaben sind. *E. coli* K12 und seine Derivate beispielsweise haben die Fähigkeit zur Darmbesiedlung verloren und ihre Nutzung gilt als biologische Sicherheitsmaßnahme im Sinne der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (§ 6).

Um das Spektrum der in *E. coli* exprimierbaren Proteine zu erweitern ist mittlerweile eine Vielzahl von Stämmen mit besonderen Eigenschaften erhältlich. BL21 beispielsweise ist nicht in der Lage die *E. coli*-Proteasen Lon und OmpT zu bilden, die rekombinante Proteine degradieren können. Rosetta-gami™ 2 begünstigt die Ausbildung von Disulfidbrücken und synthetisiert seltene t-RNAs, wodurch er sich zur Expression von Genen mit spezieller *Codon Usage* eignet.

Ein großer Nachteil von *E. coli*, wie auch von allen anderen Gram-negativen Wirten ist die Verunreinigung der Expressionsprodukte durch Endotoxine (LPS) die als Bestandteil der äußeren Membran beim Zellaufschluss mit den rekombinanten Proteinen freigesetzt werden. Um eine Beeinflussung biologischer Assays zu vermeiden können die Endotoxine z. B. durch Ionenaustauscher aus der Lösung entfernt [83] oder die Zielproteine affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Außerdem sind mittlerweile LPS-Mutanten mit stark reduzierter Endotoxizität erhältlich [84].

Bacillus subtilis hat herausragende Bedeutung für die kommerzielle Gewinnung vieler Enzyme [85]. Die genetischen und physiologischen Eigenschaften sind besser erforscht als bei allen anderen Gram-positiven Bakterien. Das vollständig sequenzierte Genom von Stamm 168 wurde 1997 von Kunst *et al.* veröffentlicht [86]. Schumann benennt sechs Eigenschaften, die *B. subtilis* als Expressionswirt interessant machen [87].

B. subtilis

- ist nicht pathogen (wird sogar in der traditionellen Lebensmittelherstellung eingesetzt),
- bildet keine Endotoxine,

- besitzt „*generally recognized as safe*“-Status bzw. gehört zur Risikogruppe 1 [82],
- besitzt eine zur Expression von Fremdproteinen günstige *Codon Usage*,
- ist gut erforscht, z. B. sind viele Daten über Transkriptions- und Translationsmechanismen, genetische Manipulation und Fermentation zugänglich und
- kann Proteine effizient ins Medium sezernieren (bis 20 g/l).

Abhängig vom Produkt und dessen weiterer Verwendung kann der letzte Punkt von Vor- wie auch von Nachteil sein. Das Expressionsprodukt liegt im Kulturüberstand zwar relativ rein aber häufig auch gering konzentriert vor, was zusätzliche Konzentrierungsschritte notwendig macht.

Wie bei allen Expressionssystemen kann die Ausbeute heterologer Expressionsprodukte gering ausfallen. Li *et al.* [88] machen hierfür neben Problemen im Rahmen der Transkription, der Proteinfaltung und -translokation sowie der Prozessierung des Signalpeptids vor allem bazilläre Proteasen verantwortlich, die rekombinante Proteine degradieren. Deshalb wurden sukzessiv acht bekannte Proteasen eliminiert und hierdurch Stamm WB800 erzeugt [89-93], dessen Kulturüberstand praktisch keine proteolytische Aktivität mehr besitzt (2.4.1.2).

Zur Transformation von *B. subtilis*-Stämmen kann man sich die natürliche Kompetenz vieler Stämme zu Nutze machen, die sie befähigt unter bestimmten Bedingungen DNA zu binden und aufzunehmen [94]. Auch durch Elektroporation gelingt die Transformation von *B. subtilis*. Ein von Xue *et al.* etabliertes Protokoll erreicht eine Effizienz von $1,4 \times 10^6$ cfu/ μ g DNA [95].

Ein großer Nachteil des Expressionswirts *B. subtilis* ist die mangelhafte strukturelle Stabilität von internalisierten Plasmidvektoren [96]. Als kritischer Faktor wurde der Replikationsmechanismus der Plasmide identifiziert. Die meisten Expressionsplasmide replizieren im *Rolling-Circle*-Modus. Als Zwischenprodukt der Replikation entsteht hierbei Einzelstrang-DNA, die anfällig für Deletionsereignisse ist [96-98]. Neu entwickelte Vektoren, wie der in dieser Arbeit verwendete pHT01, replizieren im Theta-Modus und gelten als stabil [87, 99]. Alternativ kann die Problematik durch die Integration der Insert-DNA ins bakterielle Chromosom umgangen werden.

Für die Klonierung clostridialer Produkte ist *B. subtilis* aufgrund der engeren Verwandtschaft zu *C. perfringens* besser geeignet als *E. coli*. Die Expressionsbedingungen ähneln denen im Herkunftswirt. Beide Spezies gehören zum Stamm der Firmicutes und sind Sporenbildner. Bazilläre und clostridiale Membran bzw. Zellwand ähneln sich im Aufbau. Zudem sind die zentralen Komponenten des Protein-Translokations-System hochkonserviert. So konnte beispielsweise rekombinantes Beta-Toxin, von Steinhorsdottir *et al.* in *B. subtilis* überexprimiert, durch ein clostridiales Signalpeptid direkt ins Medium geschleust werden [70].

2.3 Proteine

2.3.1 Struktur

Um den komplexen Aufbau von Proteinen zu beschreiben unterscheidet man hierarchische Strukturebenen. Als Primärstruktur eines Proteins bezeichnet man die Sequenz seiner Aminosäuren. Diese werden im Rahmen der Translation unter Abspaltung von Wasser durch Peptidbindungen verknüpft und bilden eine unverzweigte Kette, die die gesamte Strukturinformation enthält [100]. In der Peptidbindung besitzt das Wasserstoffatom am Stickstoff eine positive, der doppeltgebundene Sauerstoff eine negative Polarität. Zwischen diesen Gruppen können sich daher energetisch günstige Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Um die maximal mögliche Zahl dieser nicht-kovalenten Bindungen einzugehen, entstehen, abhängig von den funktionellen Gruppen der Aminosäuren, unterschiedliche dreidimensionale Anordnungen wie Helix- und Faltblattstrukturen, die als Sekundärstrukturelemente bezeichnet werden. Die nächsthöhere Organisationsstufe, die Tertiärstruktur, wird vor allem von den Kräften und Bindungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren bestimmt. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und durch hydrophobe und ionische Interaktionen (Salzbrücken) sowie Van-der-Waals-Kräfte erlangen die Sekundärstrukturelemente die für das Protein typische räumliche Anordnung [101, 102]. Außerdem können zwischen Cysteinseitenketten Disulfidbrücken, die einzigen kovalenten Bindungen, die der Stabilisierung der Struktur dienen, ausgebildet werden [101]. Zusätzlich zur Tertiärstruktur besitzen manche Proteine einen weiteren Organisationsgrad, die sogenannte Quartärstruktur. Bei dieser treten mehrere Untereinheiten zu einer Funktionseinheit zusammen. Für die Struktur eines Proteins können zudem Metallionen bedeutend sein. Die sogenannten Metalloproteine enthalten ein oder mehrere Metallionen (z. B. Mg^{2+} , Ca^{2+} oder Fe^{2+}). Dreißig Prozent aller Enzyme, vor allem Oxidoreduktasen und Hydrolasen, besitzen Metallionen als prosthetische Gruppe. In anderen Proteinen dienen sie häufig der Komplexierung verschiedener Gruppen des Proteinanteils und bewirken so eine Stabilisierung.

2.3.2 Biologische Aktivität und native Konformation

Als Synonym für die Funktion eines Proteins wird häufig der Begriff „biologische Aktivität“ verwendet. Sie ist an eine spezifische dreidimensionale Struktur gebunden, die als native Konformation bezeichnet wird. Von den vielen alternativen Konformationen eines Proteins führt häufig nur diese, unter physiologischen Bedingungen meist stabilste, die spezifische biologische Funktion aus. Die Proteinfaltung zur nativen Konformation ist ein komplexer, vor allem von hydrophoben Kräften getriebener Prozess. Achtzig Prozent der unpolaren, hydrophoben Seitenketten werden im Proteininneren verborgen und so ein energetisch ungünstiger Kontakt mit dem Lösungsmittel Wasser vermieden [103].

2.3.3 Inaktivierung und Denaturierung

Die Inaktivierung eines Proteins, der Verlust seiner biologischen Aktivität, kann durch chemische Modifikationen der Aminosäureseitenketten (2.4.7-2.4.9) und durch Sequenzmodifikationen (2.4.2) bedingt sein. Häufig ist der Aktivitätsverlust jedoch auf die Veränderung der Konformation, die sogenannte Denaturierung, zurückzuführen.

Protein-Denaturierung bezeichnet eine prinzipiell reversible Veränderung der Sekundär-, Tertiär- bzw. Quartärstruktur [104]. Die chemische Integrität des Proteins bleibt hierbei gewahrt. Eine Neuordnung der Disulfidbrücken (Redoxreaktion) oder die Aggregatbildungen sind keine Denaturierungsvorgänge im engeren Sinn, werden jedoch häufig in die Definition miteinbezogen [105].

Denaturierte Proteine liegen nicht in einer einzelnen, starren Konformation vor. Es existieren nebeneinander eine Vielzahl unterschiedlicher Faltungsvarianten mit ähnlichen Energiebilanzen, die miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht stehen [106, 107]. Die Charakterisierung dieses „Konformationsgemisches“ bereitet häufig Schwierigkeiten. Seine Heterogenität erlaubt auch unter definierten äußeren Bedingungen lediglich die grobe Bestimmung von beispielsweise Packungsdichte oder hydrodynamischem Volumen sowie den Nachweis residueller Sekundärstrukturelemente [108]. Welches Gleichgewicht sich zwischen verschiedenen Proteinkonformationen einstellt hängt von der Sequenz des Proteins und den äußeren Bedingungen (Lösungsmittel, Temperatur, Druck etc.) ab [106].

Mild denaturierte Proteine sind meist hochkompakt und besitzen eine deutlich ausgebildete Sekundärstruktur. Die Beweglichkeit von Segmenten der Polypeptidkette ist erhöht, einzelne Gruppen können um Einfachbindungen rotieren und Wasserstoff-Brückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen sowie Disulfidbrücken verlieren die Stabilität. Manche Proteine bilden dem „molten globule“-Zustand ähnliche Konformationen [108].

Mit zunehmendem Grad der Denaturierung wird die Sekundärstruktur angegriffen und die Wasserstoffbrückenbindungen, die die Helix- und Faltblattstrukturen fixieren, werden gelöst.

Erst unter extremen Bedingungen liegt das Protein teilweise als sogenannte „random coil“ vor. Die Seitenketten der Aminosäuren sind frei beweglich. Sekundärstrukturelemente sind nicht mehr vorhanden [109].

Obwohl die chemische Integrität durch die Denaturierung nicht angegriffen wird sind viele Vorgänge *in praxi* irreversibel. Kleine Proteine falten sich eventuell spontan zurück, wenn der denaturierende Einfluss entfernt wird. Größeren, globulären Proteinen mit komplexer Tertiärstruktur hingegen gelingt dies häufig nicht [110].

2.4 Mögliche Einflüsse auf die biologische Aktivität von rekombinanten Proteinen

2.4.1 Expressionswirt

2.4.1.1 Chaperone und Faltungskatalysatoren

Seit Beginn der Neunziger Jahre ist bekannt, dass die Faltung von Proteinen in der Zelle katalysiert abläuft. Hierfür notwendige Proteine sind Chaperone und Faltungskatalysatoren (Enzyme) [101]. Chaperone sind Proteine, die Lösungsmittel-exponierte, hydrophobe Bereiche anderer Proteine binden und dadurch ihre Aggregation verhindern bzw. ihre korrekte Faltung unterstützen ohne hierbei kovalente Reaktionen zu katalysieren. Sie unterstützen die *de novo* Faltung von Proteinen, die Rückfaltung beschädigter Proteine, die Disaggregation thermal aggregierter Proteine, den Export von Proteinen aus dem Zytoplasma und die Degradation geschädigter Polypeptide. Sie assistieren bei der Strukturbildung und verhindern unproduktive Nebenreaktionen, ohne Teil der finalen Struktur zu sein [111, 112].

Chaperone können in drei funktionelle Subklassen eingeteilt werden. Faltungs-Chaperone unterstützen aktiv die Netto-Rückfaltung gebundener Substrate, Holdasen binden partiell gefaltete Proteine auf ihrer Oberfläche und führen sie Faltungs-Chaperonen zu und Disaggregasen entflechten aggregierte Proteine. Faltungskatalysatoren (Foldasen) sind Enzyme mit einer klar definierten katalytischen Aktivität, die der Beschleunigung von kovalenten Schritten in der Faltung dienen. Für Einzelheiten wird auf die einschlägige Literatur verwiesen [113]. Die meisten zytoplasmatischen Chaperone und Faltungskatalysatoren sind Hitzeschockproteine und werden unter Anderem bei Expressionsstress im Rahmen der rekombinanten Überexpression vermehrt gebildet.

E. coli und *B. subtilis*-Expressionswirte die verstärkt Faltungshelfer exprimieren, verbessern häufig die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein. Es ist bislang jedoch nicht möglich einen positiven Effekt sicher zu prognostizieren. Der effektivste Ansatz bleibt daher das *Screening* verschiedenster, Chaperone-überexprimierender Stämme auf erhöhte Löslichkeit und Aktivität der rekombinanten Produkte [113].

Die am besten charakterisierten Chaperon-Systeme im Cytoplasma von *E. coli* sind das DnaK-DnaJ-GrpE- und das GroEL-GroES-System. Weitere wichtige Faltungsmediatoren sind ClpB, IbpA-IbpB, HtpG, Hsp33, Hsp31, SlyD-SlpA sowie der Trigger Factor [113]. Es werden jedoch ständig neue Proteine identifiziert, denen eine faltungsmodulierende Wirkung zugeschrieben wird [114]. Im Rahmen der Überexpression rekombinanter Proteine kann die Zahl der Faltungshelfer limitierend sein. Die Faltungsmaschinerie ist überlastet, die neu gebildeten, ungefalteten Proteine akkumulieren und aggregieren in der Zelle [115]. Deshalb wurden eine Vielzahl von Expressionsstämmen entwickelt, die verstärkt Chaperone exprimieren (z. B. [116-118]), was die Ausbeute an nativem rekombinantem Protein in vielen Fällen verbesserte [119-123]. Allerdings ist der Erfolg abhängig vom Expressionsprodukt und wie bereits erwähnt nicht

prognostizierbar [124]. Während beispielsweise die Ausbeute von Transglutaminase durch DnaK und DnaJ-Coexpression verbessert wird [125], wurde Adrenodoxin-Reduktase vor allem durch Überexpression von GroEL/GroES vermehrt in nativer Konformation gewonnen [126]. Die biologische Aktivität anderer Proteine wurde optimal durch die Faltungshelfer DnaK-DnaJ, Trigger Factor, GroEL-GroES oder Kombination der Genannten gefördert [113, 118, 127].

Auch im Periplasma von *E. coli* sind Faltungshelfer lokalisiert, die die biologische Aktivität und Löslichkeit rekombinanter Proteine verbessern können. Die größte Bedeutung scheint Skp und FkpA zuzukommen [113], aber auch die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen SurA und PpiD fördern die Faltung von instabilen oder zur Aggregation neigenden Proteinen [128]. Die Bedeutung von Disulfid-Isomerasen der Dsb-Gruppe für Proteine mit multiplen Disulfidbrücken wird unter 2.4.1.4 erörtert.

B. subtilis besitzt wie *E. coli* ein *groE*- (*groES*–*groEL*) und ein *dnaK*-Operon (*hrcA*–*grpE*–*dnaK*–*dnaJ*–*yqeT*–*yqeU*–*yqeV*) [129, 130]. Beide sind durch den HrcA-Repressor reguliert. Durch Deletion des Repressorgens kann relativ leicht die konstitutive Überexpression der Chaperone erreicht werden [90, 131–133]. Mit einem biologisch aktivem *antidigoxin single-chain antibody*-Fragment (SCA) wurde eine Reihe von Studien über die Bedeutung der Chaperone in *B. subtilis* durchgeführt. Bei der Überexpression von SCA in den Kulturüberstand kommt es zur Bildung von Einschlusskörperchen im Zytoplasma [134]. Durch Verwendung eines Stammes mit inaktiviertem *hrcA*-Gen konnte die Sekretion von SCA nahezu verdoppelt und die Aggregation im Zytoplasma reduziert werden. Ein weiterer Faltungshelfer von *B. subtilis* ist vermutlich PrsA, welches auf der Außenseite der Zellmembran verankert ist [135–137]. Durch Coexpression von PrsA konnten Wu *et al.* die Ausbeute von löslichem SCA im Medium und Zytoplasma erhöhen [89, 90].

2.4.1.2 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die die Primärstruktur von Proteinen zerstören, indem sie die Peptidbindung hydrolysieren. Bakterien nutzen Proteasen unter anderem zum Abbau von fehlgefalteten, mutierten oder verkürzten Proteinen, sowie Proteinen mit abnormaler Aminosäurezusammensetzung [138, 139]. Rekombinante, heterologe Proteine besitzen daher häufig eine deutlich geringere Halbwertszeit als wirtseigene Proteine. Viele intrazelluläre Proteasen gehören zur Gruppe der Hitzeschockproteine und werden verstärkt gebildet, wenn die Zelle einem Stress, wie beispielsweise der Akkumulation fremder Proteine, ausgesetzt ist (2.4.3).

Um ihre Aktivität zu verringern kann die Expressionstemperatur erniedrigt, der pH-Wert verändert oder chemische Agenzien hinzugegeben werden. Solche Maßnahmen beeinträchtigen jedoch oft auch die strukturelle Integrität rekombinanter Proteine, weshalb bevorzugt spezifische Proteaseinhibitoren, z. B. für Serin-Proteasen Aprotinin oder für Metalloproteasen Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), eingesetzt werden. Schutz vor

Proteolyse bieten außerdem Maßnahmen, die zur Stabilisierung der nativen Konformation eines Expressionsproduktes führen, da ein korrekt gefaltetes Produkt weniger Angriffsflächen für Proteasen besitzt [113]. Sowohl in *E. coli* als auch in *B. subtilis* konnten Expressionsstämme mit deutlich reduzierter proteolytischer Aktivität durch *Knockout* von Protease-Genen erzeugt werden.

Im *E. coli* K12-Genom wurden über 72 Proteine mit proteolytischer Aktivität identifiziert, mindestens 20 davon werden ins Zytoplasma exprimiert [140]. An der Degradation fehlgefalteter Proteine im Zytoplasma sind vor allem die Proteasen Lon, ClpYQ, ClpAP, ClpXP und FtsH beteiligt [141, 142]. Die entsprechenden *Knockout*-Mutanten eignen sich häufig aufgrund schlechter Wachstumseigenschaften nur eingeschränkt als Expressionswirte [143, 144]. Zudem führt die verminderte Expression einzelner Proteasen vermutlich zur verstärkten Expression der anderen [113]. Häufige Verwendung finden natürliche Lon-negative Defektmutanten wie BL21 und seine Abkömmlinge [113].

Auch im Periplasma von *E. coli* sind eine Vielzahl von Proteasen aktiv [142]. Diese dienen vor allem der Abspaltung von Signalsequenzen exportierter Proteine. Hauptverantwortlich für die Degradation rekombinanter Proteine sind die Proteasen OmpT, HtrA, DegQ, DegS, DegP, Ptr und Prc [113]. Durch Verwendung von ompT-defizienten K-12-Stämmen oder BL21-Stämmen kann der proteolytische Abbau reduziert werden. Bei sensitiven Proteinen kann auch der Einsatz degP-defizienter Wirte sinnvoll sein [113]. Zudem existieren Mutanten mit unterschiedlichsten Deletionsmustern, deren Wachstumsverhalten allerdings ebenfalls oft beeinträchtigt ist [145-147].

Häufiger als bei *E. coli* werden Proteasen bei der Expression in *B. subtilis* zum Problem. Die SubtiList-Datenbank enthält 24 Einträge für Proteasen (plus 6 putative) sowie 20 für Peptidasen (plus 21 putative) [79]. Ins Zytoplasma werden unter anderem Orthologa zu den *E. coli* Proteasen Lon [148, 149], HtrA [150] und FtsH [151] exprimiert. Da *B. subtilis* jedoch meist zur Expression ins Medium genutzt wird sind extrazelluläre Proteasen von weit größerer Bedeutung [152-154]. Diese liegen löslich zwischen Zellwand und Membran sowie frei im Medium vor (AprE, NprE, Epr, Mpr, Bpr, NprB, Vpr, HtrA) oder sind in der Zellwand und auf der Außenseite der Membran verankert (WprA) und degradieren die ins Medium sezernierten Fremdproteine [89, 155]. Acht extrazelluläre Proteasen konnten durch sukzessiven *Knockout* eliminiert werden. Der resultierende Expressionsstamm WB800 [89] bildet mit HtrA nur noch eine teilweise extrazellulär lokalisierte, eher unbedeutende Protease [156]. Der Stamm ist etwas sensibler als Wildtypstämme und es kann bereits zu Beginn der postexponentiellen Wachstumsphase zur lysisbedingten Freisetzung zytoplasmatischer Proteasen kommen [157]. Trotzdem ist die proteolytische Aktivität des Mediums von WB800 gegenüber Wildtypstämmen auf 0,15 % reduziert, sodass sich der Stamm besonders zur Expression sensibler Proteine eignet [158].

2.4.1.3 Expressionskompartimente Zytoplasma, Periplasma und Medium

Die Synthese aller Proteine erfolgt an den Ribosomen des Zytoplasmas. Im Rahmen der rekombinanten Expression kann ein vektorkodiertes Signalpeptid angefügt und somit das Zielkompartiment beeinflusst werden. Mögliche Auswirkungen der Expression in die unterschiedlichen Kompartimente von *B. subtilis* und *E. coli* werden auch in 2.3.1.2 und 2.4.1.4 behandelt.

In Gram-negativen Bakterien gelangen mit einem Signalpeptid versehene Produkte in den periplasmatischen Raum. Beispielsweise kann unter Nutzung einer OmpA-Sequenz ein Protein ins Periplasma von *E. coli* geschleust werden. Neuere Expressionssysteme ermöglichen auch die Überwindung der zweiten, periplasmatischen Membran. Mittels OmpF-Sequenz gelang Nagahari *et al.* die Sekretion von humanem Beta-Endorphin ins Medium von *E. coli* [159]. Eine Übersicht über die Eigenschaften der unterschiedlichen Expressionskompartimente von *E. coli* bietet Tabelle 2. Detaillierte Informationen enthält auch ein Übersichtsartikel von Makrides [160]. Gram-positive Bakterien besitzen keine äußere Membran. Dies erleichtert die Expression ins Medium und garantiert zudem die Abwesenheit von Endotoxin. Sekretionsproteine gelangen nach Diffusion durch die proteindurchlässige Zellwand direkt ins Medium. In diesem befinden sich eine Reihe von Proteasen, die die Degradation rekombinanter Produkte bedingen können (2.4.1.2). Ansonsten sind die Vor- und Nachteile einer Expression in die beiden Kompartimente Zytoplasma und Medium mit denen von *E. coli* vergleichbar (Tabelle 2).

Tabelle 2: Vor- und Nachteile der Expressionskompartimente von *E. coli* [140]

Kompartiment	Vorteile	Nachteile
Zytoplasma	Bildung von „Inclusion Bodies“, damit leichtere Isolierung, Schutz vor Proteasen, Expression wirtstoxischer Proteine möglich; Ungünstige Bedingungen für Disulfidbrücken; Hohe Proteinausbeute möglich; Starke Konzentrierung des Produktes	Bildung von „Inclusion Bodies“, damit geringere Ausbeute von biologisch aktivem Protein, höhere Kosten; Methionin am N-Terminus; Ungünstige Bedingungen für Disulfidbrücken; Starke Proteolyse; Aufreinigung aus Zellysats sehr aufwendig
Periplasma	Günstige Bedingungen für Disulfidbrücken; Einfache Aufreinigung nach Aufschluss des Periplasmas; Proteolyse geringer; Authentischer N-Terminus; Verbesserte Faltung	Günstige Bedingungen für Disulfidbrücken; Bildung von Inclusion Bodies möglich; Transport funktioniert nicht generell
Medium	Reinigung sehr einfach; Geringste Proteolyse; Verbesserte Faltung; Authentischer N-Terminus	Schwache Konzentrierung des Produktes; Sekretion funktioniert nicht generell; Proteine unter Umständen instabil in stark belüfteten Kulturen

2.4.1.4 Disulfidbrücken

Disulfidbrücken zwischen Cysteinseitenketten sind für die Tertiärstruktur vieler Proteine essentiell. Ihre Ausbildung ist abhängig vom Redoxpotential und an die Anwesenheit bestimmter Enzyme gebunden. Sie wird daher durch die Wahl des Expressionswirts und des Expressionskompartiments beeinflusst.

Im Zytoplasma von *E. coli* herrschen reduzierende Bedingungen, unter denen die Cysteinreste meist frei vorliegen. Hierfür sind vor allem das Thioredoxin- und das Glutaredoxin-System entscheidend. Die Systeme sind komplex, ihre Wirksamkeit ist aber letztlich auf die Reduktion einzelner Komponenten durch die Thioredoxin-Reduktase TrxB bzw. die Glutathion-Reduktase Gor zurückzuführen [113]. Beide sind für die Kultivierung von *E. coli* nicht essentiell. Durch Verwendung von *trxB*- / *gor*-Doppeldefektmutanten, wie den Origamistämmen der Firma Novagen, kann die Ausbildung von Disulfidbrücken unterstützt werden [161]. Auch hat die Absenkung der Expressionstemperatur häufig einen positiven Einfluss. Der Mechanismus ist ungeklärt, aber das Zytoplasma wirkt oxidierender [162, 163]. Bei Proteinen mit komplexem Schwefelbrückenmuster kann die korrekte Faltung auch durch zytoplasmatische Coexpression der periplasmatischen Disulfid-Isomerase DsbC, welche die Brücken neu anordnet, begünstigt werden [164, 165].

Im Periplasma von *E. coli* herrschen oxidierende Bedingungen, die die Ausbildung von Disulfidbrücken begünstigen. Vor allem die Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen Dsb-A, -B, -C und -D katalysieren ihre Bildung und Isomerisierung [166].

Bei Gram-positiven Bakterien sind die Mechanismen der Ausbildung von Schwefelbrücken kaum erforscht, obwohl die Gewinnung von disulfidbrückenhaltigen Proteinen im Zytoplasma häufig Probleme bereitet [79, 167]. Ob, wie in *E. coli*, durch Absenkung der Expressionstemperatur ein oxidierenderes Milieu geschaffen werden kann, ist nicht beschrieben. Im Kulturüberstand können Mediumzusätze die Disulfidbrückenbildung beeinflussen. Überraschenderweise haben Thiolreagenzien, beispielsweise Cystein oder Glutathion (GSH), trotz ihrer eigentlich reduzierenden Wirkung in bestimmten Konzentrationen (~ 5 mM) einen positiven Einfluss [168]. Außerdem fördern im Kulturüberstand vier Orthologa zu *E. coli* Dsb-Proteinen, die Oxireduktasen BdbA bis -D, frei oder membranverankert die Disulfidbrückenbildung und -isomerisierung. Vor allem die Deletion der *bdbB*- und *bdbC*-Gene führte in „Knockout“-Versuchen zu einer Reduktion der Ausbildung von Schwefelbrücken [169].

2.4.2 Sequenzmodifikationen und Affinitätsanhängsel

Grundsätzlich kann jede Veränderung der Proteinsequenz auch mit einem Verlust der biologischen Aktivität einhergehen. Der Effekt hängt von Ausmaß, Lokalisation und Sequenz sowie vom Zielprotein ab. Im Rahmen der rekombinanten Expression sind dem Zielprotein, abhängig vom gewählten Expressionsvektor, häufig N- oder C-terminal Aminosäuren angefügt. Beispielsweise wird ein periplasmatisches Protein, das rekombinant ohne eigenes Signalpeptid

ins Zytoplasma exprimiert wird, N-terminal um ein Methionin, das Startcodon, erweitert. Eventuell resultiert auch das Einfügen der Insertsequenz in eine bestimmte Schnittstelle der *Multiple cloning site* in einer Verlängerung des Proteins um wenige Aminosäuren. Häufig werden jedoch auch längere Sequenzen, sogenannte Affinitätsanhängsel, als Fusionspartner für das rekombinante Produkt ausgewählt. Diese *Tags* besitzen Epitope oder Strukturen mit hoher Affinität zu einer spezifischen Säulenmatrix und ermöglichen die hochreine Gewinnung des Zielproteins.

Die in kommerziellen Vektorsystemen eingesetzten *Tags* unterscheiden sich stark. Häufig bestehen sie aus nur wenigen Aminosäuren und müssen nicht entfernt werden, da sie kaum Einfluss auf die Konformation des Fusionsproteins haben und selbst nur schwach immunogen sind. Vor allem für größere *Tags* ermöglichen Expressionssysteme häufig durch eingefügte Proteaseschnittstellen die Abspaltung nach der Aufreinigung. Es verbleiben dann in der Regel nur wenige Aminosäuren der Proteaseerkennungssequenz am Protein. In manchen Fällen kann aber auch der Verbleib großer Affinitätsanhängsel von Vorteil sein. Eine Erhöhung von Ausbeute und Löslichkeit des Produktes sowie eine Schutzwirkung gegenüber Proteasen wurden beschrieben [80, 160, 170-172]. So ist das Maltose-Bindungsprotein (MBP) mit einer Größe von 40 kDa oft größer als seine Fusionspartner und für Kristallisationsexperimente ungeeignet. Trotzdem scheint es die native Struktur mancher Proteine sogar zu begünstigen und kann als eine Art fusioniertes Chaperon fungieren [172].

Welches Affinitätsanhängsel am besten zur Gewinnung eines bestimmten Proteins geeignet ist lässt sich nicht voraussagen. In einer Vergleichsstudie überprüften Bucher *et. al.* den Einfluss kleiner Affinitätsanhängsel auf die Kristallisationseigenschaften des *Pyrococcus furiosus* MBPs [173]. Während Arg5-, His6- und BAP-Fusionsproteine die Kristallisation kaum beeinflussten, bildete das FLAG-Fusionsprotein abweichende und das Strep-Tag® II-Fusionsprotein gar keine Kristalle. Die Ergebnisse lassen jedoch keine generelle Aussage über die Eignung der Affinitätsanhängsel als Fusionspartner zu. Im Extremfall kann eine zusätzliche Aminosäure zur Inaktivierung führen oder ein großes Affinitätsanhängsel die native Konformation sogar begünstigen. Bei der Wahl des Affinitätsanhängsels müssen außerdem die spezifischen Elutionsbedingungen beachtet werden. Manche Elutionspuffer haben extreme pH-Werte oder enthalten Substanzen wie Guanidin, EDTA, Dithiothreitol (DTT) oder Harnstoff (Tabelle 3) und können die Inaktivierung empfindlicher Proteine bedingen [173] (siehe Kapitel 2.4.7, 2.4.9).

Tabelle 3: Überblick über die Eigenschaften wichtiger Affinitätsanhängsel [174]

Affinitätsanhängsel	Länge (AS)	Größe (kDa)	Elutionsbedingungen
Arg ₅	5	0,80	0 - 400 mM NaCl-Gradient, pH > 8.0
His ₆	6	0,84	20 – 250 mM Imidazol oder niedriger pH
FLAG	8	1,01	2 – 5 mM EDTA oder pH 3.0
Strep-Tag® II	8	1,06	2,5 mM Desthiobiotin
c-myc	11	1,20	niedriger pH
S-Peptid	15	1,75	3 M Guanidinthiocyanat, 0,2 M Citrat, 3 M MgCl ₂ , pH 2
HAT (natürliches Polyhistidin)	19	2,31	150 mM Imidazol oder niedriger pH
3x FLAG	22	2,73	EGTA oder EGTA mit 1 M NaCl
Calmodulin-bindendes Peptid	26	2,96	EGTA oder EGTA mit 1 M NaCl
Streptavidin-bindendes Peptid	38	4,03	2 mM Biotin
Chitin-bindende Domäne	51	5,59	Fusioniert mit Intein: 30–50 mM DTT, BME oder Cystein
GST	211	26,00	5–10 mM GSH (reduziert)
MBP	396	40,00	10 mM Maltose

2.4.3 Einschlußkörperchen

Einschlusskörperchen, *inclusion bodies*, stellen häufig ein Problem bei der Überexpression rekombinanter, heterologer Proteine in *E. coli* oder *B. subtilis* dar [175-177]. Die exzessive Synthese führt zu einer Akkumulation der Fremdproteine in den Kompartimenten Zyto- bzw. Periplasma [140]. Besonders fehlgefaltete Expressionsprodukte neigen aufgrund der unvorteilhaften Interaktion von exponierten hydrophoben Seitenketten des Proteininneren mit dem Lösungsmittel Wasser zur Zusammenlagerung [103] und bilden Aggregate, die größenabhängig auch präzipitieren [108, 178]. Die Folge ist der bleibende Verlust ihrer biologischen Aktivität. Nicht alle Proteine bilden Einschlusskörperchen [179]. Lilie *et al.* konnten keine Korrelation mit molekularen Proteineigenschaften wie Kettenlänge, Aufteilung in Untereinheiten oder Hydrophobizität feststellen [180]. Allerdings scheinen Cystein-haltige Proteine besonders im reduzierend wirkenden Zytoplasma zur Aggregation zu neigen [181].

Um Proteine aus Einschlusskörperchen freizusetzen werden häufig stark denaturierende Methoden angewandt und eine anschließende Renaturierung ist nicht immer erfolgreich [140]. Mit neueren Solubilisierungs- und Renaturierungsprozeduren kann die Wiederherstellung eines Großteils der Proteine jedoch gelingen [182].

Um die Aggregationsneigung des Expressionsproduktes zu verringern, sollte das Protein nach Möglichkeit in nativer Konformation gewonnen werden [183], beispielsweise durch Anpassung von pH-Wert, Temperatur, Osmolarität und Zusammensetzung des Mediums [140] oder durch Nutzung eines geeigneten Expressionsstammes (siehe Kapitel 2.4.1.4, 2.4.1.1) [184]. Auch Fusionspartner wie Glutathion-S-Transferase (GST) oder MBP können die Bildung von Einschlusskörperchen reduzieren, beeinflussen aber ihrerseits oft die Aktivität des Produktes (2.4.2).

Ob *B. subtilis*- oder *E. coli*-Stämme weniger zur *Inclusion body*-Bildung neigen ist nicht geklärt [87]. Zumindest bietet *B. subtilis* einen sehr effizienten Sekretionsapparat zur direkten Expression in den Kulturüberstand in dem die Proteine hochverdünnt vorliegen [185].

Da hohe Proteinkonzentrationen die Aggregation fördern kann durch Drosselung der Überexpression, z. B. durch Erniedrigung der Expressionstemperatur oder schwächere Induktion, in beiden Systemen oft ein erhöhter Anteil an biologisch aktivem Protein gewonnen werden [140].

2.4.4 Temperatur

Hohe und eventuell auch niedrige Temperaturen führen zur Denaturierung von Proteinen. In einem für das Protein spezifischen Temperaturbereich ist die native Konformation stabil. Außerhalb dieses Bereichs kommt es zu einem abrupten Verlust der Struktur und der Funktion des Proteins [186].

Durch Erhöhung der Temperatur gewinnen die Proteinmoleküle kinetische Energie. Sie beginnen schnell und heftig zu vibrieren, sodass schwache hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrücken zerstört werden [187]. Zunächst sind vor allem Interaktionen zwischen entfernten Bereichen der Polypeptidkette betroffen. Das Protein wird flexibler und hydrophobe Aminosäurereste gelangen an die Oberfläche. Mit steigender Temperatur wird neben der Tertiär- auch die Sekundärstruktur zerstört. Die internen Wasserstoff-Brücken werden gelöst, helikale Strukturen brechen auf und die Aminosäuren bilden Wasserstoff-Brücken mit Wasser-Molekülen [188].

Welchen Einfluss eine bestimmte Temperatur auf ein individuelles Protein hat lässt sich nie genau vorhersagen. Thermophile Bakterien z. B. enthalten äußerst hitzestabile Proteine, die bei Temperaturen von 100 °C biologisch aktiv sind obwohl sie sich in ihrer Struktur kaum von den orthologen Proteinen mesophiler Bakterien unterscheiden [186].

Bei der rekombinanten Gewinnung eines temperaturempfindlichen Proteins muss in möglichst allen Schritten eine Erwärmung auf kritische Temperaturen vermieden werden. *E. coli*- und *B. subtilis*-Expressionssysteme lassen eine Anpassung der Expressionstemperatur zu. Bei ausreichender Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gelingt die Kultivierung von *E. coli* zwischen 10 und 49 °C [189, 190], die von *B. subtilis* zwischen 11 und 52 °C [191, 192]. Hohe Temperaturen können außerdem beim Aufschluss der Bakterien mittels *French press* oder Ultraschall (2.4.6) und bei der Zentrifugation in nicht gekühlten Zentrifugen entstehen.

2.4.5 Einfrier- und Auftauprozesse

Auch durch den Einfrierprozess können Proteine in ihrer Struktur beeinflusst werden. Durch Aufkonzentrierungseffekte kommt es bei manchen Proteinen zur Aggregation [193]. Elektrolyte können lokal bis zu vierzigfach konzentriert sein [194] und das Protein destabilisieren. Der pH-Wert kann durch Präzipitation von Pufferkomponenten dramatisch verändert [195, 196] und der

Sauerstoffgehalt um den Faktor 1000 erhöht sein [197]. Um solche Effekte zu minimieren kann man die Pufferzusammensetzung und –konzentration anpassen [198] oder die Proteinlösung schockgefrieren ($> 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Letzteres führt optimaler Weise zum glasartigen Erstarren der Flüssigkeit - zur Vitrifikation [199]. Die Proteinlösung verhält sich dann wie eine weit unter den Gefrierpunkt unterkühlte Flüssigkeit sehr hoher Viskosität [200]. Nachteil dieses *Supercoolings* ist die vermehrte Bildung kleiner Eiskristalle mit einer verhältnismäßig großen Eis-Flüssigkeits-Kontaktfläche. Die kleinen Kristalle können eine Oberflächendenaturierung der Proteine und deren Aggregation bewirken [198, 201, 202].

Wasserkristalle sind auch die Hauptursache der Schädigung von Proteinen während des Auftauprozesses. Durch Rekristallisationsprozesse im Bereich des Gefrierpunktes sind die teilweise fixierten Proteine Zug- und Scherkräften ausgesetzt, die zu ihrer Inaktivierung führen [198]. Zur Vermeidung solcher Effekte und zum Erhalt der biologischen Aktivität des Zielproteins empfiehlt Cao ein schnelles Auftauen der Proteinlösung ($>10^{\circ}\text{C} / \text{min}$) [198].

2.4.6 Mechanische und physikalische Einflüsse

Im Rahmen von Expressionsversuchen sind rekombinante Proteine mechanischen Kräften, Scher- und Prallkräften, ausgesetzt. Die Proteine werden noch in der Kultur geschwenkt, später „gevortex“, geschüttelt, zentrifugiert oder gerührt. Viele Studien gehen von einem denaturierenden Einfluss der einwirkenden Kräfte aus [203-206]. Allerdings sind die beobachteten Veränderungen vermutlich häufig der Interaktion des Systems mit Luft bzw. mit den Oberflächen der Versuchsaapparaturen geschuldet. Oberflächen können, abhängig von Struktur, Ladungsverhalten und Hydrophobizität, Aminosäuren aus dem Inneren der Proteine binden und zur Aggregation und Inaktivierung führen [207].

Aus Scheerkräften können Proteine aufgrund ihrer geringen Größe vermutlich nicht ausreichend Energie zur Denaturierung erhalten [208, 209]. Allerdings kann die Ausbildung von Cysteinseitenketten und somit auch die native Konformation beeinflusst werden [210, 211]. Der im Rahmen der Blutgerinnung wichtige von Willebrand Faktor zum Beispiel besitzt neun exponierte Cysteinseitenketten. In Abhängigkeit von den intravasalen Strömungsverhältnissen bilden diese Schwefelbrücken, wodurch es zur Aktivierung des Faktors und zur Bindung an Blutplättchen kommt [211].

Die Klärung des Einflusses von mechanischen Kräften auf die Proteinfaltung bedarf weiterer Untersuchungen, zumal in weitläufig genutzten Zellaufschlussystemen (Ultraschall und *French press*) hohe Scherkräfte auf die Proteine einwirken.

Die denaturierende Wirkung von Ultraschall auf Proteine ist vielfach beschrieben [212-214], aufgrund ihrer komplexen Natur jedoch immer noch unzureichend charakterisiert [212]. Sie beruht vor allem auf einem Effekt, der als akustische Kavitation bezeichnet wird. Von einem Schallkopf emittierte Wellen (20 kHz – 1 MHz) verursachen Bereiche niedrigen und hohen Drucks. Sinkt der Druck unter den Dampfdruck des Mediums können Kavitationsblasen aus

Wasserdampf und gelösten Gasen entstehen, die durch die eingetragenen Schallwellen fluktuierend wachsen. Erreichen die Blasen eine kritische Größe implodieren sie [215] und es entstehen Wirbel mit hohen Scherkräften, *Microjets* [216], sowie extreme Temperaturen (bis 5000 K) und Drücke (50 MPa) unter denen Wasserstoff- und Hydroxyradikale gebildet werden [216, 217]. Eine Denaturierung von Proteinen durch Ultraschall ist das Resultat der kombinierten Wirkung dieser Effekte. Einen gewissen Schutz bieten eventuell Radikalfänger wie GSH.

In einem zweiten Zellaufschlussverfahren, der Lyse mittels *French press*, werden Zellen durch eine plötzliche Druckabsenkung von bis zu 500 MPa zum Platzen gebracht. Der extreme Druck in der *French press* kann zur Denaturierung von Proteinen führen, kovalente Bindungen werden nicht beeinflusst [218]. Um unter Hochdruck das Gesamtvolumen der Lösung zu reduzieren werden Aminosäureseitenketten aus Salzbrücken hydrolysiert [219-222]. Auch bieten Hohlräume im Protein aufgrund mangelhafter Packung der Seitenketten Spielraum für Komprimierbarkeit [223]. Wassermoleküle können ins Innere der hydrophoben Kerne gelangen und eine Art innere Denaturierung durch ein Anschwellen des Proteinkerns, veränderte Proteinsstruktur, -dynamik und -stabilität verursachen [224, 225]. Die Differenz der Volumina des nativen und denaturierten Proteins beträgt letztendlich nur ca. 2 % [226].

Mit steigendem Druck wird zunächst die Quartärstruktur oligomerer Proteine angegriffen. 50-200 MPa können eine Dissoziation der Untereinheiten bewirken [226]. Salmon *et al.* wiesen beispielsweise die Depolymerisation von Mikrotubuli bei einem Druck von 68 MPa nach [227]. Bei ca. 200 MPa kann es bei größeren, bei 400 MPa auch bei kleinen Proteinen, zur Beeinflussung der Tertiärstruktur kommen [218], die durch drucklabile elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen charakterisiert ist [228]. Bei Drücken zwischen 300 und 700 MPa werden schließlich auch Sekundärstrukturelemente angegriffen. Die Beta-Faltblattstruktur ist nahezu inkompressibel und stabiler als Alpha-helikale Bereiche [229]. Ist die Sekundärstruktur verändert, ist die Denaturierung oft irreversibel.

Der zum Zellaufschluss mittels *French press* genutzte Druck liegt oft in Bereichen unter 200 MPa. Die resultierenden Veränderungen sind mit abnehmendem Druck meist wieder reversibel [226, 230]. Demzufolge gilt die *French press* als ein relativ schonendes Verfahren. Allerdings tritt der Druckabfall schlagartig beim Austritt ein, sodass die Proteine einer Reihe von Kräften (Scherkräfte, Prallbeanspruchung, Geschwindigkeitsänderungen des Fluids, Turbulenzen und Kavitation) ausgesetzt sind [231]. Außerdem kann es durch Reibungskräfte zu einer Temperaturerhöhung der Lösung von 1-2 °C / kpsi Druckgefälle kommen. Entsprechend erhöht ein Druckabfall von 200 MPa die Temperatur der Lösung kurzfristig um 29 – 58 °C [232]. Hohe Drücke können auch in (Ultra-)Zentrifugen entstehen. Abhängig von der Leistung der Zentrifuge und dem Aufbau sowie der Füllung des Zentrifugationsgefäßes wird in der Flüssigkeitssäule ein hydrostatisches Druckgefälle von 0,1 MPa (Normaldruck) am Flüssigkeits-Luft-Meniscus bis über 50 MPa am Gefäßboden aufgebaut [233]. Hierdurch kann es zur

Depolymerisation von Proteinen kommen. Marcum *et al.* studierten die Auswirkungen eines maximalen Drucks von 20 MPa auf ein 30 S-Mikrotubulin in einer Ultrazentrifuge und beobachteten den Zerfall des Oligomers in 6 S Untereinheiten [234].

2.4.7 Chemische Interaktionen und Einflüsse des Lösungsmittels

Die Proteinkonformation ist vor allem durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel Wasser geprägt, die zur Abschirmung hydrophober Aminosäurereste im Inneren des Proteins führen. **Ionen** verändern die Eigenschaften des Wassers und können hierdurch den Verlust der spezifischen räumlichen Anordnung des Proteins herbeiführen oder auch die native Konformation stabilisieren. Ihr Einfluss wird in der Hofmeister-Reihe relativiert. Chaotrope Salze wie Perchlorate, Iodide, Thiocyanate, Bariumsalze oder auch Guanidinhydrochlorid (Tabelle 3) vermindern den nachteiligen Effekt der Exposition hydrophober Aminosäuren und begünstigen hierdurch die Denaturierung. Antichaotrope Salze hingegen konkurrieren mit den Proteinen um die Lösungsmittelmoleküle. Ammonium- und Sulfat-Ionen beispielsweise, deren Salz häufig zur schonenden Fällung empfindlicher Proteine eingesetzt wird, bilden Hydrathüllen und entziehen in hohen Konzentrationen dem Protein das für seine native Konformation essentielle Wasser. Die Proteine aggregieren durch Wechselwirkungen, ihre Löslichkeit wird vermindert und sie präzipitieren.

Auch ladungsneutrale Moleküle, beispielsweise **Osmolyte** wie Zucker oder **Makromoleküle**, können die Konformation eines Zielproteins beeinflussen, indem sie mit ihm um das Lösungsmittel konkurrieren. Durch sogenanntes *Molecular Crowding* erhöht sich die effektive Konzentration eines Proteins. Viele Proteine liegen erst unter solchen Bedingungen, die die Verhältnisse im Inneren von Zellen deutlich besser widerspiegeln, in nativer Konformation vor [235].

Einen ähnlichen Einfluss wie chaotrope Salze haben **Detergentien** wie Tween 20, Triton X-100, oder Natriumdodecylsulfat (SDS). Sie sind Bestandteil vieler Puffer, zum Beispiel in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), im *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), im Immunblot oder in Renaturierungsversuchen. Als grenzflächenaktive Substanzen erhöhen sie die Löslichkeit von Proteinen, begünstigen allerdings auch die Exposition im Proteinkern verborgener Aminosäuren. Auch **organische Lösungsmittel** wie Alkohole oder Aceton sind grenzflächenaktiv. Zudem lösen sie intramolekulare Wasserstoffbrücken der Sekundärstruktur indem sie sie durch eigene ersetzen [236]. Harnstoff (denaturierende SDS-PAGE, Elutionspuffer) und Guanidin beeinflussen mit ihrer der Peptidbindung ähnlichen Struktur die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen.

Bestimmte Metallionen sind für die Tertiär- und Quartärstruktur von Metalloproteinen essentiell, aber auch für andere Proteine konnte ein positiver Faltungseffekt beobachtet werden [154]. **Chelatbildner** wie EDTA sind Bestandteil vieler Puffer und komplexieren die Metallionen, die den Proteinen damit nicht mehr zur Verfügung stehen. Sie sind in geringen Mengen enthalten

um Proteasen zu inaktivieren und die Proteine vor zweiwertigen Ionen, vor allem **Schwermetallionen** zu schützen (Puffer W und E siehe 3.1.1, Elutionspuffer siehe Tabelle 3). Diese können als Verunreinigungen in Chemikalien und in Zusätzen der Kulturmedien, beispielsweise in Rinderleber, Hefeextrakt, Schafblut oder Rinderserum (3.1.1), auftreten. Hg^{+2} , Pb^{+2} , Ag^{+1} , Tl^{+1} und Cd^{+2} können mit ihrer hohen Affinität zu Schwefelatomen der Cysteinseitenketten Disulfidbrücken zerstören, Salzbrücken lösen und mit den Proteinen unlösliche Salze bilden [237].

Neben denaturierenden Einflüssen können auch chemische Modifikationen zur Inaktivierung von Proteinen führen. Die Seitenketten der Aminosäuren können durch Hydrolyse, Deamidierung, Isomerisierung und Redoxreaktionen verändert werden [103].

Reduzierende Agenzien, wie z. B. DTT und GSH (Tabelle 15, Tabelle 3) oder 2-Mercaptoethanol (BME) spalten Disulfidbrücken durch Reduzierung und verändern hierdurch die Tertiär- oder Quartärstruktur von Proteinen. Sie werden unter anderem in Proteinprobenpuffern (Tabelle 20) und Western Blot-Strip-Puffern eingesetzt. Häufig sind sie auch Bestandteil von Enzymlösungen, in denen sie katalytische Zentren vor Inaktivierung durch Cystein-Oxidation bzw. Disulfidbrückenformation schützen. Auch Cystein, Pyruvat oder Thioglycolat wirken reduzierend [238].

Oxidierende Agenzien (z. B. Kaliumhexacyanidoferrat, Ellmann's Reagens) wirken entgegengesetzt und begünstigen die Ausbildung von Disulfidbrücken.

Die aufgeführten Stoffe müssen nicht zwangsläufig einen inaktivierenden Einfluss auf Proteine ausüben. Viele sind in proteinspezifischer Konzentration geeignet die native Konformation zu stabilisieren oder sogar denaturierte Proteine zu renaturieren. So können z. B. L-Arginin, Formamid oder Harnstoff in hohen Konzentrationen aggregationsanfällige Zwischstufen der Faltung erheblich stabilisieren und die Ausbeute nativ gefalteter Proteine steigern [115, 239].

2.4.8 Sauerstoff

Enzyme mit Cysteinseitenketten im aktiven Zentrum reagieren häufig sehr sensibel auf die Anwesenheit von Luftsauerstoff. Cysteinreste können durch Oxidation Disulfid-Brücken, Sulfino- oder Sulfonsäuren bilden oder mit Metallionen reagieren, was zur Inaktivierung von Proteinen führen kann [188]. Der Fumarat-Nitrat-Reduktase-Regulator von *E. coli* beispielsweise besitzt fünf Cystein-Reste, von denen vier ein Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S) bilden. Durch Luftsauerstoff werden die Cysteine oxidiert und Disulfidbrücken zwischen ihnen gebildet, wodurch es zur Inaktivierung des Enzyms kommt. [240]. Auch die sogenannten Thiol-aktivierten Toxine, die alle von Gram-positiven Bakterien gebildet werden, zeigen unter Lufteinfluss einen schnellen Aktivitätsverlust [241]. Eine Reihe von Zusätzen zu Puffern und Medien bieten einen gewissen Schutz vor der Inaktivierung. EDTA beispielsweise bildet Komplexe mit divalenten Ionen, die ihrerseits Sauerstoffmoleküle aktivieren und Oxidationsprozesse beschleunigen [188]. Oft kann die Inaktivierung auch durch organische Lösungsmittel wie Methanol, Ethanol,

Propanol oder Aceton [242, 243], alternative Kohlenstoffquellen (Glyzerol, Fruktose und Inositol [244]), AMP, GMP und anorganische Phosphate [245] oder reduzierende Agenzien (DTT, Dithioerythritol, BME oder Cystein) zumindest teilweise verhindert werden. Mit reduzierenden Substanzen kann sogar die Reaktivierung eines Proteins gelingen, wenn lediglich einzelne Cysteinreste durch Oxidation verändert sind [50], oft sind die Veränderungen aber irreversibel [50, 244].

2.4.9 pH-Wert

Jedes Protein hat ein pH-Optimum, an dem seine biologische Aktivität am größten ist. Die Konformationsstabilität ist meist nur in einem sehr engen Bereich nahe dieses Optimums gewährleistet. Er entspricht oft der natürlichen Umgebung des Proteins und kann gleichwohl im Sauren, Neutralen oder Alkalischen liegen [103]. Für den Einfluss des pH-Wertes sind saure und basische Aminosäuren verantwortlich, deren Seitenketten protoniert und deprotoniert vorliegen können. Saure Aminosäuren (Aspartat, Glutamat, Cystein und Tyrosin) besitzen im deprotonierten Zustand negative, basische (Histidin, Lysin und Arginin) im protonierten positive Ladungen [103]. Ändert sich durch pH-Verschiebung die Ladung der Aminosäuren, kann es zu elektrostatischen Abstoßungen und Beeinflussung von Salzbrücken kommen [102]. Auch die chemische Stabilität eines Proteins wird durch den pH-Wert mitbestimmt. Ein niedriger pH-Wert reduziert die Gefahr der Deamidierung, erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit für Spaltungs- und Zyklisierungsreaktionen. Alkalische pH-Werte katalysieren Oxidation, β -Eliminierung, Hydrolyse und Disulfidbrückenaustausch [103].

Der Einfluss des pHs auf die Proteinkonformation kann durch weitere denaturierende Einflüsse begünstigt sein. Im nativen Protein sind saure und basische Aminosäuren oft im Inneren lokalisiert und nicht dem pH-Wert des Lösungsmittels ausgesetzt. Durch Destabilisierung, beispielsweise aufgrund erhöhter Temperatur, können sie jedoch exponiert sein, wodurch sich die denaturierende Wirkung des pHs erhöht [108].

Ein Beispiel für ein Protein mit saurem pH-Optimum ist Listeriolysin O (LLO), welches zu den Thiol-aktivierten Toxinen gehört. Damit sich der Keim im Zytoplasma des Makrophagen vermehren kann muss seine porenbildende, lytische Aktivität auf das Phagosom beschränkt sein [246]. In diesem herrschen saure Bedingungen, dementsprechend liegt das pH-Optimum von LLO im sauren Bereich. Nach Austritt ins pH-neutrale Zytoplasma kommt es zur Deprotonierung von lediglich drei sauren Aminosäuren und hierdurch zur Denaturierung und Inaktivierung [247]. Auch bei Clostridien findet man Proteine mit saurem pH-Optimum. Botulinum-Neurotoxin A benötigt sogar pH-Werte unter fünf um seine Aktivität entfalten zu können [248].

Im Inneren des Expressionswirtes ist der pH-Wert unter normalen Kulturbedingungen relativ stabil. Für *C. perfringens* liegt er zwischen 6,6 und 7,7, *B. subtilis* und *E. coli* besitzen Zytoplasma-pH-Werte im Bereich von 7,5 – 8 [249-251]. Ändert sich der pH-Wert des Mediums

wird der zytoplasmatische pH in der Regel nur gering beeinflusst, da regulierende Mechanismen die Angleichung verhindern [249]. Im Vergleich zu *E. coli* besitzt das Zytoplasma von *B. subtilis* im sauren Bereich eine deutlich höhere Pufferkapazität [252].

Während rekombinante Proteine im Zytoplasma ihres Expressionswirtes einen gewissen Schutz genießen, sind sie bei Expression ins Periplasma von *E. coli*, dessen pH-Wert sich dem Medium angleicht oder direkt ins Medium von *B. subtilis*, eventuell stärkeren pH-Schwankungen ausgesetzt. Mit zunehmender Kultivierungszeit kommt es, besonders unter fermentativen Bedingungen, zur Ansäuerung des Mediums [249]. Da der pH-Wert aber leicht durch Zugabe von Säuren, Laugen oder Puffern beeinflusst werden kann ist es möglich die Expressionsbedingungen dem pH-Optimum eines Proteins anzupassen, vorausgesetzt dieses liegt nicht außerhalb des wirtstolerierten Bereichs (*E. coli* pH 5 – 9 [190]).

Mit extremen pH-Werten werden rekombinante Proteine eventuell auch während der affinitätschromatographischen Aufreinigung konfrontiert, wenn die Elution über einen pH-Gradienten erfolgt (Tabelle 3).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Versuchstiere

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer

Die verwendeten Puffer und Medien sind im Anhang aufgelistet (Tabelle 20) und wurden, soweit nicht anders angegeben, mit *A. deionisata* angesetzt. Eine Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien gibt Tabelle 21. Nicht aufgelistete Reagenzien stammen unter anderem von den Firmen Amersham, Difco, Fermentas, Fluka, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Oxoid, Roth, Serva oder Sigma.

3.1.2 Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Geräte sind im Anhang, Tabelle 22 aufgeführt.

3.1.3 Bakterienstämme und GVO

Einen Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme gibt Tabelle 4. Zur Toxovartypisierung der *C. perfringens*-Stämme 121/91, P-3228/06 und P-5285/05 wurden eine Multiplex- und eine *cpb2*-spezifische-PCR angewendet [253].

Die in Tabelle 5 gelisteten gentechnisch veränderten Organismen sind, mit Ausnahme von *E. coli* TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40), der von Hermann Willems generiert wurde, im Rahmen dieser Arbeit erzeugt worden. Ihre rekombinanten Plasmide basieren auf Vektoren der Firmen IBA GmbH, Promega (pGEM-T), Invitrogen (pBAD/Myc-His) bzw. MoBiTec (pHT01).

3.1.4 Zelllinien

Die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurde dankend von Dr. P. Velge (Institute Nationale de la Recherche Agronomique, Tours, Frankreich) erhalten. Die IPEC-J2-Zellen (porcine Darmepithelzelllinie) stellte freundlicherweise Dr. P. Schierack (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin) zur Verfügung.

3.1.5 Versuchstiere

BALB/c-Inzucht-Mäuse (weiblich, 6-8-Wochen) und NMRI-Auszucht-Mäuse (weiblich, 6-8-Wochen) wurden von der Firma Harlan-Winkelmann bezogen.

Tabelle 4: Überblick über die verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Bezeichnung	relevanter Genotyp	relevante Antibiotika-Resistenzen	Herkunft	Verwendung
<i>E. coli</i>	TOP10F ⁺	F ⁺ (tet ^R), mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74 recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG	-	Invitrogen™ life technologies	Expressionswirt
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F ⁺ proAB lacZΔM15 Tn10 (Tet ^R)]	-	Stratagene	Zwischenwirt
<i>E. coli</i>	Rosetta-gami™ 2 (DE3)	Δ(ara-leu) 7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvu II phoR araD139 ahpC galE galK (rpsL (DE3) F ⁺ [lac ⁺ lacI ⁺ pro] gor522::Tn 10 trxB pRARE2 (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)	Tet ^R , Amp ^R	Novagen®	Expressionswirt
<i>B. subtilis</i>	WB800N	nprE apcE epr bpr mpr::ble nprB::bsr Δvpr wprA::hyg cm::neo; Neo ^R (WB800 pB-caf5-neo-caf3)	Neo ^R	Universität Bayreuth	Expressionswirt
<i>C. perfringens</i>	121/91	Toxovar A, [qpb2, cpa]	-	IHIT, Herkunft unbekannt	Expressionswirt
<i>C. perfringens</i>	P-3228/06	Toxovar C, [qpb2 ⁻]	-	IHIT, Ferkelisolat	qpb2-Spenderstamm für Beta2-Toxin-Klonierung
<i>C. perfringens</i>	P-5285/05	Toxovar A, [qpb2 ⁻]	-	IHIT, Ferkelisolat	qpb2-Spenderstamm für Beta2-Toxin-Klonierung
<i>C. perfringens</i>	NCTC 3180	Toxovar C	-	NCTC	qpb-Spenderstamm für Beta-Toxin-Klonierung
<i>C. perfringens</i>	ATCC 13124	Toxovar A	-	ATCC	Kontrollstamm der <i>C. perfringens</i> Typisierungs-PCR
<i>C. perfringens</i>	ATCC 3626	Toxovar B	-	ATCC	Kontrollstamm der <i>C. perfringens</i> Typisierungs-PCR
<i>C. perfringens</i>	ATCC 3628	Toxovar C	-	ATCC	Kontrollstamm der <i>C. perfringens</i> Typisierungs-PCR
<i>C. perfringens</i>	ATCC 3629	Toxovar D	-	ATCC	Kontrollstamm der <i>C. perfringens</i> Typisierungs-PCR
<i>C. perfringens</i>	ATCC 27324	Toxovar E, [etx ⁺]	-	ATCC	Kontrollstamm der <i>C. perfringens</i> Typisierungs-PCR
<i>C. perfringens</i>	E 482/97	Toxovar A, [qpb2 ⁻]	-	Universität Bern	Kontrollstamm der <i>C. perfringens</i> Typisierungs-PCR

Tabelle 5: Überblick über die verwendeten gentechnisch veränderten Organismen

GVO	Plasmid basierend auf	Antibiotika-Resistenzen	Expressionsprodukt / Funktion	Expression ins	Induktion mit	Induktionsdauer (h)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	pGEM-T::cpb	Amp ^{100R}	- / Zwischenklonierung Beta-Toxin	-	-	-
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-40	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, C-terminales Strep-Tag® II / Expression	Periplasma	Anhydrotracyclin 0,1 µg / ml	4
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-42	Amp ^{100R}	Beta-Toxin, N-terminales Strep-Tag® II / Expression	Zytoplasma	Anhydrotracyclin 0,1 µg / ml	16
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-45	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, N-terminales Strep-Tag® II / Expression	Zytoplasma	Anhydrotracyclin 0,1 µg / ml	16
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-46	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, C-terminales Strep-Tag® II / Expression	Zytoplasma	Anhydrotracyclin 0,1 µg / ml	16
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-47	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, N-terminales Strep-Tag® II / Expression	Periplasma	Anhydrotracyclin 0,1 µg / ml	16
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-48	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, C-terminales Strep-Tag® II / Expression	-	-	-
<i>E. coli</i> Rosetta-Gami 2	pPR-IBA1	Tet12 ^R , Cam34 ^R , Amp ^{100R}	Zwischenklonierung	Zytoplasma	IPTG, nicht durchgeführt	-
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-48	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, N-terminales Strep-Tag® II / Expression	-	-	-
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-49	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, N-terminales Strep-Tag® II / Zwischenklonierung	-	-	-
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-50	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, N-terminales Strep-Tag® II / Zwischenklonierung	-	-	-
<i>E. coli</i> Rosetta-Gami 2	pBAD/Myc-His	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin, N-terminales Strep-Tag® II / Expression	Zytoplasma	L-Arabinose 200 µg / ml ¹⁾	4
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-51	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin / Zwischenklonierung	-	-	-
<i>B. subtilis</i> WB800N	pHT01	Neo ^{100R} , Amp ^{100R} , Cam5 ^R	Beta2-Toxin / Expression	Kulturbedstand	IPTG 1 mM	4
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pHIT-Vlc-51	Amp ^{100R}	Beta2-Toxin / Expression	-	-	-
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻	pASK-IBA5plus	Amp ^{100R}	Kontrollstamm	-	Anhydrotracyclin 0,1 µg / ml	16
<i>E. coli</i> Rosetta-Gami 2	pBAD/Myc-His	Tet12 ^R , Cam34 ^R , Amp ^{100R}	- / Kontrollstamm	-	L-Arabinose 200 µg / ml ¹⁾	4
<i>B. subtilis</i> WB800N	pHT01	Neo ^{100R} , Amp ^{100R} , Cam5 ^R	- / Kontrollstamm	-	IPTG 1 mM	4

¹⁾ wiederholt nach 2 h

3.1.6 Primer

Tabelle 6: Übersicht über die für die Amplifikation der Toxingene im Rahmen der Klonierung eingesetzten Primer und Templates

Primer	Sequenz ¹⁾	Länge	Schnittstelle	Template ²⁾	Amplifikat	Zielvektor
C7	ATGGTAGGTTCTCAJGGCCCAATGATATAGGCCAAACTACTACTATACTA	49	Bsal	<i>C. perfringens</i> NCTC 3180 (Toxovar C)	<i>cpb</i> ohne Signalpeptid (963 bp)	pGEM-T / pASK-IBA5plus
C8	ATGGTAGGTTCTCAJATATCAAAATAGCTGTTATTTATGAGTAAGCC	44	Bsal			
C25	ATGGTAGGTTCTCAJAAATGAAAGAAATCGACGCTTATAGAAAGG	42	Bsal	<i>C. perfringens</i> P-5285/05 (Toxovar A, [<i>cpb2</i> '])	<i>cpb2</i> ohne Signalpeptid (740 bp)	pASK-IBA3plus, pPR-IBA1
C24	ATGGTAGGTTCTCAJGGCGCTGCACAATACCCCTTCACCAATATAC	41	Bsal			
C21	ATGGTAGGTTCTCAJGGCCCAAGAAATCGACGCTTATAGAAAGG	43	Bsal	<i>C. perfringens</i> P-5285/05 (Toxovar A, [<i>cpb2</i> '])	<i>cpb2</i> ohne Signalpeptid (741 bp)	pASK-IBA4, pASK-IBA5plus, pPR-IBA2
C22	ATGGTAGGTTCTCAJATATCATGCACAATACCCCTTCACCAATATAC	42	Bsal			
C29	TGTACTCJCATGGCTAGCTGGAGCCACCGCA	31	NcoI	pHIT-Vlc-49	<i>cpb2</i> ohne Signalpeptid, mit <i>Srep</i> -Tag@ II (975 bp)	pBAD/Myc-His
C30	CTCAGTCJAAATTCAGGCTCGCAACTGTTGGG	31	EcoRI			
C39	TTTCAGGGGGGAATJCTAGATGA	22	XbaI	<i>C. perfringens</i> P-3228/06 (Toxovar C, [<i>cpb2</i> '])	<i>cpb2</i> mit Signalpeptid (838 bp)	pHT01
C41	CTAAGTGACGTJCATATTTTTTCTATGC	28	AatII			

1) Recognition sites sind fett gedruckt, J markiert die Schnittstelle 2) Bakterien wurden vor Verwendung frisch angezüchtet und inaktiviert (10 min, 100 °C)

Tabelle 7: Übersicht über die zur Transformantenüberprüfung verwendeten Primer

Primer	Sequenz	Länge	spezifische Bindung von	Amplifikatlänge (bp)	Herkunft der Primersequenz
C3	GCGAATATGCTGAATCATCTA	21	<i>cpb</i>	196	[254]
C4	GCAGGAACATTAGTATATCTTC	22			
C11	AATTAGGTGACACTATAG	18	pGEM-T-Vektor	1125 für pGEM®-T:: <i>cpb</i>	Promega GmbH
C12	TAATACGACTCACTATAGGG	20			
C19	GAAGGTAATGGAGAATTATCTTAATGC	27	<i>cpb2</i>	574	[253]
C20	GCAGAATCAGGATTTTGACCATATACC	27			
C13	GAGTTATTTTACCACTCCCT	20	pASK-IBA-Vektoren	959 für pHIT-Vlc-40 1155 für pHIT-Vlc-42 933 für pHIT-Vlc-45 919 für pHIT-Vlc-46 972 für pHIT-Vlc-47	IBA GmbH Göttingen
C14	CGCAGTAGCGGTAAACG	17			
C27	TAATACGACTCACTATAGGG	20	pPR-IBA-Vektoren	894 für pHIT-Vlc-48 908 für pHIT-Vlc-49	IBA GmbH Göttingen
C28	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	20			
C31	GATTATTTGCACGGCGTCACACTT	24	pBAD/Myc-His-Vektor	1160 für pHIT-Vlc-50	Invitrogen
C32	GATGGTCGACGGCGCTATTCAG	22			
C35	GGAGCGGAAAAAATG	16	pHT01-Vektor	1047 für pHIT-Vlc-51	[255]
C36	TGTTCCAGGTAAGGTATAAAC	21			

3.2 Bakteriologische Methoden

3.2.1 Anzucht von Bakterienstämmen

Die Kultivierung der *C. perfringens*-Isolate erfolgte unter anaeroben Bedingungen (Anaerobiertöpfe mit AnaeroGen™ Beutel) auf Zeissler-Nährboden und in Serumbouillon bzw. in paraffinüberschichteter Leberbouillon nach Tarozzi (37 °C, 16-48 h).

E. coli und *B. subtilis*-Stämme wurden auf Luria-Bertani Agar (LBA) bzw. in Luria-Bertani Medium (LBM) angezüchtet (37 °C, 16 h). *B. subtilis* wurde außerdem in Spizizens

Minimalmedium (SMM) kultiviert. Zur Selektion bzw. Stabilisierung der Transformanten enthielten die Medien unterschiedliche Antibiotikazusätze (siehe Tabelle 5).

3.2.2 Expression der rekombinanten Toxine in *E. coli*

Zur Expression der rekombinanten Toxine wurden 3 ml einer frischen LBM-Übernachtskultur des Expressionsklons (Zusätze siehe Tabelle 5) in 50 ml LBM inkubiert (16 h, 37 °C, 180 rpm). Die Vorkultur wurde in 1 l LBM überführt und nach Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,5 (37 °C, 120 rpm) ein Induktor hinzugegeben. Nach 4- bzw. 16-stündiger Inkubation bei 30 °C wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (Sorvall RC5B, GS3-Rotor, 5000 rpm, 25 min) gewonnen (Induktionsparameter siehe Tabelle 5).

3.2.3 Expression des rekombinanten Beta2-Toxins in *B. subtilis*

Mit einer frischen SMM-Übernachtskultur von WB800N-(pHIT-Vlc-51) wurden 250 ml SMM (5 µg/ml Chloramphenicol) in einem 2 l-Erlenmeyerkolben auf eine OD₅₇₈ von 0,3 eingestellt und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,9 inkubiert (37 °C, 180 rpm). Nach Hinzufügen des Induktors Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, 1 mM) wurde die Expressionskultur in einem mit Argon gefluteten Zentrifugengefäß dicht verschlossen und für 4 h bei 25 °C und 50 rpm inkubiert. Durch Zentrifugation (Sorval RC5B, GS3, 4500 x g, 4 °C, 30 min) konnte der toxinhaltige Überstand gewonnen werden.

3.2.4 Herstellung chemokompetenter *E. coli* mit der CaCl₂-Methode

TOP-10F', XL1-Blue und Rosetta-Gami 2 wurde auf LBA-Platten angezüchtet, Einzelkulturen in 5 ml LBM überimpft und 16 h bei 37 °C inkubiert. Für Rosetta-Gami 2 enthielten sämtliche Medien Tetracyclin (12,5 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml). Nach Inkubation (37 °C, 180 rpm bis OD₅₅₀ = 0,5) von 1 ml der Übernachtskultur in 100 ml LBM wurden die Zellen gewonnen (5 min, 4000 x g, 4 °C), in 25 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt, die Pellets in 4 ml 50 mM CaCl₂-Lösung (15 % Glycerin) aufgenommen, in 200 µl Aliquots schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.2.5 Lagerung von Bakterien

500 µl Übernachtskultur wurden mit 500 µl frischem Kultivierungsmedium (30 % Glycerin) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C bevorratet.

3.3 Techniken für die in-vitro Rekombination

3.3.1 Freisetzung und Aufreinigung von DNA

3.3.1.1 DNA-Extraktion aus *C. perfringens*

Die Stämme wurden in Serumbouillon angezüchtet (37 °C, 20 h, anaerob) und 5 ml der Kultur fünf Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Resuspension der Pellets in *A. deionisata* und neuerlicher Zentrifugation wurden die Pellets in 0,2 N NaOH-Lösung mit 2 % SDS überführt und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Der in einem weiteren Zentrifugationsschritt (16000 x g, 15 min) gewonnene Überstand wurde mit 500 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (25:24:1) versetzt und zentrifugiert (16000 x g, 3 min). Durch die 30-minütige Inkubation der oberen Phase des Überstandes mit 40 µl Natrium-Acetat-Lösung (3 M) und 1 ml Ethanol konnte die DNA gefällt und durch Zentrifugation (16000 x g, 15 min) gewonnen werden. Die Pellets wurden mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (16000 x g, 15 min). Es folgte die Resuspension der luftgetrockneten Pellets in 20 µl *A. deionisata* und die Lagerung der DNA bei -20 °C.

3.3.1.2 „Lysis by boiling“ Methode

Zu 300 µl einer frischen *C. perfringens*- bzw. *E. coli*-Kultur (Inkubation 4-16 h, 37 °C, 180 rpm) wurden 700 µl *A. deionisata* hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert.

3.3.1.3 Aufreinigung von DNA mittels „QIAquick Spin Purification“

Zur Aufreinigung, Umpufferung und Konzentrierung von DNA wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ gemäß Herstelleranweisung verwendet. Die Elution der DNA erfolgte mit *A. deionisata* oder Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer).

3.3.1.4 Aufreinigung von DNA mittels Ethanolfällung

Die DNA-Suspensionen wurden nach Zugabe von 3 M Natriumacetat-Lösung (1:10) und Ethanol (3:1) gevortext und für 30 min bei -70 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (12000 x g, 4 °C, 30 min) folgten zwei Waschschrte mit 200 µl 70 %igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (12000 x g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet nach vollständigem Trocknen in *A. deionisata* oder TE-Puffer aufgenommen.

3.3.1.5 Gezielte Aufreinigung einzelner DNA-Fragmente mittels QIAEX II Gel Extraction

Zur gezielten Aufreinigung bestimmter DNA-Fragmente aus einem Gemisch wurden die Proben gelelektrophoretisch in Agarosegelen (1 %) aufgetrennt. Nach kurzer (< 1 min) Inkubation im Ethidiumbromid-Bad (2 mg/l) konnte die Ziel-DNA-Bande identifiziert und unter UV-Kontrolle der entsprechende Gelbereich ausgeschnitten werden. Zur Aufreinigung der DNA aus dem Gelstück wurde das "QIAEX II Gel Extraction-Kit" verwendet. Die Elution der DNA erfolgte mittels *A. deionisata* oder TE-Puffer.

3.3.1.6 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Zur Gewinnung von Plasmiden aus *E. coli* wurde das "QIAGEN-Plasmid Purification-Kit" gemäß Herstellerangaben verwendet.

3.3.2 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der DNA

Mittels ND-1000 Spektrophotometer wurden in 1,5 µl Probenauftrag die Extinktionen bei 260 nm zur Konzentrationsbestimmung und bei 230 und 280 nm zur Ermittlung der Reinheitskoeffizienten (260:230- und 260:280-*ratio*) ermittelt.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Übersicht über die eingesetzten Primer und Templates geben Tabelle 6 und Tabelle 7. Die Reaktionsansätze für die PCR sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Amplifikation erfolgte im TGradient 96 Thermocycler. An eine fünfminütige Denaturierungsphase (95 °C) schlossen sich, wie in Tabelle 9 aufgelistet, primerspezifische Zyklen an. Einer terminalen Elongationsphase (5 min, 72 °C) folgte die Lagerung der Ansätze bei 4 und schließlich -20 °C. Zur Überprüfung der Amplifikation wurden die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die PCR

Reaktionsansatz	µl
<i>A. deionisata</i>	37,1
GeneAmp® 10 x PCR-Puffer II	5
25 mM MgCL ₂ -Lösung	3,5
4 mM dNTPs	2,15
Forward Primer (100 pmol/µl)	0,5
Reverse Primer (100 pmol/µl)	0,5
Ampli-Taq® I-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25
Template DNA	1
Summe	50

Tabelle 9: Übersicht über die Temperaturverläufe in den durchgeführten PCRs

Primer- kombination	Temp. (°C)	Dauer (min)	Zyklen	Temp. (°C)	Dauer (min)	Zyklen
C7/C8	-	-	-	95	1	25
				55	1	
				72	3	
C21/C22 C25/C24	95	1	5	95	1	25
	55	1		65	1	
	72	3		72	3	
C29/30	95	1	5	95	1	25
	60	1		65	1	
	72	3		72	3	
C39/41	-	-	-	95	1	35
				50	1	
				72	3	
C3/C4	-	-	-	95	1	30
C11/C12						
C19/C20						
C13/C14				50	1	
C27/C28				72	3	
C31/C32						
C35/C36						

3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-haltigen Proben wurde im Verhältnis 1:6 mit Ladepuffer (6 x) versetzt und in 0,5 – 2 %igen Tris-Acetat-EDTA-Puffer- (TAE-) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde in einer Electro 4-Gelkammer eine Spannung von 10 - 120 V über 1 – 16 h angelegt. Zur Sichtbarmachung linearer DNA-Fragmente im ultravioletten Licht enthielten die Gele 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Wurden zirkuläre Plasmide aufgetrennt erfolgte die Färbung erst im Anschluss an die Elektrophorese im Ethidiumbromid-Bad (2 mg/l). Zur Bestimmung der molekularen Masse der Banden wurden probenabhängig verschiedene Molekulargewichtsmarker mitgeführt.

3.3.5 Restriktionsversuche

Die Restriktionsversuche wurden entsprechend Tabelle 10 (PCR-Amplifikate) bzw. Tabelle 11 (Vektoren) im TGradient 96 Thermocycler durchgeführt.

3.3.6 Ligationsversuche

Aufgereinigte (3.3.1.3 - 3.3.1.5) Produkte aus den Restriktionsversuchen wurden im TGradient 96 Thermocycler ligiert. Entsprechend Tabelle 12 wurden bis zu 200 ng Vektor mit Insert in

definiertem molaren Verhältnis für 16 Stunden bei 4 bzw. 14 °C in Anwesenheit von T4-DNA-Ligase und Puffer inkubiert.

Tabelle 10: Übersicht über die durchgeführten Restriktionsversuche zur Gewinnung von Insert-DNA

Nr.	DNA	µg	Restriktionsenzyme	Ansatzgröße (µl)	Restriktionspuffer	Inkubation
1	pGEM-T- <i>cpb</i>	10,2	50 U BsaI	250	NEBuffer 3 10x 25 µl	1 h, 50 °C
2	Amplifikat C21/C22	2,5	40 U BsaI	50	NEBuffer 3 10x 5 µl	1 h, 50 °C
3	Amplifikat C21/C22	9,3	130 U BsaI	50	NEBuffer 3 10x 5 µl	1 h, 50 °C
4	Amplifikat C25/C24	8,9	130 U BsaI	50	NEBuffer 3 10x 5 µl	1 h, 50 °C
5	Amplifikat C29/C30	3,5	20 U NcoI 20 U EcoRI	100	Tango 10x 20 µl	1 h, 37 °C
6	Amplifikat C39/C41	1,5	15 U AatII 15 U XbaI	70	Tango 10x 7 µl	1,5 h, 37 °C

Tabelle 11: Übersicht über die durchgeführten Restriktionsversuche zur Gewinnung von Vektor-DNA

Nr.	DNA	µg	Restriktionsenzyme	Ansatzgröße (µl)	Restriktionspuffer	Inkubation
A	pASK-IBA5plus	25,5	120 U BsaI	50	NEBuffer 3 10x 5 µl	1 h, 50 °C
B	pASK-IBA3plus	4	40 U BsaI	50	NEBuffer 3 10x 5 µl	1 h, 50 °C
C	pASK-IBA4	4	40 U BsaI	50	NEBuffer 3 10x 5 µl	1 h, 50 °C
D	pPR-IBA1	4	40 U BsaI	50	NEBuffer 3 10x 5 µl	1 h, 50 °C
E	pPR-IBA2	4	40 U BsaI	50	NEBuffer 3 10x 5 µl	1 h, 50 °C
F	pBAD/ <i>Myc-His</i>	5	20 U NcoI 20 U EcoRI	100	Tango 10x 20 µl	1 h, 37 °C
G	pHT01	2	20 U AatII 20 U XbaI ¹⁾	50	Tango 10x 5 µl	3 h, 37 °C

¹⁾ Zugabe erst nach 1,5 h

Tabelle 12: Übersicht über die durchgeführten Ligationsversuche

resultierendes Plasmid	Vektor [Restriktions-versuch Nr.]*	Menge	molares Verhältnis Vektor:Insert	Insert [Restriktions-versuch Nr.]**	Ligase-puffer (µl)	Ligase (U)	Ansatz -volumen (µl)	Inkubation
pGEM-T- <i>cpb</i>	pGEM-T [linear bezogen]	50 ng 50 ng 50 ng	1:3 1:1 3:1	Amplifikat C7/C8 [ungeschnitten]	2	3	10	16 h, 4°C
pHIT-Vlc-42	pASK-IBA5plus [A]	53 ng 33 ng	1:3 1:7	<i>cpb</i> [1]	4	0,5	20	16 h, 4°C
pHIT-Vlc-45	pASK-IBA5plus [A]	100 ng 100 ng	1:3 1:7	<i>cpb2</i> [2]	4	1	20	16 h, 14°C
pHIT-Vlc-46	pASK-IBA3plus [B]	200 ng 200 ng	1:3 1:7	<i>cpb2</i> [4]	8	2	40	16 h, 14°C
pHIT-Vlc-47	pASK-IBA4 [C]	200 ng 200 ng	1:3 1:7	<i>cpb2</i> [3]	8	2	40	16 h, 14°C
pHIT-Vlc-48	pPR-IBA1 [D]	200 ng 200 ng	1:3 1:7	<i>cpb2</i> [4]	8	2	40	16 h, 14°C
pHIT-Vlc-49	pPR-IBA2 [E]	200 ng 200 ng	1:3 1:7	<i>cpb2</i> [3]	8	2	40	16 h, 14°C
pHIT-Vlc-50	pBAD/Myc-His [F]	200 ng 200 ng	1:3 1:7	<i>cpb2</i> [5]	8	2	40	16 h, 14°C
pHIT-Vlc-51	pHT01 [G]	100 ng 100 ng	1:3 1:7	<i>cpb2</i> [6]	8	2	40	16 h, 14°C

** siehe Tabelle 11 * siehe Tabelle 12

3.3.7 Transformationsversuche

3.3.7.1 Transformation chemokompetenter *E. coli*

In Anlehnung an das Protokoll von Hanahan [256] wurden kompetente *E. coli* (3.2.4) transformiert. Jeweils 2 und 15 µl der Ligationsansätze bzw. 1 µl einer Plasmidlösung wurden in 200 µl Suspension kompetenter *E. coli* (3.2.4) für 30 min auf Eis, 90 sec im Wasserbad (42 °C) und 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LBM wurden die Kulturen im Hybridisierungs-Ofen inkubiert (1,5 h, 37 °C, Rotation), anschließend 100 µl sowie das in 100 µl Überstand resuspendierte Pellet der übrigen 900 µl (4500 x g, 5 min, Tischzentrifuge) auf selektivem LBA (50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.3.7.2 Transformation von *B. subtilis*

B. subtilis WB800N wurde entsprechend den Protokollen von Anagnostopoulos *et al.* transformiert [257]. Drei Milliliter HS-Medium wurden mit einer frischen WB800N Einzelkolonie beimpft und 16 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an die dreistündige Inkubation (30 °C,

120 rpm) von 1 ml der HS-Kultur in 20 ml LS-Medium (30 °C) wurde zu jeweils 1 ml LS-Kultur 1 µg pHT01 bzw. 1-15 µg pHIT-Vlc-51 hinzugegeben. Nach 2 h (37 °C, Rotation, Hybridisierungssofen) wurden 100 µl sowie das in 100 µl Überstand resuspendierte Pellet der übrigen 900 µl (4500 x g, 5 min, Tischzentrifuge) auf selektivem LBA (5 µg/ml Chloramphenicol) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.3.7.3 Elektrotransformation von *C. perfringens*

Entsprechend dem Protokoll von Jiraskova [67] sollte *C. perfringens* 121/91 mit pHT01 und pHIT-Vlc-51 transformiert werden. Mit 5 ml einer TPG-Medium-Übernachtskultur (37 °C, anaerob) von *C. perfringens* 121/91 wurden 100 ml TPG-Medium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 inkubiert (37 °C, anaerob). Durch Zentrifugation (15 min, 20 °C, 12000 x g, GSA-Rotor) wurden die Zellen gewonnen, anschließend erst mit 10 ml SMP-Elektroporationspuffer gewaschen und dann in der gleichen Menge resuspendiert. 0,2 ml Aliquots wurden mit 10 µg Vektor-DNA vermischt, auf vorgekühlte 0,1 cm Küvetten übertragen und 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde im Biorad Gene Pulser durchgeführt (200 Ohm, 0,6 / 1,2 / 1,8 kV, 25 µF). Anschließend wurden die Küvetten mit 1 ml BHI Regenerationsmedium (vorher zur Sauerstoffverdrängung 10 min bei 100°C inkubiert und in Greiner-Röhrchen luftdicht verschlossen) gespült und die Zellsuspension in 9 ml des gleichen Mediums überführt. Nach Inkubation (37 °C, 3 h, anaerob) wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 2000 x g) gewonnen, in 1 ml BHI-diluted-Medium (sauerstoffarm) aufgenommen und jeweils 100 µl der Suspension auf BHI Platten mit und ohne 5 µg/ml Chloramphenicol ausgestrichen. Die restliche Lösung (ca. 800 ml) wurde erneut zentrifugiert (Eppendorfcups, 2000 x g, 10 min, Tischzentrifuge), in 200 µl BHI-diluted-Medium aufgenommen und ebenfalls ausgestrichen. Die Kultivierung aller Platten erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C über Nacht.

3.3.8 Untersuchung der Transformanten mittels PCR und Sequenzierung

Einzelne Kolonien wurden in selektivem Medium vermehrt und mittels PCR auf insert- ("interne PCR") und vektorspezifische ("externe PCR") DNA untersucht (3.3.3). Konnten die Transformanten in der PCR bestätigt werden, wurden Amplifikate der externen PCR bzw. reisierte Plasmide nach Aufreinigung (3.3.1.3 bzw. 3.3.1.6) mit den entsprechenden Primern (Tabelle 7) zur Sequenzierung bei *GENterprise* GENOMICS eingereicht. Eine Übersicht über die durchgeführten Sequenzierungen gibt Tabelle 13.

Tabelle 13: Übersicht über die teilsequenzierten Plasmide und die verwendeten Sequenzierungsprimer

rekombinantes Plasmid	Sequenzierungsprimer
pGEM®-T::cpb	C3, C4, C11, C12
pHIT-Vlc-42	C3, C4, C7, C8, C13, C14
pHIT-Vlc-45	C13, C14, C19, C20
pHIT-Vlc-46	C13, C14
pHIT-Vlc-47	C13, C14
pHIT-Vlc-48	C27, C28
pHIT-Vlc-49	C27, C28
pHIT-Vlc-48	C19, C20, C27, C28
pHIT-Vlc-50	C19, C20, C31, C32
pHIT-Vlc-51	C19, C20, C35, C36

3.4 Klonierungsstrategien

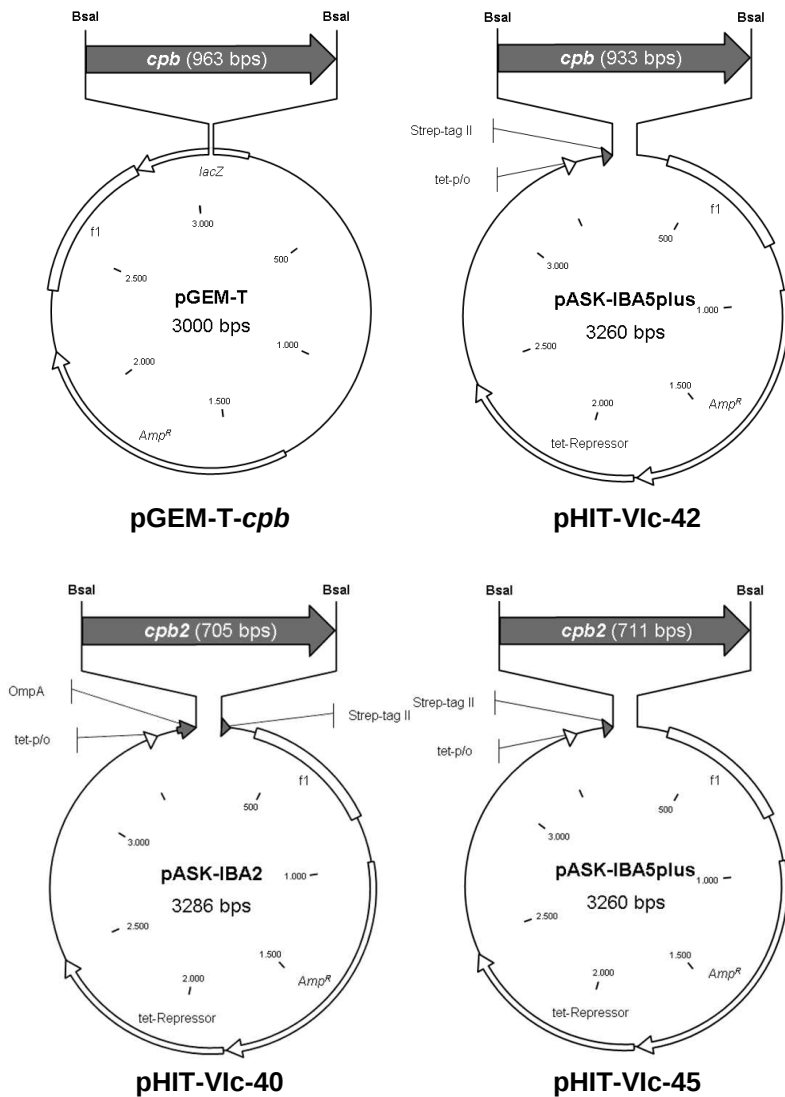


Abbildung 1: Klonierungsstrategien für pGEM-T-*cpb*, pHIT-Vlc-42, -40 und -45

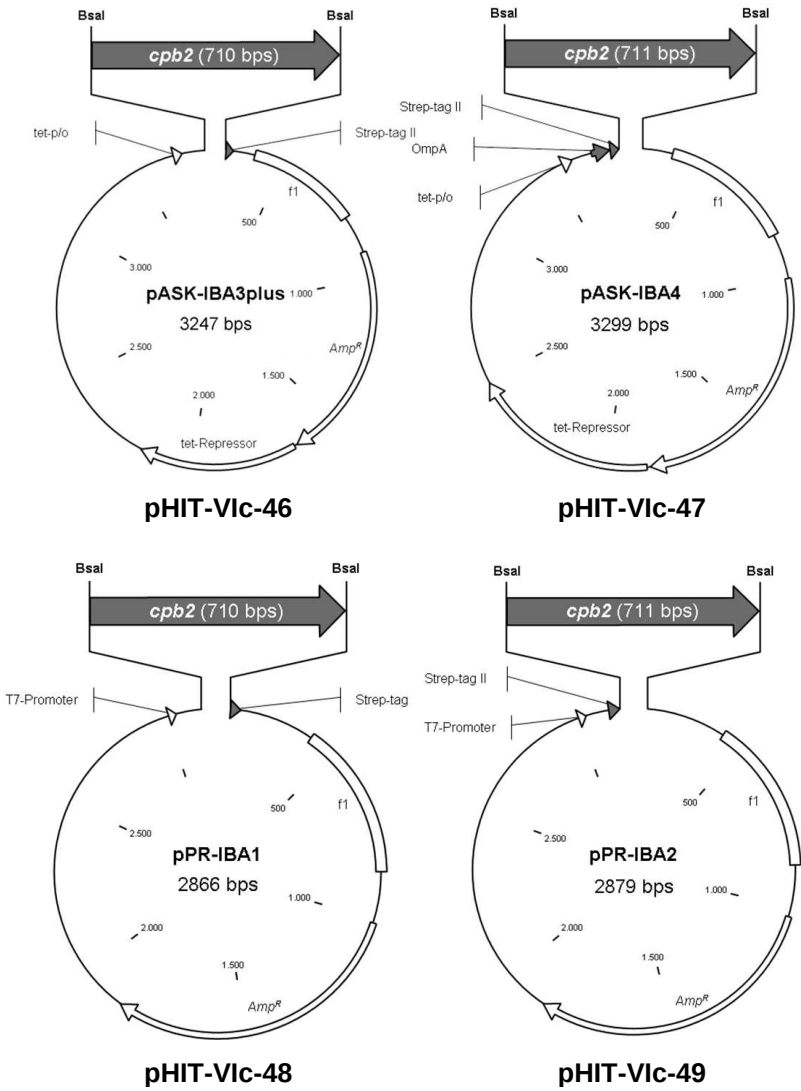


Abbildung 2: Klonierungsstrategien für pHIT-Vlc-46, -47, -48 und -49

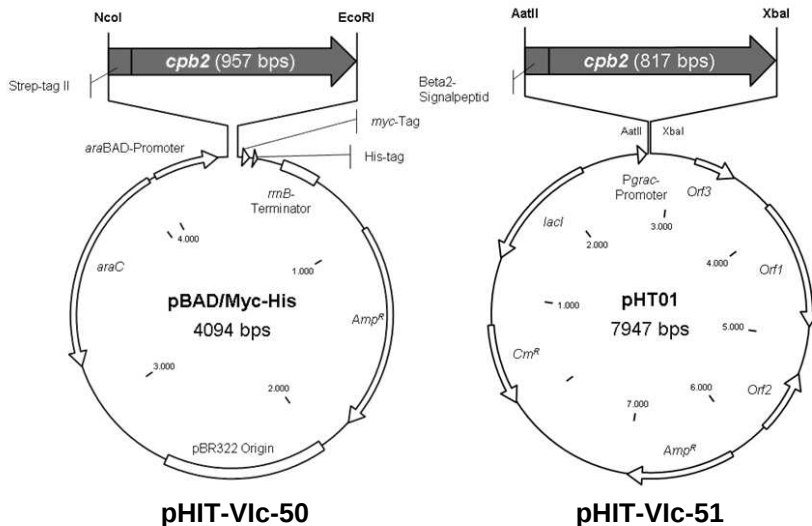


Abbildung 3: Klonierungsstrategien für pHIT-Vlc-50 und -51

3.5 Proteinpräparative und -analytische Methoden

3.5.1 Gewinnung und Aufreinigung der rekombinanten Toxine aus *E. coli*

3.5.1.1 Aufschluss des Zytoplasmas

Die Pellets der Expressionskultur (3.2.2) der zytoplasmatisch exprimierenden Transformanten TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-42), -(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46) bzw. Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) wurden in 6 ml Puffer W aufgenommen und die Bakterienzellen mittels *French press* durch zwei Passagen bei einem Druck von 180 MPa lysiert.

3.5.1.2 Aufschluss des Periplasmas

Um die rekombinanten Beta2-Toxine aus dem Periplasma induzierter TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) und -(pHIT-Vlc-47) freizusetzen, wurden die Pellets der Expressionskulturen (3.2.2) in 10 ml Lysepuffer aufgenommen und 50 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (Sorvall RC5B, SS34-Rotor, 10 min, 10000 *rpm*, 4 °C) der toxinhaltige Überstand gewonnen.

3.5.1.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Toxine

Die toxinhaltigen Lösungen (3.5.1.1, 3.5.1.2) wurden zentrifugiert (Sorvall RC5B, SS34-Rotor, 30 min, 15000 *rpm*, 4 °C) und die Überstände (maximal 25 ml) bei 4 °C auf *Strep*-Tactin-Superflow-Matrix-Säulen (5 ml) aufgetragen. Nach dem Waschen der Säulen mit 3 x 5 ml Puffer W wurden die gebundenen Proteine mit insgesamt 15 ml Puffer E fraktioniert eluiert.

3.5.1.4 Umpufferung des rBeta2-Toxins über Entsalzungssäulen

Vier Milliliter toxinhaltige Lösung wurden mit Hilfe von "Zeba Desalt Spin Column" gemäß Herstelleranweisung in PBS (pH 7,4) umpuffert.

3.5.2 Teilaufreinigung des rBeta2-Toxins aus WB800N-(pHIT-Vlc-51)-Kulturüberständen

2 ml rBeta2-haltiger Kulturüberstand (3.2.3) wurden durch einen Ultrafilter (Amicon Ultra-15, PLGC Ultracel-PL Membrane, 10 kDa) zentrifugiert und das von der Membran zurückgehaltene Residualvolumen (ca. 250 µl) gewonnen.

Alternativ wurden 200 ml Überstand in eine argongefüllte „Amicon Stirred Ultrafiltration Cell 8200“ überführt. Der Argondruck im Gefäß wurde konstant bei 4 Bar gehalten und hierdurch Flüssigkeit und Moleküle < 10 kDa unter langsamem Rühren durch eine PLGC06210-Membran filtriert. Die verbleibende, rBeta2-haltige Lösung (ca. 1 ml) wurde anschließend mit ca. 10 ml Medium ausgespült.

Um Sterilität zu gewährleisten wurden Aliquots von bis zu 500 µl in "Ultrafree MC Centrifugal Filter Units" zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min, 12000 *rpm*) und der sterile Durchfluss gewonnen.

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Ermittlung von Proteinkonzentrationen wurde das "BCA Protein Assay Reagent Kit" und bei geringen Konzentrationen das "Micro BCA Protein Assay Kit" gemäß Anweisungen des Herstellers verwendet. Die OD₅₆₂ der Probe wurde bestimmt (UVIKON 810 Spektrophotometer) und die Gesamtproteinkonzentration berechnet ($= \text{OD}_{562 \text{ nm}} \times \text{Umrechnungskoeffizient}$). Der benötigte Umrechnungskoeffizient wurde mit einer BSA-Standardlösung ermittelt.

3.5.4 SDS-PAGE

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer nach Laemmli versetzt [258] und 5 min bei 100 °C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im 12,5 %igen Gel (Tabelle 14) bei konstanter Spannung von 100 V in einer Minigel-Twin-Kammer. Nach einer Laufzeit von ca. 2 h wurden die Gele über 1 h in Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung und anschließend in

Coomassie-Entfärbelösung bis zur Klärung geschwenkt. Einzelne Gele wurden nach gründlicher Entfärbung zusätzlich einer Silberfärbung (Silver Stain Kit) unterzogen.

3.5.5 ***Strep-Tag®* II-Western Blot**

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (3.5.4) aufgetrennt und unter Verwendung des *Semi-Dry*-Verfahrens [259] auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Den vollständigen Transfer der Proteine belegte die Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliantblau. Nach Renaturierung über Nacht bei 4 °C in PBS wurde die Nitrocellulose-Membran für eine Stunde bei 37 °C (alle folgenden Inkubationen entsprechend) in 20 ml Pepton-Blockpuffer (1:10 in *A. deionisata* verdünnt) inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBS-Tween (20 ml) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 20 ml PBS versetzt mit *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat (1:4000). Nach je zweimaligem Waschen mit 20 ml PBS-Tween und PBS wurde die Substratlösung hinzugefügt und die Enzymreaktion schließlich mit *A. deionisata* abgestoppt. Eine Größenanalyse detektierter Banden erfolgte mit Hilfe des Programmes EasyWin32.

Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Stammlösung	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (4,5 %)
Tris-HCl-Puffer (2 M, pH 8,6)	2,5 ml	-
Tris-Phosphat-Puffer (0,6 mM, pH 6,8)	-	250 µl
Acrylamid:N,N'-Methylen-bis-acrylamid (30:0,8)	5 ml	-
Acrylamid:N,N'-Methylen-bis-acrylamid (50:1,5)	-	250 µl
SDS (20 %)	62,5 µl	12,5 µl
Harnstoff (8 M)	3,75 ml	1,5 ml
<i>A. deionisata</i>	890 µl	450 µl
APS (10 %)	60 µl	75 µl
TEMED	10 µl	2,5 µl

3.5.6 **Immunblot**

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und in Pepton-Blockpuffer inkubiert (siehe 3.5.4, 3.5.5). Nach drei Waschschritten (5 min, 20 ml PBS-Tween) wurden die Membranen für eine Stunde mit polyklonalem Anti-Beta2-Kaninchen-Serum (1:500 in 20 ml PBS-Tween) bei 37 °C inkubiert (alle folgenden Inkubationen entsprechend) und erneut gewaschen. Der Inkubation mit Anti-Kaninchen-Antikörper-

Peroxidase-Konjugat (1:500 in 20 ml PBS) folgte nach drei weiteren Waschschritten mit 20 ml PBS die Zugabe von Substratlösung.

Um auch das schwach konzentrierte, rekombinante Beta2-Toxin aus WB800N-(pHIT-Vlc-51) detektieren zu können, wurde als sekundärer Antikörper ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Antikörper eingesetzt (1:500 in 20 ml PBS-Tween), der nach einstündiger Inkubation und drei Waschschritten mit PBS-Tween durch Streptavidin-biotinylierte Meerrettichperoxidasekomplexe (1:2000 in 20 ml PBS, 1 h, 37 °C) gebunden wurde.

Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurde Substratlösung hinzugegeben und die Enzymreaktion nach Sichtbarwerden der Banden mit *A. deionisata* abgestoppt. Eine Größenanalyse detektierter Banden erfolgte mit Hilfe des Programmes EasyWin32.

3.5.7 Bio-X Enterotoxämie ELISA Kit

Das Bio-X Enterotoxämie ELISA Kit wurde gemäß Herstelleranweisung eingesetzt.

3.5.8 Beta2-Toxin-Fangantikörper-ELISA

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (NUNC-Maxisorp) wurden mit dem monoklonalen Antikörper 2-4A5 [23] (0,3 µg/100 µl Coatingpuffer) durch Inkubation bei 4 °C über Nacht beschichtet. Wie auch nach allen weiteren Inkubationsschritten wurden sie anschließend drei Mal mit 200 µl PBS-Tween für fünf Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem Blocken freier Bindungsstellen mit 200 µl Pepton-Blockpuffer (1 h, 37 °C) wurden die Vertiefungen mit Probelösung befüllt (1 h, 37 °C). Es folgte die Immundekoration mit 100 µl Anti-Beta2-Kaninchen-Serum (1:2000 in PBS) für 1 h bei 37 °C. Als Sekundäantikörper diente ein Anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat (100 µl, 1:2000 in PBS). Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und drei weiteren Waschschritten wurden 100 µl einer ABTS-Substratlösung in die Vertiefungen gegeben und nach 15 min (37 °C) die Extinktionen bei 405 nm mit dem Multiskan Ascent-Photometer ermittelt.

3.5.9 Renaturierungsversuche mit rekombinantem Beta2-Toxin

Jeweils 0,1 mg des rekombinanten Beta2-Toxins aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) in 100 µl PBS-Puffer (pH 7,4) wurden zur Renaturierung mit 900 µl eines Renaturierungspuffers des „Renaturation Basic Kit for Proteins“ (Tabelle 15) versetzt und 1 h bzw. 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl im Beta2-spezifischen Fangantikörper-ELISA (3.5.8) auf das Vorhandensein des Beta2-Toxins geprüft. Nur Beta2-positive Renaturierungschargen wurden nachfolgend im Mausmodell auf eine letale Wirkung getestet. Hierzu wurden 400 µl Renaturierungslösung (40 µg rBeta2) und als Kontrolle die entsprechenden Renaturierungspuffer allein BALB/c-Mäusen intraperitoneal appliziert (3.7.4).

Tabelle 15: Zur Renaturierung von rekombinantem Beta2-Toxin aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-40) verwendete Puffer

Puffer	pH	NaCl (M)	PPS (M)	DTT (M)	L-GSH ox. (M)	L-GSH red. (M)
0,05 M MES	6,5	0,1				
0,05 M MES	6,5	0,1	1			
0,05 M MES	6,5	0,2				
0,05 M MES	6,5	0,2	1			
0,05 M MES	6,5			0,001		
0,05 M MES	6,5		1	0,001		
0,05 M MES	6,5	0,1		0,001		
0,05 M MES	6,5	0,1	1	0,001		
0,05 M MES	6,5	0,2		0,001		
0,05 M MES	6,5	0,2	1	0,001		
0,05 M MES	6,5				0,001	0,005
0,05 M MES	6,5		1		0,001	0,005
0,05 M MES	6,5	0,1			0,001	0,005
0,05 M MES	6,5	0,1	1		0,001	0,005
0,05 M MES	6,5	0,2			0,001	0,005
0,05 M MES	6,5	0,2	1		0,001	0,005
0,05 M HEPES	7,5					
0,05 M HEPES	7,5		1			
0,05 M HEPES	7,5	0,1				
0,05 M HEPES	7,5	0,1	1			
0,05 M HEPES	7,5	0,2				
0,05 M HEPES	7,5	0,2	1			
0,05 M HEPES	7,5			0,001		
0,05 M HEPES	7,5		1	0,001		
0,05 M HEPES	7,5	0,1		0,001		
0,05 M HEPES	7,5	0,1	1	0,001		
0,05 M HEPES	7,5	0,2		0,001		
0,05 M HEPES	7,5	0,2	1	0,001		
0,05 M HEPES	7,5				0,001	0,005
0,05 M HEPES	7,5		1		0,001	0,005
0,05 M HEPES	7,5	0,1			0,001	0,005
0,05 M HEPES	7,5	0,1	1		0,001	0,005
0,05 M HEPES	7,5	0,2			0,001	0,005
0,05 M HEPES	7,5	0,2	1		0,001	0,005
0,05 M TRIS	8,5	0,1				
0,05 M TRIS	8,5	0,1	1			
0,05 M TRIS	8,5	0,2				
0,05 M TRIS	8,5	0,2	1			
0,05 M TRIS	8,5			0,001		
0,05 M TRIS	8,5		1	0,001		
0,05 M TRIS	8,5	0,1		0,001		
0,05 M TRIS	8,5	0,1	1	0,001		
0,05 M TRIS	8,5	0,2		0,001		
0,05 M TRIS	8,5	0,2	1	0,001		
0,05 M TRIS	8,5				0,001	0,005
0,05 M TRIS	8,5		1		0,001	0,005
0,05 M TRIS	8,5	0,1			0,001	0,005
0,05 M TRIS	8,5	0,1	1		0,001	0,005
0,05 M TRIS	8,5	0,2			0,001	0,005
0,05 M TRIS	8,5	0,2	1		0,001	0,005

3.6 Zellkulturmethoden

3.6.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der adhärent wachsenden **Caco-2-Zellen** erfolgte in Plastik-Zellkulturflaschen (10 ml) bei 37 °C (5 % CO₂, Wasserdampfsättigung) im Brutschrank. Als Nährmedium diente Zellkulturmedium 1. Für die Zellernte wurde zunächst das Medium komplett aus dem Zellkulturgefäß abgesaugt. Verbleibende Mediumreste wurden durch Spülen mit 10 ml HEPES-Puffer entfernt. Nach Zugabe von 10 ml Trypsin-Gebrauchslösung erfolgte eine 5-10 minütige Inkubation im Brutschrank. Danach wurde die Suspension der abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml, Greiner) überführt, die Flasche mit 10 ml Zellkulturmedium 1 ausgespült und diese Waschfraktion ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 202 x g (20 °C, 7 min) (Omnifuge 2.0 RS). Das resultierende Pellet wurde in Zellkulturmedium 1 resuspendiert und ein Aliquot nach Anfärbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Durch Zugabe von Medium konnte die erforderliche Zelldichte von 4 x 10⁴ Zellen/μl zur Aussaat in *Microwell*-Platten (96-Loch, Flachboden, 100 μl/Well) eingestellt werden. Anschließend wurden die Platten bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens (48-72 Stunden) inkubiert (37 °C, 5 % CO₂, Wasserdampfsättigung) und im MTT-Versuch eingesetzt.

Um die Zelllinie für weitere Experimente zu erhalten, wurde ein Teil der durch Trypsinierung gewonnenen Zellsuspension in das Zellkulturgefäß zurückgegeben und das Volumen mit Zellkulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Ein Mediumwechsel fand spätestens alle drei Tage statt.

Die Kultivierung der **IPEC J2-Zellen** erfolgte analog unter Verwendung von Zellkulturmedium 2.

3.6.2 Überprüfung der toxischen Wirkung der rBeta2-Toxine auf Caco-2-Zellen

Der toxische Effekt von rBeta2 aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) und -(pHIT-Vlc-45), Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) und WB800N-(pHIT-Vlc-51), sowie von clostridialer Phospholipase C (Sigma) wurde im MTT-Test mit Caco-2-Zellen geprüft. Zu konfluenten Caco-2-Zellrasen in einer Mikrotiterplatte wurden 100 μl Zellkulturmedium 1 und 50 μl Probensuspension in unterschiedlicher Verdünnung (log₂-Verdünnungsreihe, 1. Well: 150 μg rBeta2 aus Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) bzw. 15 μg der anderen Toxine) gegeben und 24 h bei 37 °C (5 % CO₂, Wasserdampfsättigung) inkubiert. Die Umsetzung von 25 μl MTT-Lösung (4 h, 37 °C) durch die mitochondriale Dehydrogenase lebender Zellen zum blauen Farbstoff Formazan wurde durch Zugabe von 100 μl SDS-Lösung (10 % in PBS) gestoppt. Nach vollständiger Lösung des Farbstoffes (20 h, 37 °C, Taumler) wurden die Extinktionen bei 540 nm und 690 nm photometrisch bestimmt (Multiscan Ascent) und die relative Zellaktivität berechnet.

3.6.3 Überprüfung der toxischen Wirkung der rBeta2-Toxine auf IPEC-J2-Zellen

Analog zu 3.6.2 wurde unter Verwendung von Zellkulturmedium 2 der Effekt von rekombinantem Beta2-Toxin aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-40), -(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46) und -(pHIT-Vlc-47) bzw. Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50), rekombinantem Beta-Toxin aus TOP10F'-(pHIT-Vc-42) sowie von clostridialen Alpha-Toxin auf IPEC-J2-Zellen geprüft.

3.7 Tierversuche

Die in Gießen durchgeführten Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen unter den Aktenzeichen II 25.3 – 19 c 20-15 (1) GI 18/6 – Nr. 05/2000 (Schreiben vom 8. März 2000), VI 63 – 19 c 20-15 (1) GI 18/6 – Nr. 05/2000 (Schreiben vom 4. Dezember 2003) und V 54 – 19 c 20-15 (1) GI – Nr. 48/2005 (Schreiben vom 7. März 2006) genehmigt. Die Tierversuche am Impfstoffwerk Dessau-Tornau (Tierversuchsnummer M / F / 491 / 05; Laborbuchnummer FLB (I) 09 / 05) wurden dem Landesverwaltungsamt Halle in der Sammelanzeige IDT A 05/2004 angezeigt.

3.7.1 Tierhaltung

BALB/c-Mäuse wurden in Typ III Standardkäfigen aus Makrolon auf Sägespäne-Einstreu gehalten. Ein pelletiertes Alleinfuttermittel wurde *ad libitum* gefüttert. Die Wasserversorgung war über Flaschentränken sichergestellt. Bis zum Beginn der Versuche wurde den Tieren eine Eingewöhnungszeit von 14 Tagen gewährt.

3.7.2 Injektionstechniken

Zur intraperitonealen Injektion wurden die Mäuse durch einen Griff am Nackenfell und am Schwanz fixiert, in Rückenlage leicht gestreckt und kopfüber gehalten. Von einer zweiten Person wurde die Kanüle (Insulinspritze BD Micro-Fine+) seitlich der Medianen in Höhe des Nabels etwa 1 cm eingeführt.

Die intravenöse Injektion erfolgte in die dorsale Schwanzvene. Hierfür wurde der Schwanz der Tiere durch ein Gitter geführt und durch leichten Zug fixiert. Durch Anstrahlung des Injektionsbereichs mit einer Infrarotlampe gelang die Darstellung des Gefäßes zur Injektion.

3.7.3 Narkose

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Verabreichung von Avertin narkotisiert. Der Erfolg der Narkose wurde anhand des Lidreflexes kontrolliert. Zur schmerzlosen Tötung wurde narkotisierten Tieren Pentobarbital (150 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert.

3.7.4 Belastungsversuche

Die letale Aktivität des Beta-Toxins aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-42) für BALB/c-Mäuse wurde durch intravenöse oder intraperitoneale Applikation von bis zu 15 µg Toxin, vorliegend in einem Gemisch von Elutionspuffer und PBS, überprüft (Tabelle 16). Weitere Belastungsversuche wurden von den Impfstoffwerken Dessau-Tornau mit dem von uns zur Verfügung gestellten Toxin an NMRI-Mäusen durchgeführt.

Sechs Mäuse wurden intravenös mit 30 µg rBeta2-Toxin aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-40) in 100 µl PBS belastet. Jeweils sieben Mäuse erhielten intraperitoneal 50 µg rBeta2-Toxin (vorliegend in 200 µl PBS) aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46) und -(pHIT-Vlc-47), 4 Mäuse 1200 µg aus Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50).

Nach der Toxinapplikation wurden die Mäuse über 72 Stunden beobachtet (1. Tag stündlich, dann 2 x täglich) und die klinischen Symptome (Apathie, Müdigkeit, Freßunlust *etc.*) sowie die Sterberate dokumentiert. Tiere, deren Symptomatik einen letalen Verlauf andeutete, wurden euthanasiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen zum Beta-Toxin

4.1.1 Erzeugung des GVO TOP10F`-(pHIT-Vlc-42)

Zur effizienten Expression des clostridialen Beta-Toxins in hoher Konzentration und Reinheit wurde der GVO *E. coli* TOP10F`-(pHIT-Vlc-42) erzeugt. Hierfür wurde mit Hilfe der Primer C7 und C8 das Beta-Toxingen *cpb* des *C. perfringens*-Stammes NCTC 3180 mit angefügten BsaI-Schnittstellen amplifiziert und durch AT-Klonierung mit Vektor pGEM®-T ligiert. Durch die Transformation von *E. coli* XL1-Blue entstand der Zwischenklon XL1-Blue-(pGEM®-T::cpb). Im Anschluss an die Restriktion des reisolierten Plasmids mit BsaI konnte das *cpb*-Insert (933 bp, Abbildung 4) aufgereinigt und mit BsaI-geschnittenem pASK-IBA-5plus (3180 bp, Abbildung 5) ligiert werden. Durch Transformation von *E. coli* TOP10F` entstand der Expressionsklon TOP10F`-(pHIT-Vlc-42). Seine Plasmide wurden mittels *cpb*- und vektor-spezifischer PCR (Abbildung 6) bzw. durch Sequenzierung bestätigt. Abweichend von der Referenzsequenz (*C. perfringens* NCTC 8533, Typ B, [27]), aber in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Steinthorsdottir [71], wurden Substitutionen von Thymin durch Cytosin an Positon 93 bzw. von Cytosin durch Thymin an Position 993 nachgewiesen (Abbildung 7). Diese wirken sich jedoch nicht auf die Aminosäuresequenz des rekombinanten Beta-Toxins aus.

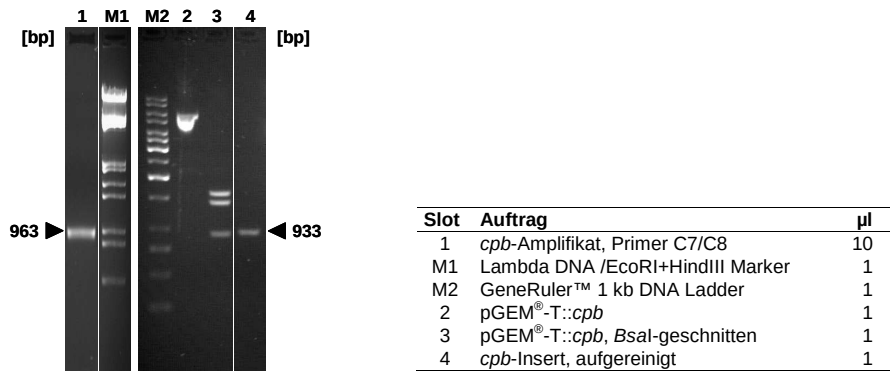


Abbildung 4: Darstellung des Beta-Toxingens in PCR-Produkt bzw. in Restriktions- und Aufreinigungsprodukt von pGEM®-T::cpb mittels Agarosegelelektrophorese

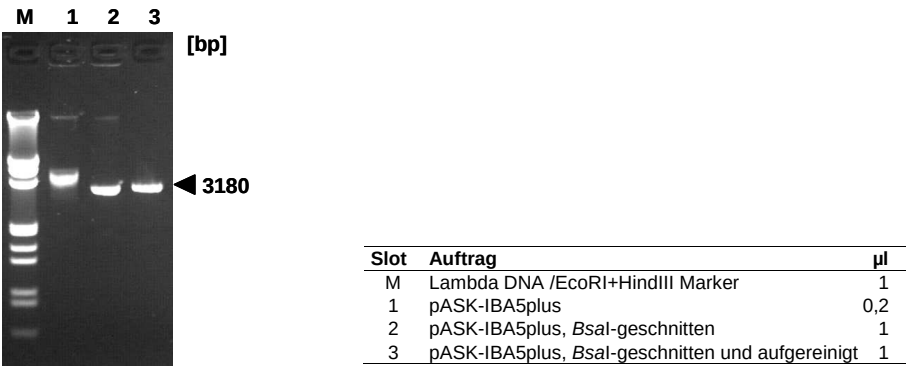


Abbildung 5: Darstellung des linearisierten pASK-IBA5plus in Restriktions- und Aufreinigungsprodukt mittels Agarosegelelektrophorese

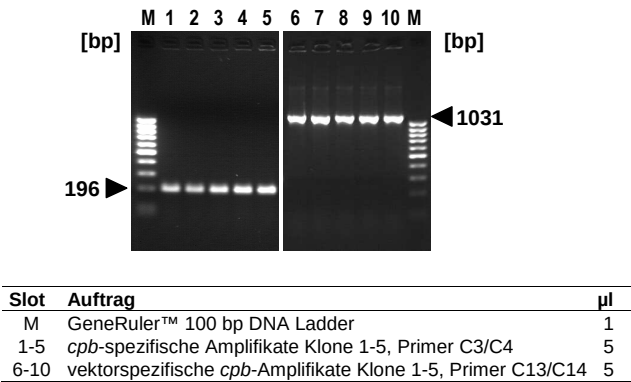


Abbildung 6: Darstellung der *cpb*- (interne PCR) bzw. vektor-spezifischen (externe PCR) Amplifikate von GVO TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-42)-Klonen mittels Agarosegelelektrophorese

4.1.2 Nachweis des rekombinanten Beta-Toxins

4.1.2.1 SDS-PAGE

Um zu überprüfen, ob der induzierte GVO TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-42) rekombinantes Beta-Toxin exprimiert, wurde das über die *Strep*-Tactin-Superflow-Matrix-Säule aufgereinigte Zelllysate in der SDS-PAGE überprüft. Durch Coomassiefärbung der Gele konnten Banden mit dem Beta-Toxin-spezifischen Massenäquivalent von 36 kDa dargestellt werden (Abbildung 8). Außerdem wurde eine weitere Bande mit einer Größe von ca. 60 kDa angefärbt.

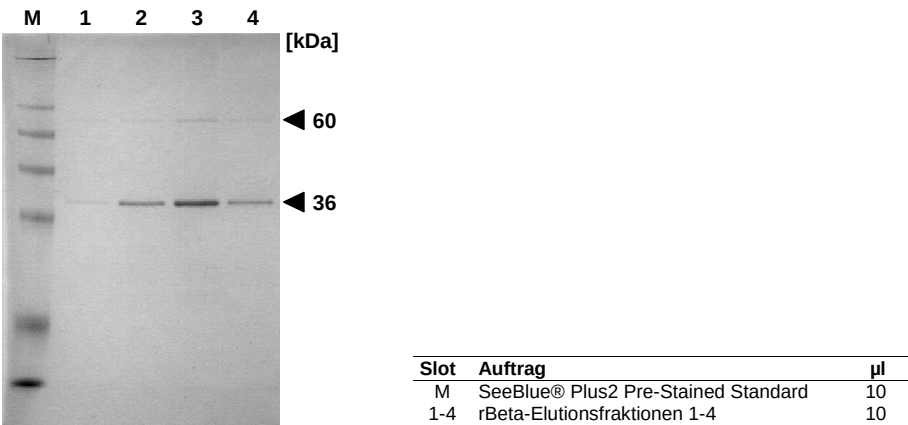
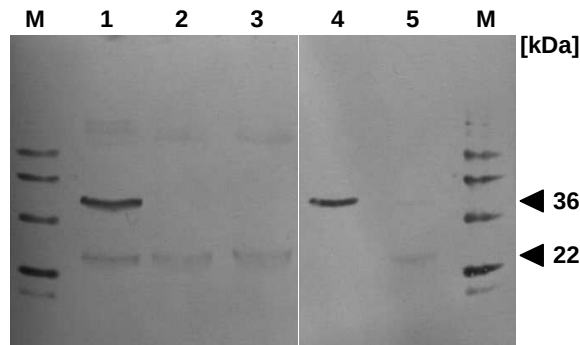


Abbildung 8: Darstellung von rekombinantem Beta-Toxin in Aufreinigungsprodukten von Lysaten des induzierten TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-42) durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

4.1.2.2 *Strep*-Tag® II-Western Blot

Um das mit dem Affinitätsanhängsel *Strep*-Tag® II versehene, rekombinante Beta-Toxin zu detektieren, wurde ein Westernblot mit *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat durchgeführt. Abbildung 9 belegt die erfolgreiche Bindung des Konjugates an das 36 kDa große rekombinante Produkt im Lysat des induzierten TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-42) (Slot 1) bzw. in dessen Aufreinigungsprodukt (Slot 4). Als Negativkontrollen dienten Lysate des nicht induzierten Klon (Slot 2) und von TOP10F⁻ (Slot 3). Detektiert wurde neben dem rekombinanten Toxin auch ein Protein mit einem Massenäquivalent von ca. 22 kDa. Da dieses allerdings erst nach dem rekombinanten Produkt von der Säule gelöst wird (Slot 5) konnte durch fraktionierte Elution das rekombinante Beta-Toxin nahezu rein gewonnen werden (Slot 4).



Slot	Auftrag	µl
M	<i>Strep-Tag</i> Protein Ladder	10
1	Lysat von TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42) (induziert)	15
2	Lysat von TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42) (nicht induziert)	15
3	Lysat von TOP10F ⁺	15
4	Elutionsfraktion 3 von TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42) (induziert)	15
5	Elutionsfraktion 4 von TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42) (induziert)	15
M	<i>Strep-Tag</i> Protein Ladder	10

Abbildung 9: Darstellung des rekombinanten Beta-Toxins in Lysaten und Aufreinigungsprodukten von induziertem TOP10F⁺-(pHIT-Vlc-42) mittels Strep-Tag® II-Western Blot

4.1.2.3 Nachweis des rekombinanten Beta-Toxins im Bio-X Enterotoxämie ELISA

Zum Nachweis Beta-Toxin-spezifischer Epitope wurden 25 µl der Elutionsfraktion 3 aus der affinitätschromatographischen Aufreinigung im Bio-X Enterotoxämie ELISA untersucht. Die mono- und polyklonalen Anti-Beta-Toxin-Antikörper des Kits waren in der Lage, das rekombinante Protein zu binden. Eine Kreuzreaktivität gegenüber den Anti-Alpha-toxin-Antikörpern des Kits wurde nicht beobachtet (Abbildung 10).

4.1.3 Bestimmung der Ausbeute und der Konzentration von rBeta-Präparationen

Um die Konzentration des rekombinanten Beta-Toxins in Proben zu bestimmen wurden diese mittels BCA-Assay untersucht. Die rBeta-Ausbeute von TOP10F⁺-(pHIT-Vlc-42) lag bei 330 µg/l Übernachtskultur. Der überwiegende Anteil des Toxins wurde in Elutionsfraktion 3 gewonnen (siehe 4.1.2.1). Die Konzentration in dieser Fraktion lag bei ca. 500 µg/ml.

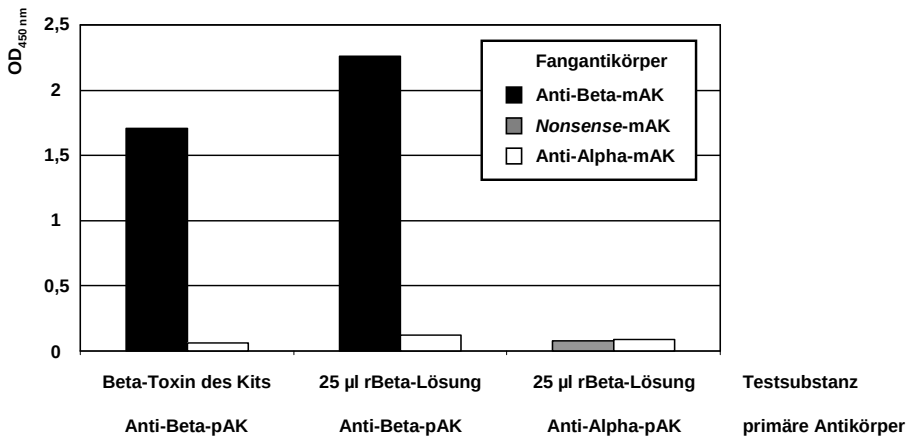


Abbildung 10: Detektion Beta-Toxin-spezifischer Epitope in Aufreinigungsprodukten von induziertem TOP10F´-(pHIT-Vlc-42) mittels Bio-X Enterotoxämie ELISA Kit

4.1.4 Nachweis der biologischen Aktivität des rekombinanten Beta-Toxins im Mausmodell

Um zu überprüfen, ob die letale Aktivität des Beta-Toxins aus TOP10F´-(pHIT-Vlc-42) dem Wildtyp-Toxin entspricht wurden sieben Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse mit dem rekombinanten Produkt belastet. In zwei Vorversuchen führte die intravenöse Applikation von 15 µg Toxin, vorliegend in einem Gemisch von Elutionspuffer und PBS, bei sechs von sechs Mäusen innerhalb 4 h zum Tod. Die Tiere der Kontrollgruppe, denen das Puffergemisch allein verabreicht wurde, zeigten zu keinem Zeitpunkt ein beeinträchtigtes Allgemeinbefinden. Im Hauptversuch wurden insgesamt 47 weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von 8 Wochen mit 0,8 – 15 µg Toxin belastet (Tabelle 16). Weitere Versuche wurden von den Impfstoffwerken Dessau-Tornau (IDT) mit dem von uns zur Verfügung gestellten rekombinanten Beta-Toxin an NMRI-Mäusen durchgeführt. Mit Hilfe der Probitanalyse (SPSS 7.5 für Windows) konnte eine LD₅₀ von 1,56 µg/Maus ermittelt werden.

Tabelle 16: Übersicht über die Ergebnisse der mit dem rekombinanten Beta-Toxin an BALB/c- und NMRI-Mäusen durchgeführten Belastungsversuche

Versuch	Versuchsgruppe	Narkose	Applikation	verabreichte rBeta-Dosis (µg)	Todesrate nach 72 h (tot/Gesamtzahl)
Vorversuch 1 ¹⁾	1	+	i. v.	15	3 / 3
	2			-	0 / 3
Vorversuch 2 ¹⁾	1	-	i. v.	15	3 / 3
	2			-	0 / 3
Hauptversuch ¹⁾	1	-	i. p.	0,8	0 / 3
	2			1,6	0 / 3
	3			2,8	3 / 3
	4			3,2	2 / 2
	5			4,5	5 / 6
	6			6	4 / 6
	7			7,5	6 / 6
	8			9	4 / 6
	9			12	6 / 6
	10			15	4 / 6
IDT-Versuch ²⁾	1	-	i. p.	0,6	0 / 2
	2			0,8	0 / 2
	3			1	0 / 2
	4			1,2	1 / 2
	5			1,5	0 / 2
	6			1,9	2 / 2
	7			2,4	2 / 2

¹⁾ BALB/c-Mäuse

²⁾ NMRI-Mäuse

4.2 Untersuchungen zum Beta2-Toxin

4.2.1 Herstellung von GVO zur rekombinanten Expression des Beta2-Toxins

4.2.1.1 Erzeugung von *E. coli*-Expressionsklonen

TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) exprimiert ein biologisch nicht aktives, rekombinantes Beta2-Toxin mit C-terminalem *Strep*-Tag® II ins Periplasma. Um zu überprüfen ob durch zytoplasmatische Expression oder N-terminale Lokalisation des Affinitätsanhängsels ein Aktivitätsgewinn erzielt werden kann, wurden die Vektoren pASK-IBA3plus (zytoplasmatische Expression, C-terminales Tag), pASK-IBA4 (periplasmatische Expression, N-terminales Tag) und pASK-IBA5plus (zytoplasmatische Expression, N-terminales Tag) für Klonierungsversuche genutzt.

In einer PCR konnte das Beta2-Toxigen aus *C. perfringens* IHIT-P358/05 mit den Primerkombinationen C25/C24 (pASK-IBA3plus) und C21/C22 (pASK-IBA4 und pASK-IBA5plus) mit angefügten Restriktionsschnittstellen amplifiziert werden. Die Amplifikate und pASK-IBA3plus-, -4 bzw. -5plus wurden mit BsaI geschnitten und ligiert. Die gewonnenen

rekombinanten Plasmide pHIT-Vlc-46, -47 und -45 sowie pASK-IBA5plus wurden auf kompetente TOP10F⁻-Zellen übertragen.

Zur Klärung ob Disulfidbrücken für die biologische Aktivität von Beta2-Toxin relevant sind wurden mit *E. coli* Rosetta-Gami 2 Expressionklone erzeugt, deren Zytoplasma günstige Bedingungen für die Bildung Schwefelbrücken aufweist. Da eine Kultivierung von Rosetta-Gami 2 unter dem Selektionsdruck von Tetracyclin stattfindet konnten die rekombinanten pASK-IBA-Vektoren, die mittels Anhydrotetracyclin induziert werden, nicht als Vektoren genutzt werden. Stattdessen wurden die Plasmide pPR-IBA1 (C-terminales *Strep*-Tag® II) und pPR-IBA2 (N-terminales *Strep*-Tag® II), die durch IPTG induzierbare T7-Promotoren besitzen, verwendet. Das Beta2-Toxigen aus P 3228/06 wurde mit den Primerkombinationen C25/C24 (pPR-IBA1) und C21/C22 (pPR-IBA2) amplifiziert. Amplifikate und Vektoren wurden mit BsaI geschnitten, ligiert und mit den resultierenden Plasmiden kompetente TOP10F⁻-Zellen transformiert. Nach Vermehrung der Zwischenklone wurden die rekombinanten Plasmide pHIT-Vlc-48 und pHIT-Vlc-49 reisoliert. Rosetta-Gami 2 konnte mit pHIT-Vlc-48, nicht jedoch mit pHIT-Vlc-49 transformiert werden. Auch der Versuch durch Zugabe von Glukose zum Medium eine frühe, möglicherweise wirtstoxische Basalexpression zu reduzieren führte nur vereinzelt zu Koloniewachstum. Es war hingegen problemlos möglich mit der pHIT-Vlc-49-Plasmidsuspension erneut TOP10F⁻ Zellen zu transformieren, so dass sie prinzipiell zur Transformation geeignet war (Abbildung 11).

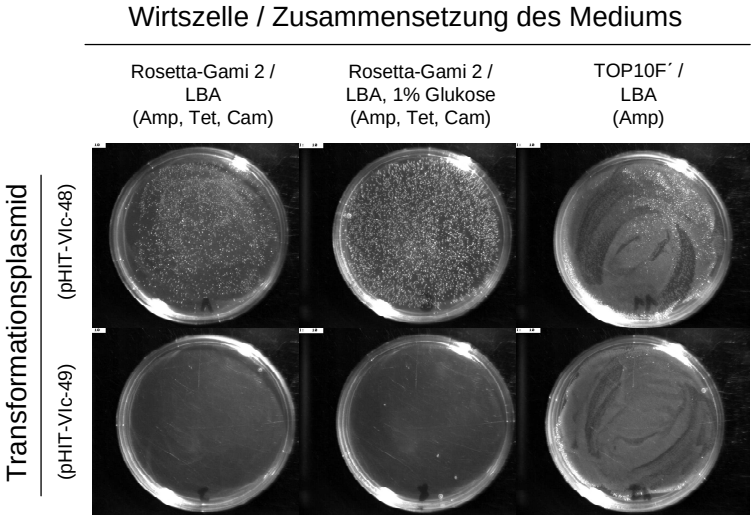
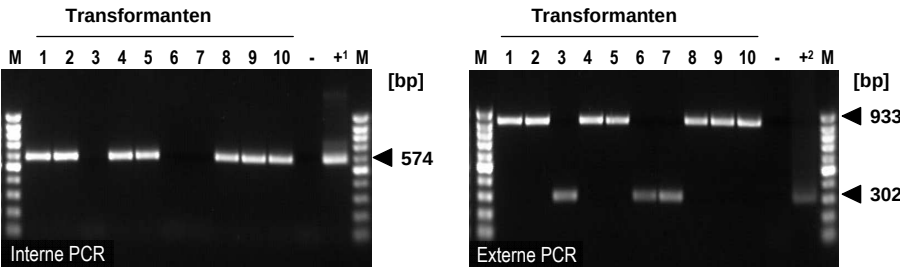


Abbildung 11: Transformationsansätze von Rosetta-Gami 2 und TOP10F⁻ mit pHIT-Vlc-48 und -49 auf LBA mit unterschiedlichen Zusätzen

Um in Rosetta-Gami 2 trotzdem die zytoplasmatische Beta2-Expression mit N-terminalem Tag zu ermöglichen, sollte *cpb2* inklusive *Strep*-Tag® II in pBAD/Myc-His kloniert werden. In einer PCR wurde mit Hilfe der Primer C31 und C32 die entsprechende Sequenz aus pHIT-Vlc-49 amplifiziert und Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Eco*RI angefügt. Amplifikate und pBAD/Myc-His wurden mit den genannten Enzymen geschnitten und anschließend ligiert. Die resultierenden Plamide wurden auf kompetente TOP10F⁻-Zellen sowie nach Reisolierung auch auf kompetente Rosetta-Gami 2 übertragen.

Um den Erfolg der jeweiligen Transformationsreaktion zu verifizieren, wurden mittels PCR insert- bzw. vektorspezifische Sequenzen (574 bzw. 894-1160 bp, Tabelle 7, Abbildung 12 - Abbildung 18) in potentiellen Transformanten nachgewiesen. Lediglich die vereinzelt in mehreren Transformationsversuchen gewonnenen potentiellen Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-49)-Klone konnten nicht bestätigt werden, obwohl die für ihre Transformation eingesetzte Plasmidsuspension Amplifikate korrekter Größe bildete (Abbildung 16). In der internen PCR konnte das *cpb2*-Gen zwar nachgewiesen werden, die Inserts waren jedoch nicht korrekt im Zielvektor eingefügt, da in der externen PCR Sequenzen mit Längen von mehr als 1500 statt 908 Basenpaaren amplifiziert wurden (Abbildung 16).



Slot	Auftrag	µl
M	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	1
1-10	Amplifikat Transformanten	10
-	Amplifikat H ₂ O	10
+ ¹	Amplifikat <i>cpb2</i>	10
+ ²	Amplifikat pASK-IBA5plus	10

Abbildung 12: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45)-Klone aus der *cpb2*- (574 bp) bzw. vektorspezifischen (933 bp) PCR

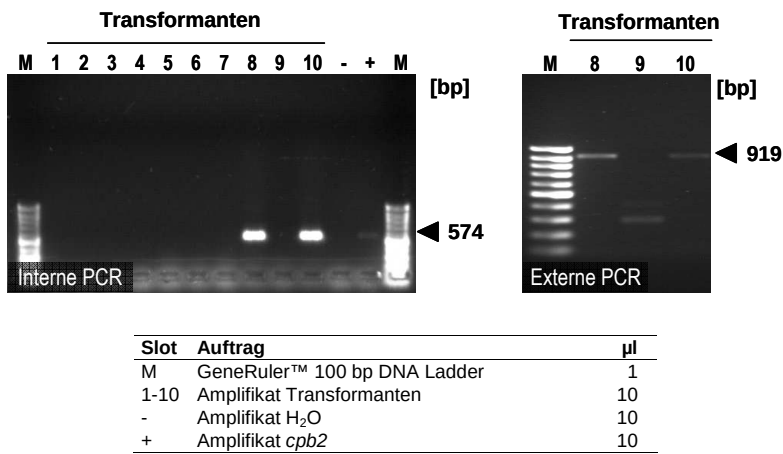


Abbildung 13: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller TOP10F´-(pHIT-Vlc-46)-Klone aus der *cpb2*- (574 bp) bzw. vektorspezifischen (919 bp) PCR

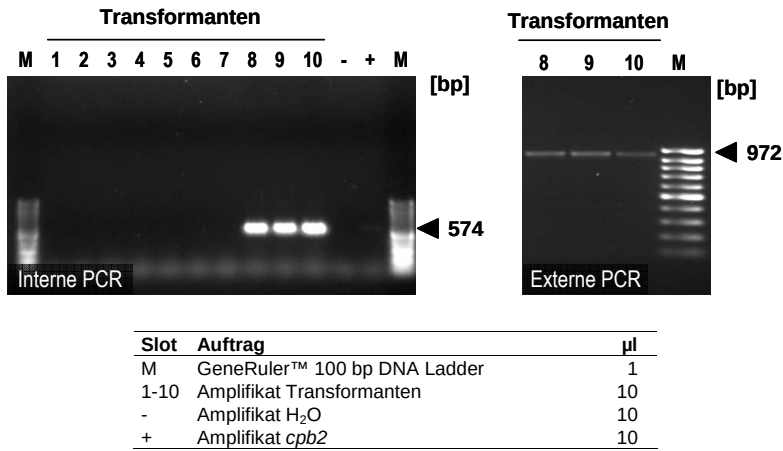
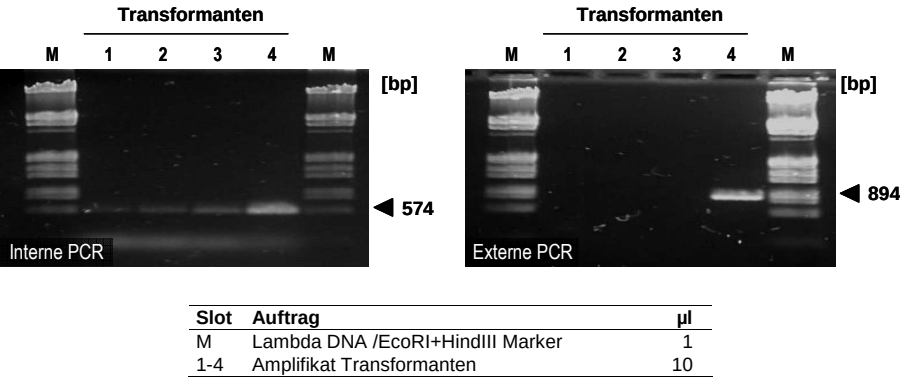
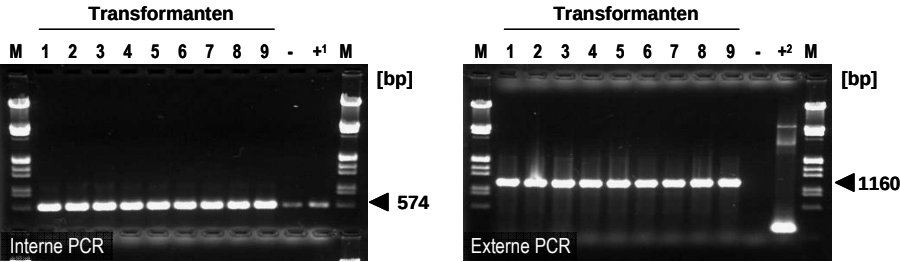


Abbildung 14: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller TOP10F´-(pHIT-Vlc-47)-Klone aus der *cpb2*- (574 bp) bzw. vektorspezifischen (972 bp) PCR





Im Anschluss an die PCR-Untersuchungen wurden die Beta2-Toxin-kodierenden Bereiche der Expressionsplasmide sequenziert. Sie wiesen, verglichen mit der *cpb2*-Referenzsequenz von *C. perfringens* CWC 245 (NCBI Accession L77965, [10]), die erwarteten, vektorbedingten C- und N-terminalen Modifikationen auf (Tabelle 17). Außerdem besaßen alle Plasmide in Position 319 ein Adenin anstelle eines Guanins. Da alle 67 veröffentlichten *cpb2*-Sequenzen in der Untersuchung mit dem *Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides* (BLASTn) [260] die gleiche Substitution aufwiesen, ist nicht von einer Beeinflussung der biologischen Aktivität der rekombinanten Beta2-Toxine auszugehen.

Tabelle 17: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der rekombinanten Beta2-Toxine mit der Referenzsequenz

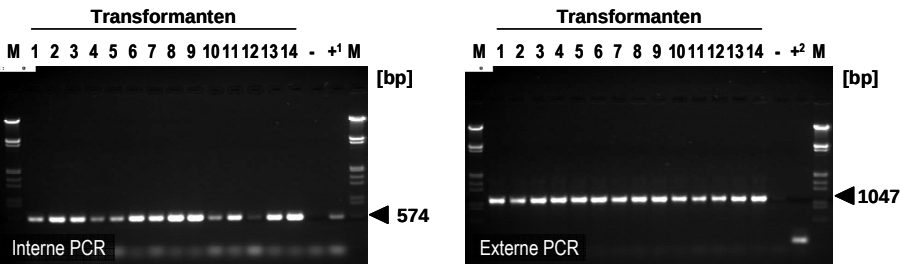
Sequenz- Ursprung	Sequenz der murenen Beta2-Toxine und der zugrundeliegenden DNA-Bereiche ¹⁾	
	C-terminaler Bereich	N-terminaler Bereich
<i>C. perfringens</i> CWC 245	Lys6luIleAsp....GlyTyrCysAla*** AAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCATAG	
pHIT-Vlc-		Lys6luIleAsp....GlyTyrCysAlaSerAlaTrpSerHisPro6lnPhe6luLys AAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCAAGCGCTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAA
	MetAlaSerTrpSerHisPro6lnPhe6luLys6luLys6luIleAsp....GlyTyrCysAla*** ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAAGGCGCCAAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCATGA	
		MetLys6luIleAsp....GlyTyrCysAlaSerAlaTrpSerHisPro6lnPhe6luLys*** ATGAAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCAAGCGCTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATAA
	AlaSerTrpSerHisPro6lnPhe6luLys6luLys6luIleAsp....GlyTyrCysAla*** GCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAAGGCGCCAAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCATGA	
		MetLys6luIleAsp....GlyTyrCysAlaSerAlaTrpSerHisPro6lnPhe6luLys*** ATGAAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCAAGCGCTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATAA
	MetAlaSerTrpSerHisPro6lnPhe6luLys6luLys6luIleAsp....GlyTyrCysAla*** ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAAGGCGCCAAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCATGA	
	MetAlaSerTrpSerHisPro6lnPhe6luLys6luLys6luIleAsp....GlyTyrCysAla*** ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAAGGCGCCAAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCATGA	
		Lys6luIleAsp....GlyTyrCysAla*** AAAGAAATCGAC....GGGTATTGTGCATAG

¹⁾ Fett gedruckte Sequenzbereiche entsprechen Abweichungen von der Referenzsequenz, *Strep*-Tag II-Sequenzen sind unterstrichen

4.2.1.2 Erzeugung von *B. subtilis* WB800N-(pHIT-Vlc-51)

Um Beta2-Toxin rekombinant in *B. subtilis* zu exprimieren, wurde das *cpb2*-Gen unter Verwendung des Shuttle-Vektors pHT01 in *B. subtilis* WB800N kloniert. Hierzu wurden *cpb2*-Amplifikate mit angefügten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI und AatII in einer PCR (Primer C39 und C41) gewonnen. Die Restriktionsprodukte von Amplifikat und pHT01 wurden ligiert. Das resultierende Plasmid pHIT-Vlc-51, und als Kontrolle auch pHT01, wurden erst auf *E. coli* TOP10F⁻ und nach Reisolierung auf *B. subtilis* WB800N übertragen. Mittels insert- und vektorspezifischen PCRs wurde pHIT-Vlc-51 in Transformanten nachgewiesen (Abbildung 19). Die Sequenzanalyse zeigte, dass, abgesehen von Position 319

(siehe 4.2.1.1), die Beta2-Toxin kodierenden Bereiche von pHIT-Vlc-51 und Referenzisolat *C. perfringens* CWC 245 vollständig übereinstimmten (Tabelle 17).



Slot	Auftrag	µl
M	Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker	1
1-14	Amplifikat Transformanten	10
-	Amplifikat H ₂ O	10
+ ¹	Amplifikat <i>cpb2</i>	10
+ ²	Amplifikat pHT01	10

Abbildung 19: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller WB800N-(pHIT-Vlc-51)-Klone aus der *cpb2*- (574 bp) bzw. vektorspezifischen (1047 bp) PCR

4.2.1.3 Erzeugung von *C. perfringens* 121/91(pHIT-Vlc-51)

Um eine Überexpression des Beta2-Toxins im Ursprungswirt *C. perfringens* zu ermöglichen, sollte das zur Transformation von *B. subtilis* WB800N genutzte Plasmide pHIT-Vlc-51 auf die *C. perfringens* Alphatoxindefektmutante 121/91 übertragen werden. Die Transformation gelang jedoch nicht, vermutlich aufgrund einer Inkompatibilität des *E. coli*-*B. subtilis*-Shuttle-Vektors mit dem Zielwirt.

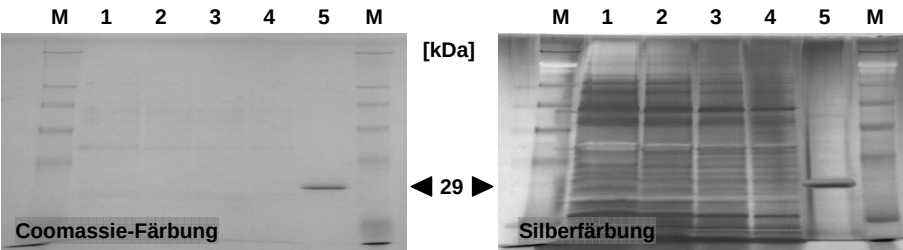
4.2.2 Nachweis von rekombinantem Beta2-Toxin in Expressionsprodukten der GVO

4.2.2.1 Nachweis der rekombinanten Beta2-Toxine in der SDS-PAGE

Um zu überprüfen ob TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46), -(pHIT-Vlc-47), Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) bzw. WB800N-(pHIT-Vlc-51) nach Induktion rekombinantes Beta2-Toxin exprimieren, wurden über *Strep*-Tactin-Superflow-Matrix-Säulen aufgereinigte Zellysate (*E. coli*-Expressionsklone) respektive konzentrierter Kulturüberstand (*B. subtilis* WB800N-(pHIT-Vlc-51)) in der SDS-PAGE überprüft (Übersicht Tabelle 19). In den aufgetrennten Eluaten aller

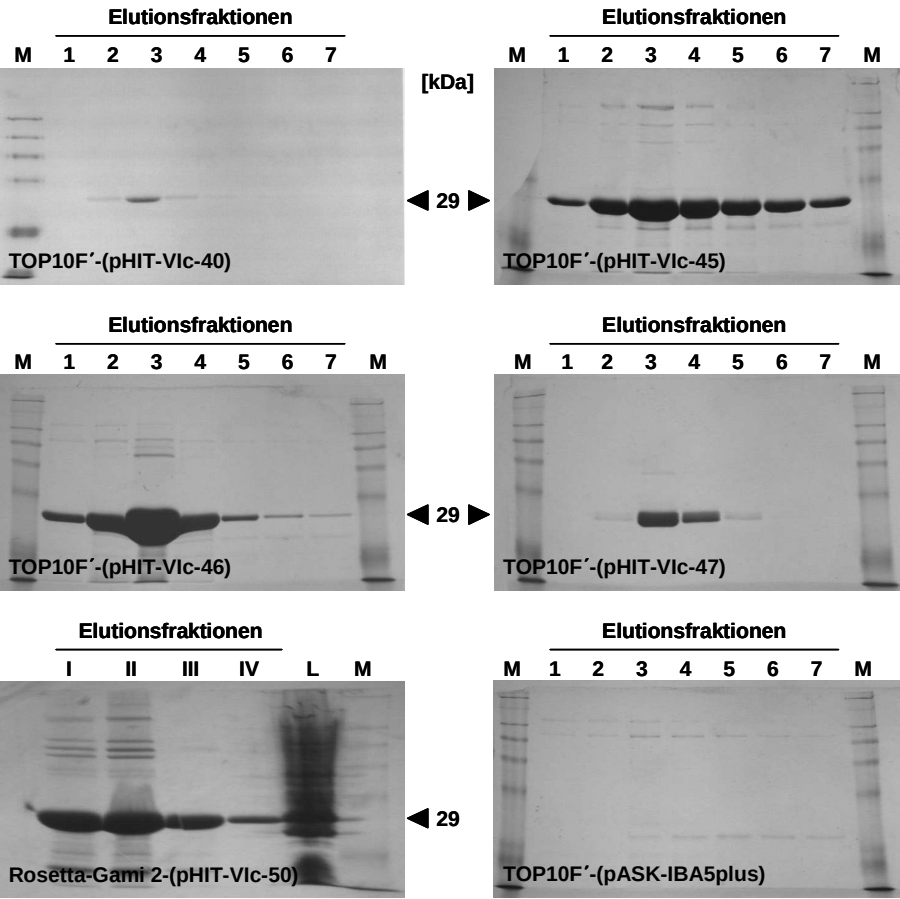
E. coli-rBeta2-Klone konnten Proteine mit dem für das rBeta2-Toxin berechneten Molekulargewicht von ca. 29 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 21). Am stärksten war die Bande der Elutionsfraktion 3 von TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-46), aber auch in den Aufreinigungsprodukten der anderen zytoplasmatisch exprimierenden Transformanten TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) konnte das Protein in hoher Konzentration dargestellt werden. Bei den periplasmatisch rBeta2-exprimierenden Transformanten TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) und TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-47) hingegen war es geringer konzentriert und vorwiegend in den Elutionsfraktionen 3 und 4 zu finden. Neben den rekombinanten Toxinen wurden in den Eluaten weitere Banden schwach angefärbt. Die Aufreinigungsprodukte des mit dem Leervektor transformierten Kontrollstammes TOP10F⁻-(pASK-IBA5plus) enthielt wie erwartet kein Beta2-Toxin.

In den SDS-PAGE-Gelen der konzentrierten Kulturüberständen von WB800N-(pHIT-Vlc-51) konnte das rekombinante Beta2-Toxin nach Coomassie- und Silberfärbung nicht identifiziert werden, da eine Vielzahl weiterer Proteinbanden das schwach konzentrierte Toxin überlagerten (Abbildung 20).



Slot	Auftrag	µl
M	SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard 10	
1	Konzentrat des Überstandes	15
2	Konzentrat des Überstandes 1:2 Laufpuffer	15
3	Konzentrat des Überstandes 1:4 Laufpuffer	15
4	Konzentrat des Überstandes 1:8 Laufpuffer	15
5	rBeta2 aus TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-40) (2 µg)	15

Abbildung 20: Coomassie- und Silber-Färbung des in der SDS-PAGE aufgetrennten, konzentrierten Kulturüberstandes von induziertem WB800N-(pHIT-Vlc-51)



Slot	Auftrag	µl
M	SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	10
1-7	Fraktion der Elution des rekombinanten Beta2	5
I-IV	Fraktion der Elution des rekombinanten Beta2	10
L	Zellysats des induzierten Expressionsklons	15

Abbildung 21: Darstellung des rBeta2-Toxins in den mittels SDS-PAGE aufgetrennten Aufreinigungsprodukten der induzierten *E. coli*-Transformanten mittels Coomassie-Färbung

4.2.2.2 Bestimmung der Ausbeute der rBeta2-Präparationen

Die rBeta2-Ausbeute der *E. coli*-Expressionsklone wurde mittels BCA-Assay ermittelt und lag zwischen 0,4 (TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-47)) und 11,25 (TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45)) mg/l Übernachtkultur. Die rBeta2-Konzentration in Kulturüberständen von WB800N-(pHIT-Vlc-51) konnte aufgrund des heterogenen Proteingehaltes und des geringen Anteils des rBeta2 am Gesamtprotein (Abbildung 20) nicht bestimmt werden und wurde anhand des Ergebnisses des Immunblots auf ca. 0,2 mg/l geschätzt (4.2.2.3)

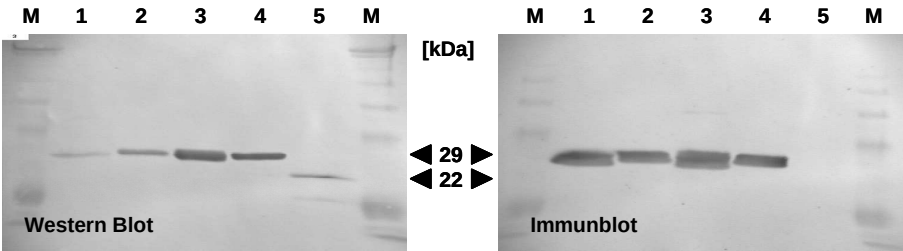
4.2.2.3 Nachweis von rBeta2 im Strep-Tag® II-Western Blot bzw. Immunblot

Um die in der SDS-PAGE angefärbten Banden als rekombinantes Beta2-Toxin zu identifizieren wurden im Western Blot das Affinitätsanhängsel bzw. im Immunblot rBeta2-spezifische Epitope detektiert (Übersicht Tabelle 19). Abbildung 22 zeigt den erfolgreichen Nachweis dieser Strukturen bei den 29 kDa-großen rekombinanten Beta2-Toxinen in Aufreinigungsprodukten von TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40), -(pHIT-Vlc-46), -(pHIT-Vlc-47) und -(pHIT-Vlc-45). Während die rBeta2-Toxine der zytoplasmatisch exprimierenden GVO TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45) und -(pHIT-Vlc-46) stringente Banden bildeten, wurden periplasmatisch exprimierte Toxine (TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) und -(pHIT-Vlc-47)) im Immunblot als Doppelbande detektiert.

Als Negativkontrolle wurde in beiden Blots aufgereinigtes Expressionsprodukt von TOP10F⁻-(pASK-IBA5plus), der kein Insert besitzt, eingesetzt. Bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde hier verstärkt ein zusätzliches 22 kDa-Protein, das in geringer Konzentration auch in Eluaten der Beta2-Experimenten darstellbar war, aufgereinigt. Dieses konnte im Western Blot, nicht jedoch im Immunblot detektiert werden.

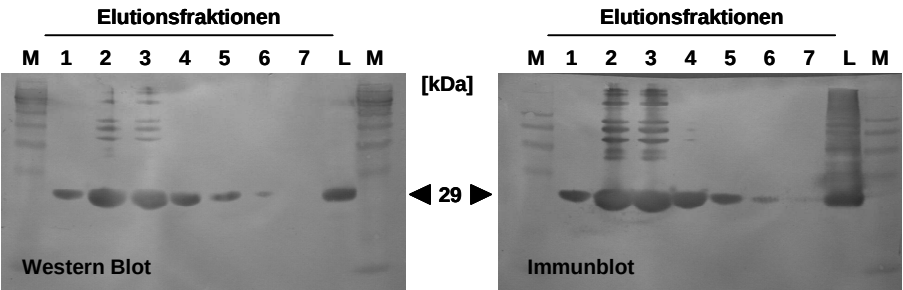
Abbildung 23 zeigt den Nachweis des rekombinanten Beta2-Toxins in den Elutionsfraktionen und im Ganzzelllysat induzierter Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50). Neben der 29 kDa-Bande des Toxins konnten auch acht schon mittels Coomassiefärbung darstellbare Banden (42-266 kDa) detektiert werden.

Das in der SDS-PAGE (Abbildung 20) aufgrund der geringen Konzentration nicht nachweisbare rekombinante Beta2-Toxin von WB800N-(pHIT-Vlc-51) konnte im Immunblot mit polyklonalem Anti-Beta2-Serum als Doppelbande in Höhe von 29 kDa detektiert werden (Abbildung 24).



Slot	Auftrag
M	See Blue Plus 2
1	5 µg rBeta2 aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-40)
2	5 µg rBeta2 aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-46)
3	5 µg rBeta2 aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-47)
4	5 µg rBeta2 aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-45)
5	Negativkontrolle Eluat 3

Abbildung 22: Darstellung des rBeta2-Toxins in den Aufreinigungsprodukten induzierter *E. coli*-Transformanten mittels *Strep*-Tag® II-Western und Immunblot



Slot	Auftrag	µl
M	SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	10
1-7	Fraktion der Elution des rekombinanten Beta2	5
L	Zellysat des induzierten Expressionsklons	15

Abbildung 23: Darstellung des rBeta2-Toxins in den Aufreinigungsprodukten induzierter Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) mittels *Strep*-Tag® II-Western und Immunblot

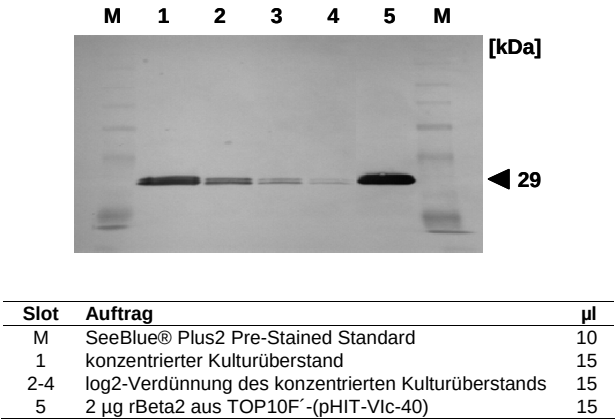


Abbildung 24: Darstellung des rBeta2-Toxins im konzentrierten Kulturüberstand des induzierten WB800N-(pHIT-Vlc-51) mittels Immunblot

4.2.2.4 Nachweis des rBeta2-Toxins im Fangantikörper-ELISA

Im ELISA wurden die rekombinanten Beta2-Toxine aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40), -(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46) und -(pHIT-Vlc-47) (Abbildung 25) bzw. aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) (Abbildung 26) durch den monoklonalen Fangantikörper 2-4A5 sowie polyklonales Anti-rBeta2-Kaninchenserum gebunden (Tabelle 19). Die optischen Dichten verhielten sich hierbei dosisproportional. Im direkten Vergleich zeigten die sequenzidentischen, zytoplasmatisch mit N-terminalem Tag exprimierten rekombinanten Beta2-Toxine aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45) und -(pHIT-Vlc-50) eine deutlich geringere Affinität zu 2-4A5 als die anderen Toxine. Die höheren Extinktionen in Abbildung 26 sind auf die Verwendung einer neuen Antikörpercharge zurückzuführen. Das rekombinante Toxin aus WB800N-(pHIT-Vlc-51) konnte aufgrund der geringen Konzentration nicht im ELISA detektiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

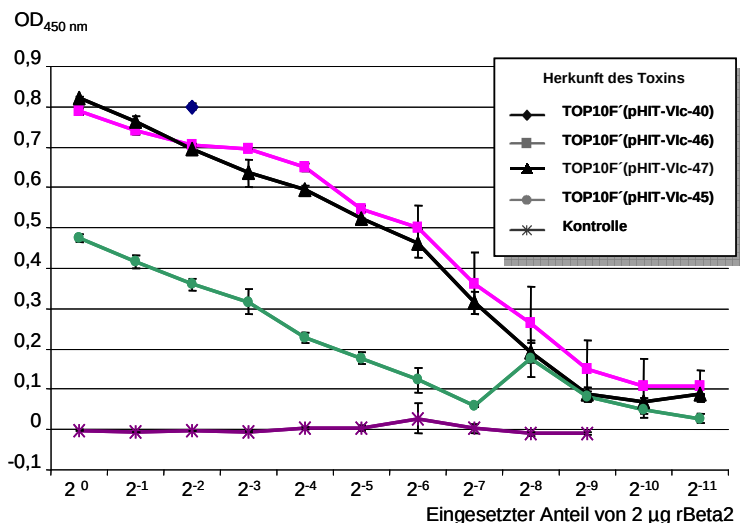


Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der Bindungsaffinitäten der rBeta2-Toxine aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40), -(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46) und -(pHIT-Vlc-47) im 2-4A5-Fangantikörper-ELISA

Erläuterungen: Mittelwerte aus Dreifachansatz mit Standardabweichung

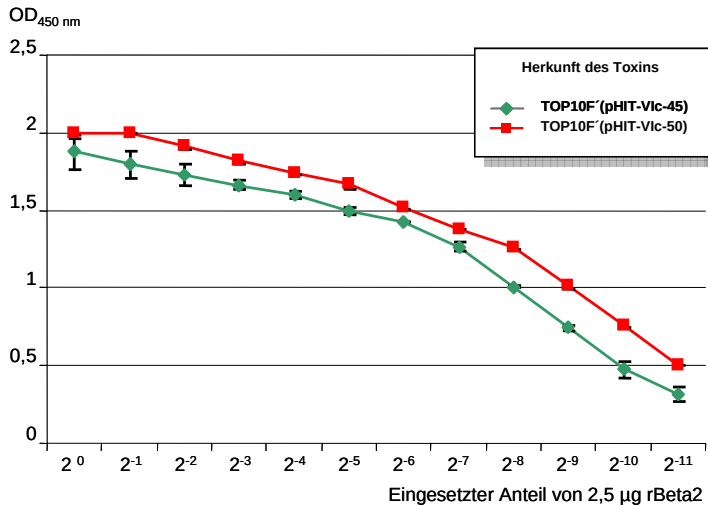


Abbildung 26: Vergleichende Darstellung der Bindungsaffinitäten der rBeta2-Toxine aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-45) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) im 2-4A5-Fangantikörper-ELISA

Erläuterungen: Mittelwerte aus Dreifachansatz mit Standardabweichung

4.2.3 Nachweis der biologischen Wirkung der rBeta2-Toxine

4.2.3.1 Nachweis der zytotoxischen Wirkung auf Caco-2- und IPEC-J2-Zellen

Fisher konnte die Toxizität von Beta2-Toxin für Caco-2-Zellen nachweisen. Allerdings war Konsensus-Toxin, welches sequentiell unseren Expressionsprodukten entspricht, deutlich weniger toxisch als die atypische, humane Variante [52]. Daher sollten die rekombinanten Toxine nicht nur auf ihre Wirkung gegenüber der humanen Zelllinie Caco-2 sondern auch gegenüber der porcinen Darmepithelzelllinie IPEC-J2 getestet werden.

In den eingesetzten Konzentrationen wurde weder die relative Zellaktivität von Caco-2-, noch die von IPEC-J2-Zellen beeinträchtigt (Abbildung 27 - Abbildung 32, Tabelle 19).

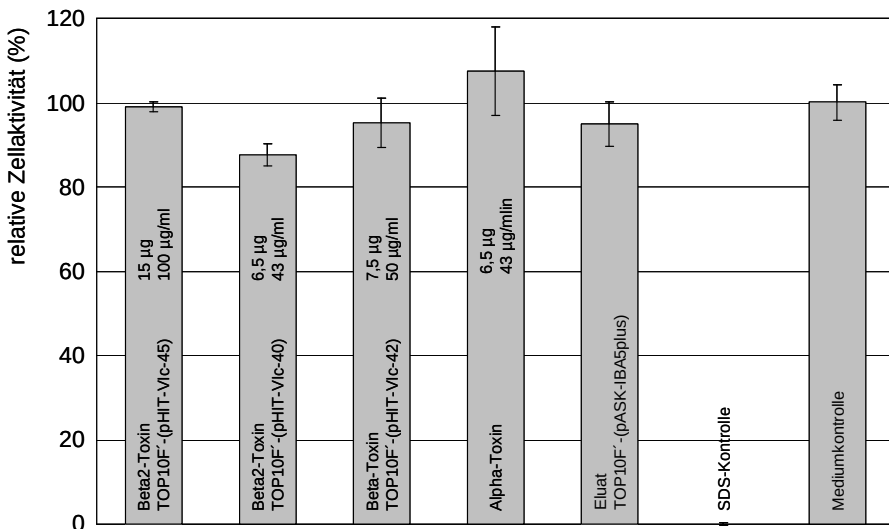


Abbildung 27: Relative Aktivität von Caco-2-Zellen nach Inkubation mit rBeta2-Toxin aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) und -(pHIT-Vlc-45) im MTT-Test

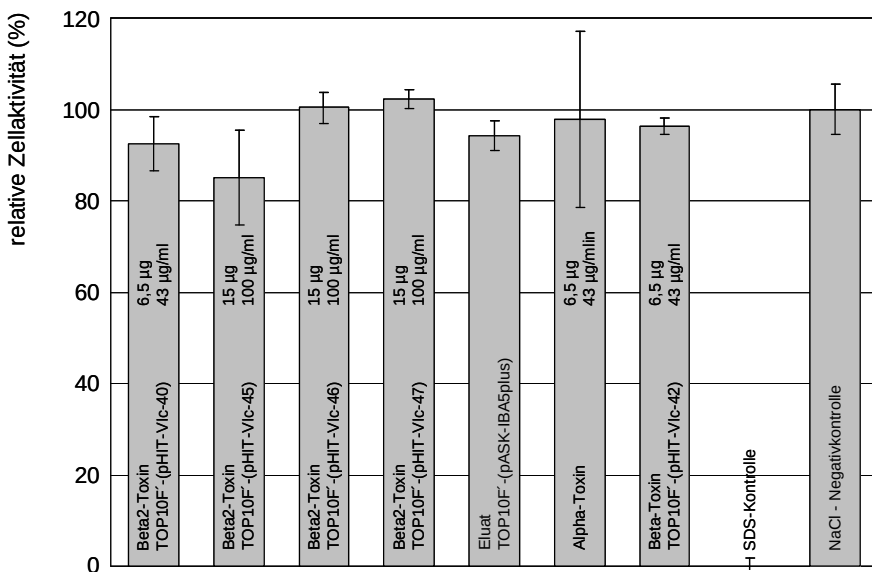


Abbildung 28: Relative Aktivität von IPEC-J2-Zellen nach Inkubation mit rBeta2-Toxin aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40), -(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46) und -(pHIT-Vlc-47) im MTT-Test

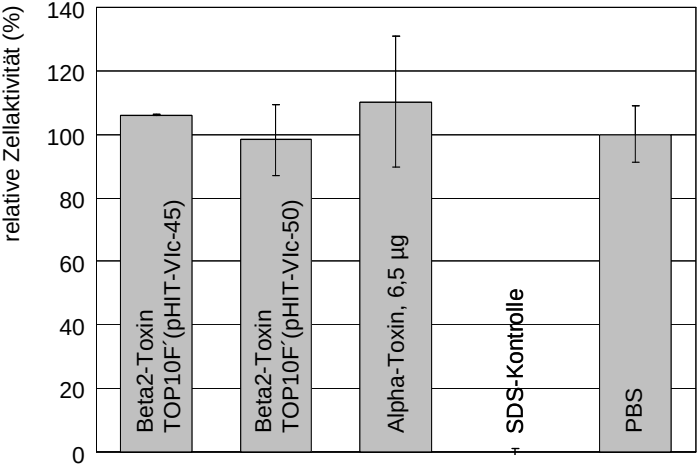


Abbildung 29: Relative Aktivität von Caco-2-Zellen nach Inkubation mit 50 µg rBeta2-Toxin aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-45) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) im MTT-Test

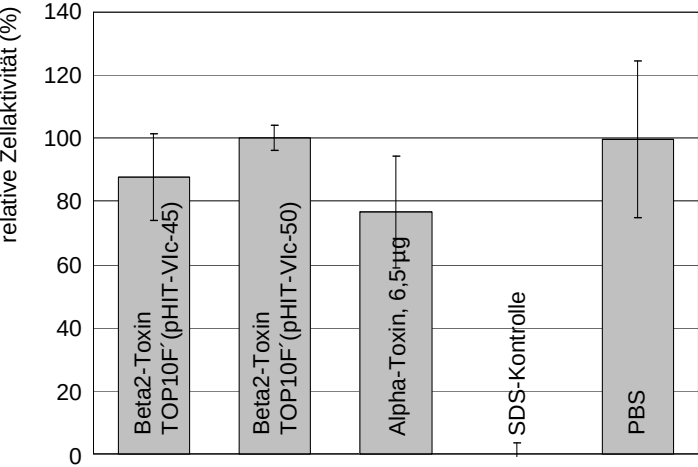


Abbildung 30: Relative Aktivität von IPEC-J2-Zellen nach Inkubation mit 50 µg rBeta2-Toxin aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-45) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) im MTT-Test

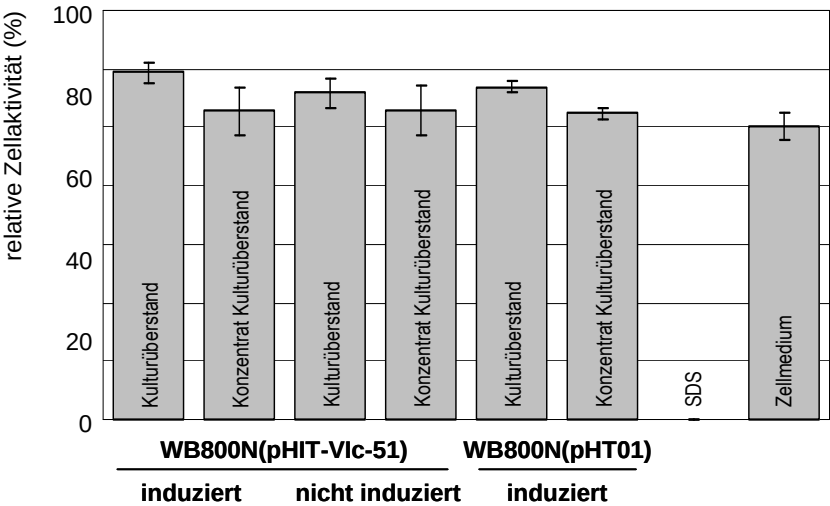


Abbildung 31: Relative Aktivität von Caco-2-Zellen nach Inkubation mit rBeta2-Toxin-haltigen Produkten von WB800N-(pHIT-Vlc-51) im MTT-Test

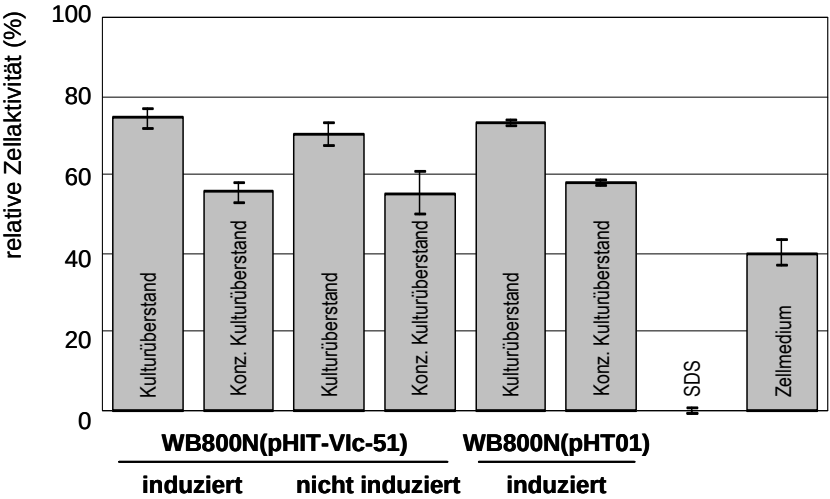


Abbildung 32: Relative Aktivität von IPEC-J2-Zellen nach Inkubation mit rBeta2-Toxin-haltigen Produkten von WB800N-(pHIT-Vlc-51) im MTT-Test

4.2.3.2 Nachweis der biologischen Wirkung im Mausmodell

Um zu überprüfen ob die rekombinanten Beta2-Toxine eine letale Wirkung für Mäuse aufweisen wurden Belastungsversuche mit den Expressionsprodukten aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40), -(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46), -(pHIT-Vlc-47) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) durchgeführt. Keines der Tiere zeigte im 72-stündigen Beobachtungszeitraum Symptome (Tabelle 18, Tabelle 19). Auch eine Präinkubation des rekombinanten Beta2-Toxins aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45) mit Glukose zur Beeinflussung der Proteinkonformation durch *Molecular Crowding* (2.4.7) führte nicht zu einem Toxizitätsgewinn.

Tabelle 18: Übersicht über die mit den rekombinanten Beta2-Toxinen durchgeführten Belastungsversuche

rBeta2-Toxin		Mortalität (Tote/Gesamtzahl)
Herkunft	verabreichte Menge (µg in 200 µl PBS)	
TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-45)	50	0/7
TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-46)	50	0/7
TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-47)	50	0/7
Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50)	1200	0/4
Negativkontrolle	-	0/3
TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-45)	50 ¹⁾	0/2
PBS	- ¹⁾	0/1

1) Präinkubation (über Nacht bei 4 °C) mit 5 % Glukose

4.2.3.3 Ergebnisse der Renaturierungsversuche

Eine Renaturierung des rekombinanten Beta2-Toxins aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) war durch Variation von pH-Wert und Salzkonzentration, reduzierende Substanzen und Sulfobetain nicht möglich. Keines der geprüften Renaturierungsprodukte (Tabelle 15), in denen mittels Fangantikörper-ELISA das rekombinante Beta2-Toxin detektiert wurde, erwies sich als toxisch für Mäuse.

Tabelle 19: Überblick über die gewonnenen rekombinanten Toxine, ihre Nachweisbarkeit und ihre Toxizität

Expressionsklon	Nachweisbarkeit				Toxizität					
	Expressionsprodukt			SDS-PAGE	ELISA	Western Blot	Immunoblot	Caco2-Zellen	IPEC-J2-Zellen	Maus [to/n]
	Toxin	Position des Strep-Tag® II	Expressions-kompartiment							
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-42)	Beta	N-Terminus	Zytoplasma	+	+	+	n. t.	n. t.	n. t.	LD ₅₀ i. p. 1,56 µg/Maus
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-40)	Beta2	C-Terminus	Periplasma	+	+	+	+	- ¹⁾	- ¹⁾	0/6 ³⁾
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-45)	Beta2	N-Terminus	Zytoplasma	+	+	+	+	- ¹⁾	- ¹⁾	0/7 ⁴⁾
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-46)	Beta2	C-Terminus	Zytoplasma	+	+	+	+	n. t.	- ¹⁾	0/7 ⁴⁾
<i>E. coli</i> TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-47)	Beta2	N-Terminus	Periplasma	+	+	+	+	n. t.	- ¹⁾	0/7 ⁴⁾
<i>E. coli</i> Rosetta-Gami2-(pHIT-Vlc-50)	Beta2	N-Terminus	Zytoplasma	+	+	+	+	- ¹⁾	- ¹⁾	0/4 ⁵⁾
<i>B. subtilis</i> WB800N-(pHIT-Vlc-51)	Beta2	-	Kulturüberstand	-	-	n. t.	+	- ²⁾	- ²⁾	n. t.

1) ~100 µg rBeta2/ml 2) ~3-30 µg rBeta2/ml 3) ~30 µg rBeta2/100 µl PBS i.v. 4) ~50 µg rBeta2/200 µl PBS i.p. 5) ~1200 µg rBeta2/200 µl PBS i.p.
n. t. = nicht getestet

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung der *C. perfringens*-Toxine Beta und Beta2 in biologisch aktiver, reiner Form. Beide sind bedeutende Virulenzfaktoren für *C. perfringens*-bedingte Durchfallerkrankungen von Saugferkeln und werden benötigt, um die Wirksamkeit neuer Impfstoffe, die Beta- und Beta2-Toxoide enthalten, überprüfen zu können. Die Sera geimpfter Tiere müssen in der Lage sein, die Wirkung beider Toxine in geeigneten Nachweissystemen zu neutralisieren.

Um Beta und Beta2-Toxin effizient und hochrein gewinnen zu können wurde entschieden, sie rekombinant und heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Der natürliche Wirt *C. perfringens* ist zur Reingewinnung ungeeignet. Er bildet toxovarabhängig die vier Majortoxine Alpha, Beta, Epsilon und Iota und bis zu 13 Minortoxine [2, 56, 57], die bereits in Spuren Aktivitätsassays zum Nachweis einer Beta- bzw. Beta2-Toxizität beeinflussen können. Die Gewinnung beider Toxine aus Kulturüberständen von *C. perfringens* wurde zwar beschrieben [31, 54, 55], auf eine detaillierte Analyse des Toxinsspektrums der genutzten Stämme wurde jedoch verzichtet. Die gewonnen Toxinpräparationen waren somit vermutlich durch weitere Toxine verunreinigt.

Neben der hochreinen Gewinnung erlauben *E. coli*-Expressionssysteme die Steigerung von Ausbeute und Konzentration der Toxine, die von *C. perfringens* meist nur in geringen Mengen in den Kulturüberstand sezerniert werden, wo sie gering konzentriert vorliegen.

Die Strategie für die Beta-Toxin-Gewinnung in hoher Reinheit und Konzentration sah die rekombinante Überexpression ins Periplasma von *E. coli* TOP10F⁺ mit Hilfe des Vektors pASK-IBA5plus vor. Die Sequenz des rekombinanten Beta-Toxins wurde durch das Anhängen eines Strep-Tag® II geändert, welches die Aufreinigung und Konzentrierung des Expressionsproduktes ermöglichte. Die 13 Aminosäuren des Strep-Tag® II besitzen geringe Reaktivität und beeinträchtigen die biologische Aktivität von Fusionspartnern kaum [261-263], sodass sie nicht in einem zusätzlichen, eventuell inaktivierenden Schritt nach der Aufreinigung proteolytisch abgespalten werden müssen.

Aufgrund seines hydrophilen Charakters wurde das Strep-Tag® II am N-Terminus des Beta-Toxins angefügt. Die Fusion mit dem hydrophoben C-Terminus, der vermutlich eine membranüberspannende Funktion besitzt [27], hätte wahrscheinlich zur Inaktivität des Toxins geführt. Allerdings lassen Sequenzhomologien zum Alpha-Toxin von *Staphylococcus aureus* vermuten, dass auch der N-Terminus, der bei der Porenbildung in einer Kappenregion im Außenbereich der Zelle positioniert ist, Bedeutung für die Ausbildung der heptameren Quartärstruktur und die biologische Aktivität hat [46, 264].

Unter Nutzung des Vektors pASK-IBA5plus wurde Plasmid pHIT-Vlc-42 generiert und zur zytoplasmatischen Expression eines N-terminal mit einem Strep-Tag® II versehenen Proteins auf TOP10F⁺ übertragen. Aus Ganzzelllysaten induzierter Klone aufgereinigtes Beta-Toxin ließ

sich erfolgreich in der SDS-PAGE als 36 kDa-Bande nachweisen, allerdings wurde zusätzlich ein weiteres Protein von ca. 60 kDa detektiert. Bei diesem handelte es sich vermutlich um das Chaperon-Protein GroEL (2.4.1.1), ein Hitzeschockprotein aus der Hsp60-Familie, das *E. coli* bei Expressionsstress überexprimiert. Das Chaperon setzt sich unter anderem aus 14 identischen GroEL-Molekülen zusammen. Es bindet denaturierte Proteine, die anhand ihrer exponierten hydrophoben Bereiche erkannt und in einer Kavität gefaltet werden. Möglicherweise ist die Renaturierung des rekombinanten Beta-Toxins aufgrund der für *E. coli* atypischen Struktur erschwert und hierdurch die Freisetzung aus dem Chaperon behindert [265]. Der Freisetzungsprozess ist zudem energieabhängig [266] und kommt daher nach dem Zellaufschluss zur Produktfreisetzung zum Erliegen. Somit wird das Chaperon, falls es durch seine Bindung das Affinitätsanhängsel nicht blockiert, mit dem rekombinanten Produkt aufgereinigt. Durch die denaturierenden Verhältnisse der SDS-PAGE werden die GroEL-Untereinheiten vereinzelt und als 57 kDa Bande detektiert.

In der Western Blot-Analyse wurde die 36 kDa-Bande aus der SDS-PAGE durch *Strep*-Tactin-HRP-Konjugat gebunden und somit das *Strep*-Tag® II des Expressionsproduktes nachgewiesen. Außerdem wurde eine schwache Bande bei 22 kDa dargestellt, bei der es sich um das Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP) handelt, das einzige natürlich biotinylierte Protein in *E. coli*. Es ist eine Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und katalysiert die Synthese von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA im Rahmen der Fettsäuresynthese [267]. Aufgrund seiner Affinität zu *Strep*-Tactin wird es ebenfalls aufgereinigt [268].

Mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs, der den Nachweis von Wildtypotoxinen erlaubt, ließ sich das rekombinante Expressionsprodukt als Beta-Toxin identifizieren. Die durch Bindung der mono- und polyklonalen Antikörper des Kits nachgewiesenen spezifischen Epitope waren zudem Hinweis auf eine der nativen Konformation ähnelnde Faltung des rekombinanten Beta-Toxins.

Zur Überprüfung der toxischen Wirkung wurden PBS-verdünnte Eluate BALB/c-Mäusen intraperitoneal verabreicht. Das rekombinante Beta-Toxin aus TOP10F⁻-(pHIT-VIc-42) (Beta_{Hcy}) besaß eine LD₅₀ von 78 µg/kg bzw. 1,56 µg/Maus. Somit wurde erstmalig ein mit einem Affinitätsanhängsel fusioniertes Beta-Toxin gewonnen, das biologische Aktivität besaß. Beta_{Hcy} steht für Neutralisationsversuche im Rahmen der Impfstoffzulassung zur Verfügung.

Eine toxische Wirkung der Verunreinigungen GroEL und BCCP ist aufgrund der geringen Konzentration und der bekannten biologischen Aktivitäten der beiden Proteine unwahrscheinlich. Allerdings kann eine Abschwächung des toxischen Effekts von Beta_{Hcy}, vor allem durch die GroEL-Verunreinigungen, nicht ausgeschlossen werden. Da GroEL vermutlich toxinassoziiert vorlag, ist eine sterische Hinderung der Aktivität vorstellbar, zumal ein aus *C. perfringens*-Kulturüberständen aufgereinigtes Beta-Toxin fraglicher Reinheit in Untersuchungen von Sakurai und Fujii bereits bei geringerer Dosierung letal für Mäuse war (LD₅₀ = 4,5 µg/kg bzw. ca. 0,09 µg/Maus) [34].

Möglich ist aber auch, dass das 13 Aminosäuren umfassende *Strep*-Tag® II am N-Terminus die Verringerung der Aktivität bedingte. Ein in *E. coli* überexprimiertes rekombinantes Beta-Toxin von Steinthorsdottir et al. blieb auch nach Abspaltung seines Affinitätsanhängsels mit Faktor Xa inaktiv [71]. Da lediglich drei Aminosäuren aus der Schnittstelle am Toxin verblieben (Glycin, Isoleucin und Prolin) scheint dem N-Terminus eine entscheidende Bedeutung für die Aktivität zuzukommen. Das in *E. coli* exprimierte rekombinante Beta-Toxin von Nagahama et al. (Beta_{Nag}) besaß nach Abspaltung eines N-terminalen GST-Tags mit Thrombin nur 2 zusätzliche Aminosäuren (Glycin und Serin) aus der Schnittstelle und erzielte bei intravenöser Applikation eine dem Wildtypotoxin entsprechende Letalität [72].

Im Gegensatz dazu besaß ein von Shatursky et al. gewonnenes Beta-Toxin (Beta_{Shat}) eine deutlich geringere Aktivität, obwohl es in einem ähnlichen Expressionssystem die gleichen Sequenzmodifikationen wie Beta_{Nag} erfuhr. Seine letale Wirkung war nach intraperitonealer Applikation um 80 % reduziert (LD₅₀ von 25 µg/kg respektive ca. 0,5 µg/Maus [29]). Dies könnte auf unterschiedliche Sequenzen beider Toxine zurückzuführen sein. Die zur Klonierung von Beta_{Shat} verwendete Sequenz aus einem *C. perfringens* Typ C-Ferkel-Isolat wurde nicht veröffentlicht.

Weiterhin ist vorstellbar, dass unterschiedliche Präparationsmethoden die Aktivität der Toxine beeinflussten. Nagahama nutzte Ultraschall zum Aufschluss der Expressionswirte, Shatursky die *French press* (2.4.6). Auch die Konservierung von Beta_{Shat} in einer 10 %igen Lösung des dreiwertigen Alkohols Glycerin könnte die biologische Aktivität beeinflusst haben (2.4.7). Außerdem entfernte Nagahama das Thrombin durch Anionenaustauschchromatographie, wohingegen Shatursky versuchte es durch Phenylmethylsulfonylfluorid zu inhibieren. Der Proteaseinhibitor besitzt jedoch nur eine kurze Halbwertszeit (35 min bei pH 8 und Raumtemperatur) [269] und die Inhibition ist durch reduzierte Thiole, wie das im Elutionspuffer enthaltene GSH, umkehrbar [270]. Somit ist ein unspezifischer Verdau von Beta_{Shat} nach unzureichender Thrombininhibition vorstellbar.

Auch für Beta_{Hey} kann ein Einfluss der Expressionsbedingungen auf die Aktivität nicht ausgeschlossen werden. Der Zellaufschluss mittels *French press* (2.4.6) und die *Strep*-Tag® II-Affinitätschromatographie gelten als schonende Verfahren. Eventuell wäre durch eine Reduktion des Eintrages von Luftsauerstoff ein Aktivitätsgewinn möglich. Hiergegen spricht, dass kein Aktivitätsverlust durch Oxidation mit Luftsauerstoff im Rahmen der Gewinnung von Beta_{Nag} und Beta_{Shat} beobachtet wurde.

Nach der erfolgreichen Gewinnung des rekombinanten Beta-Toxins sollte auch das Beta2-Toxin in *E. coli* überexprimiert werden.

Die Expression von biologisch aktivem Beta2-Toxin gelang bislang ausschließlich in *C. perfringens*. Jolivet et al. nutzten das natürliche Typ C-Isolat CWC245 [31], welches verhältnismäßig viel Beta2-Toxin exprimiert [9]. Alpha-Toxin und weitere Proteine wurden durch hydrophobe Interaktion mit Glasperlen aus dem Überstand entfernt. Ein hoher

Aufreinigungsgrad ist bei diesem Verfahren jedoch nicht zu erwarten und die beobachteten toxischen Effekte könnten beispielsweise auch auf Beta-Toxin-Verunreinigungen zurückzuführen sein.

Der Isolierung aus einem Wildtypstamm stehen insgesamt acht *C. perfringens*-Klone gegenüber, die von fünf Arbeitsgruppen zur Überexpression des Beta2-Toxins erzeugt wurden (Tabelle 1). Drei Arbeitsgruppen wiesen für ihre Produkte Toxizität nach, die allerdings zumindest zum Teil auch durch Einflüsse coexprimierter Clostridien-Toxine bedingt sein könnte: Gibert *et al.* nutzten eine Typ A-Alpha-Toxin-Defektmutante zur Expression des Beta2-Toxins. Der toxinhaltige Kulturüberstand wurde nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse über DEAE-Sephadex-CL6B-Säulen aufgetrennt [10]. Die Beta2-Toxin- und eine Beta-Toxin-Präparation waren in dieser Studie toxisch für I407-Zellen. Allerdings widerlegten spätere Untersuchungen eine Toxizität des Beta-Toxins für diese Zelllinie [29, 30]. Daher muss auch der beobachtete zytotoxische Effekt des analog gewonnenen Beta2-Toxins in Frage gestellt werden.

Vilei *et al.* nutzten den gleichen *C. perfringens* Expressionsstamm wie Gibert *et al.*, verzichteten bei der Aufreinigung des Toxins jedoch auf eine Anionenaustauschchromatographie [47]. Die Ergebnisse der mit Mäusen durchgeführten Belastungsversuche wurden somit wahrscheinlich durch Protein- und Toxin-Verunreinigungen beeinflusst.

Fisher *et al.* verwendeten zur Überexpression von Beta2-Toxin einen *C. perfringens* Typ A-Stamm, der auch Alpha-Toxin exprimiert [52]. Die Aufreinigungsprozedur entsprach der von Gibert. Die Reinheit Beta2-Toxin-haltiger Fraktionen wurde lediglich durch eine wenig sensitive Coomassiefärbung von SDS-PAGE-Gelen überprüft. Eine Beeinflussung der an Caco-2-Zellen durchgeführten Aktivitätsstudien durch geringkonzentrierte clostridiale Toxine kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Die heterologe Expression von biologisch aktivem, rekombinantem Beta2-Toxin in *E. coli* wurde bislang nicht beschrieben. Da durch Verwendung des *Strep-Tag*® II-Systems jedoch erstmalig ein aktives Beta-Toxin als Fusionsprotein hergestellt werden konnte, wurde die analoge Gewinnung eines Beta2-Toxins angestrebt. Zur Überprüfung seiner Aktivität sollten neben Mäusen auch Caco-2-Zellen, Beta2-Toxin-empfindliche Kolonkarzinom-Epithelzellen [50, 52], eingesetzt werden. Für diese humane Zelllinie war atypisches Beta2-Toxin, welches beim Menschen als Virulenzfaktor diskutiert wird, toxischer als das sequenziell nur zu ~70 % identische Konsensus-Beta2-Toxin [19, 50]. Letzteres wird überwiegend von Schweineisolaten gebildet und sollte daher zusätzlich an der Schweinedarm-Epithelzelllinie IPEC-J2 [271] überprüft werden.

Ein Expressionsklon, TOP10F⁺-(pHIT-Vlc-40) basierend auf pASK-IBA2, stand schon zu Beginn der Arbeiten zur Verfügung. Sein C-terminal mit einem *Strep-Tag*® II versehenes Beta2-Toxin induzierte in Impfungen die Bildung von Antikörpern, die das Wildtypotoxin in *C. perfringens* Kulturüberständen detektierten und war außerdem immunreaktiv gegenüber Seren, die nach

Immunisierung mit Beta2-haltiger Toxoidvakzine gewonnen wurden [23]. Es zeigte jedoch weder in der Zellkultur noch im Mausmodell eine biologische Wirkung.

Eine Aktivierung denaturierter Proteine kann in manchen Fällen durch Erzeugung eines idealen, proteinspezifischen Milieus erreicht werden [108]. Deshalb wurde versucht, das rekombinante, möglicherweise denaturierte Beta2-Toxin in 50 unterschiedlichen Renaturierungslösungen umzufalten. Die Lösungen enthielten MES, HEPES oder TRIS zur Stabilisierung der pH-Werte 6,5, 7,5 bzw. 8,5. Das pH-Optimum des Beta2-Toxins ist nicht bekannt und auch seine pH-Empfindlichkeit wurde noch nicht untersucht. Der Wirkort "Darm" spricht für ein neutrales oder leicht alkalisches pH-Optimum [272]. Die besondere Empfindlichkeit von Saugferkeln könnte aber auch ein niedrigeres pH-Optimum andeuten, da der Milchverzehr eine Azidifizierung bewirken kann [273]. Die von anderen Arbeitsgruppen aus *C. perfringens* gewonnen, biologisch aktiven Beta2-Toxine wurden in pH-neutrales Wachstumsmedium exprimiert [10, 31, 47, 52]. Allerdings kann die starke Vermehrung der Clostridien zur Anreicherung saurer Endprodukte der anaeroben Fermentation, Essig-, Butter- und Milchsäure, führen und ein Absinken des pH-Wertes auf knapp über 5 bewirken [274]. Ein saures pH-Optimum ist daher für das Beta2-Toxin nicht unwahrscheinlich.

Neben den Puffersubstanzen enthielten die Renaturierungslösungen Kochsalz in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, DTT, GSH und 3-(1-Pyridinio)-Propansulfonat (PPS). DTT und GSH wirken reduzierend und lösen Disulfidbrücken, deren eventuelle Bedeutung für die Faltung von Proteinen später noch eingehend besprochen werden soll. PPS gehört zu den *Non-detergent sulfobetaines*, einer Stoffgruppe, die zur Erhöhung der Stabilität und Löslichkeit von Proteinen entwickelt wurde und für die in einer Reihe von Untersuchungen renaturierende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten [275].

Die Renaturierungsansätze wurden im Beta2-spezifischen ELISA überprüft. Da dieser auch das Wildtypotoxin detektiert, sollten positiv reagierende Ansätze ein Beta2 mit Wildtyp-ähnlicher Konformation enthalten. Nur solche Ansätze wurden Mäusen verabreicht, sie lösten aber bei keinem der Tiere Symptome aus. Da Fisher an inaktiviertem Beta2-Toxin nachwies, dass eine Reaktivierung mit reduzierenden Agenzien nicht möglich ist [50], wurden keine weiteren Renaturierungsversuche durchgeführt.

Als mögliche Ursache für die fehlende letale Wirkung des rekombinanten Beta2-Toxins aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-40) wurde ein störender Einfluss des C-terminal lokalisierten Affinitätsanhangsels (10 zusätzliche Aminosäuren) vermutet. Proteinspezifisch kann das *Strep*-Tag II Sekundär-, Tertiär- bzw. Quartärstruktur und resultierend die Aktivität eines Proteins beeinträchtigen [173]. Welchen Einfluss es eventuell auf die Aktivität des Beta2-Toxins hat, ist jedoch schwer zu beurteilen, zumal über dessen Struktur und die Bedeutung seiner C- und N-terminalen Bereiche bislang wenig bekannt ist.

Für die Identifikation funktioneller Gruppen wären Kenntnisse zur nativen Konformation des Beta2-Toxins hilfreich. Hierzu wurden Kristallisationsstudien von Gurjar *et al.* durchgeführt. Die

ermittelten Strukturen besaßen keine Homologa in der Proteindatenbank. Untersuchungen zur dynamischen Lichtstreuung, die eine Untersuchung des hydrodynamischen Radius erlauben, zeigten, dass die gewonnenen Proteine als Dimere vorlagen [73]. Allerdings ist fraglich, ob Beta2-Toxin in nativer Konformation untersucht wurde. Wahrscheinlich wurde das empfindliche Protein durch die Expression in *E. coli*, die Nutzung eines großen Affinitätsanhängsels (GST-Tag, 211 Aminosäuren), sowie dessen Abspaltung und Entfernung aus der Lösung denaturiert. Die Untersuchung des Hydropathieprofils identifizierte lediglich im Signalpeptid einen aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften voraussichtlich die Membran überspannenden Bereich. Da das Signalpeptid beim Übertritt des Toxins in den Kulturüberstand allerdings abgespalten wird, steht es im reifen Protein nicht für eine Interaktion mit der Zielzellmembran zur Verfügung [10]. Es gibt somit keine gesicherten Erkenntnisse, welche Regionen des Beta2-Toxins die Insertion oder Interaktion im Rahmen der von Fisher nachgewiesenen Porenbildung [50] ermöglichen. Daher wurden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen rekombinante Beta2-Toxine teils mit C-(n=8), teils mit N-terminal (n=10) positionierten Affinitätsanhängseln erzeugt (Tabelle 1). Nachdem das C-terminal *getagte* Beta2-Toxin aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) keine Aktivität zeigte wurde durch Verwendung des pASK-IBA4-Vektors das *Strep*-Tag® II (12 Aminosäuren) am N-Terminus des Produktes angefügt. In *E. coli* TOP10F⁻ gelang mit dem resultierenden Vektor pHIT-Vlc-47 die Expression eines rekombinanten Beta2-Toxins. Dieses war jedoch weder letal für Mäuse noch toxisch für Caco-2- und IPEC-J2-Zellen. Eine mögliche Ursache hierfür wurde in einer vom Wildtypotoxin abweichenden Ausbildung von Disulfidbrücken gesehen. Zwei konservierte Cysteine an den Positionen 154 und 264 legen nahe, dass natives Beta2-Toxin eine intramolekulare Disulfidbrücke besitzt. Da für seine Quartärstruktur ein porenbildendes Oligomer diskutiert wird [50] ist zudem vorstellbar, dass, wie beispielsweise beim pentameren, thiolaktivierten Toxin Ivanolysin O [276, 277], Disulfidbrücken intermolekular zwischen mehreren Proteinmolekülen gebildet werden. Mit den pASK-IBA-Vektoren 2 und 4 waren daher gezielt zwei Vektoren zur Erzeugung von TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) und -(pHIT-Vlc-47) gewählt worden, die durch OmpA-Signalpeptide ihre Expressionsprodukte ins Periplasma der Wirtszelle schleusen. Die hier vorherrschenden oxidierenden Bedingungen begünstigten eine Brückenbildung zwischen den Cysteinresten. Allerdings könnte die in mehreren Studien belegte Sauerstoffempfindlichkeit des nativen Beta2-Toxins [31, 47, 50] darauf hindeuten, dass die Cysteinreste zur Entfaltung der biologischen Aktivität frei und lösungsmittel exponiert vorliegen müssen. Eine Inaktivierung durch Sauerstoff ist häufig auf eine Oxidation freier Cysteine zu Disulfid-Brücken, Sulfon- oder Sulfonsäuren zurückzuführen (2.4.8). Beim Beta2-Toxin konnte die Aktivität auch durch reduzierende Substanzen, wie DTT, L-Cystein und BME, nicht erhalten werden [50], sodass die Sauerstoffempfindlichkeit vermutlich eher auf einem ungeklärten, cysteinunabhängigen Mechanismus beruht.

Trotzdem wurden, um der fraglichen Bedeutung der Disulfidbrücken Rechnung zu tragen, mit den pASK-IBA-Vektoren 3plus und 5plus zwei weitere *E. coli*-Klone erzeugt. TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45) und -(pHIT-Vlc-46) exprimierten ihr C- bzw. N-terminal mit einem *Strep-Tag*® II versehenes Beta2 ins reduzierende, freie Cysteine begünstigende Zytoplasma. Die gebildeten Toxine entsprachen sequenziell, abgesehen von einem zusätzlichen N-terminalen Methionin, ihren periplasmatisch exprimierten Äquivalenten (Tabelle 17). Mit den neuen Klonen konnte die Toxinausbeute deutlich erhöht werden. Beide Beta2-Varianten waren jedoch im Zellkultur- wie im Tierversuch inaktiv.

Mit einem weiteren Klonierungsversuch sollte die Disulfidbrückenbildung im rekombinanten Produkt erneut unterstützt werden. Die Beta2-Toxine der Expressionsklone TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-40) und -(pHIT-Vlc-47) werden, bevor sie durch die OmpA-Sequenz ins Periplasma gelangen, zunächst im Zytoplasma gebildet. Eigene Versuche, wie auch Untersuchungen von Fisher [50], deuten darauf hin, dass die Denaturierung von Beta2-Toxin irreversibel ist. Somit wäre für ein im Zytoplasma denaturiertes Expressionsprodukt im Periplasma kein Aktivitätsgewinn zu erwarten. Deshalb wurde *E. coli* Rosetta-gami 2 als Expressionswirt ausgewählt. Im Gegensatz zu TOP10F⁻ ist er defizient für die Enzyme GSH-Reduktase (*gor*) und Thioredoxin-Reduktase (*trxB*), die maßgeblich für die reduzierenden Bedingungen im Zytoplasma sind. Er eignet sich hierdurch zur zytoplasmatischen Expression von Proteinen mit Disulfidbrücken. Das Zytoplasma bietet gegenüber dem Periplasma zudem ein anderes, reichhaltigeres Spektrum an Chaperonen mit möglichem positivem Einfluss auf die Beta2-Toxin Konformation (2.4.1.1). Außerdem verhält sich der pH-Wert relativ stabil, wohingegen der periplasmatische pH dem im Laufe der Kultivierungszeit abfallenden Medium-pH entspricht (s. o., 2.4.9).

Die Plasmide pHIT-Vlc-45 und pHIT-Vlc-46 waren nicht zur Transformation von Rosetta-Gami 2 geeignet. Dieser benötigt als Mediumzusatz Tetrazyklin, welches den tet-Promoter der Plasmide dauerhaft aktivieren und eine gezielte Induktion unmöglich machen würde. Deshalb wurden mit den Vektoren pPR-IBA-1 und -2 die Plasmide pHIT-Vlc-48 bzw. -49 konstruiert, die eine T7-Promoter-regulierte Expression des Beta2-Toxins mit N- bzw. C-terminal lokalisiertem *Strep-Tag* 2 ermöglichen sollten. Die resultierenden Plasmide wurden zur Vermehrung zunächst auf den leichter transformierbaren TOP10F⁻ übertragen. Die Beta2-Toxin-kodierenden Bereiche wurden sequenziert und entsprachen exakt denen der Plasmide pHIT-Vlc-45 und -46 (Tabelle 17). Allerdings gelang lediglich mit dem reisolierten Plasmid pHIT-Vlc-48, dass das C-terminal mit *Strep-Tag* 2 versehene Beta2-Toxin kodierte, die Transformation von Rosetta-Gami 2. In mehreren Versuchen konnten unter Nutzung von verschiedenen pHIT-Vlc-49-Präparationen keine Transformanten gewonnen werden, obwohl Plasmidlösung und kompetente Zellen in guter Qualität vorlagen. Reinheit und Konzentration der pHIT-Vlc-49-Lösungen wurden photometrisch überprüft. Ihre Eignung für die Transformation konnte zudem durch die erneute Übertragung auf TOP10F⁻ belegt werden. Die kompetenten Rosetta-Gami 2-

Zellen waren hocheffizient mit den als Kontrolle mitgeführten pHIT-Vlc-48-Plasmiden transformierbar.

Es konnten also, trotz einer vermutlich effektiven Übertragung der Plasmide, keine Transformanten gewonnen werden. Somit war naheliegend, dass ein biologisch aktives Beta2-Expressionsprodukt unmittelbar nach Transformation zum Absterben des Expressionswirtes Rosetta-Gami 2 führte. Eine eventuelle Toxizität des Beta2-Toxins für *E. coli* wurde bislang nicht untersucht und konnte im Rahmen der durchgeführten Arbeiten in Ermangelung eines aktiven Beta2-Toxins nicht geprüft werden. Rosetta-Gami 2 ist aufgrund seiner Enzymdefizienzen (*gor* / *trxB*) und durch die Prozedur zur Kompetenzentwicklung sicherlich hochempfindlich gegenüber toxischen Einwirkungen. Der T7-Promotor des pPR-IBA-Vektors besitzt zudem auch in Abwesenheit von Induktor IPTG eine verhältnismäßig hohe Basalexpression [278]. Er wird indirekt induziert, indem lac-Repressor-Proteine im Zytoplasma inaktiviert werden, die die Transkription des T7-RNA-Polymerase-Gens eines λ DE3-Plasmides des *E. coli*-Wirtes verhindern. Die Polymerase führt nach Anbindung an den T7-Promoter zur Transkription des Zielgens. Aufgrund der hohen Basalexpression nutzen einige Systeme, z. B. das pET-System, eine weitere lac-Repressor-Protein-Bindungsstelle zwischen T7-Promoter und Expressionskassette [278], die allerdings in den pPR-IBA-Vektoren nicht codiert ist [279]. Somit war von einer hohen Basalexpression des erzeugten Plasmids pHIT-Vlc-49, die zur Abtötung der geschwächten Rosetta-Gami 2 durch ein toxisches rekombinantes Beta2 führte, auszugehen. Nachdem auch durch Anreicherung des Transformationsmediums mit Glukose, die die basale Transkription des T7-Promotors deutlich verringern kann [280], keine Transformanten gewonnen werden konnten, wurde beschlossen ein weiteres Plasmid zu konstruieren. Dessen Expressionskassette wurde zur weitestgehenden Unterbindung der Basalexpression unter die Kontrolle des als sehr „dicht“ geltenden pBAD-Promoters gestellt. Ein das *Strep*-Tag® II mit einschließender Bereich aus pHIT-Vlc-49 wurde in den Vektor pBAD-Myc-His umkloniert. Durch das Einfügen eines Stop-Codons ins Insert wurde die Transkription der vektoreigenen Tags *Myc* und *His* verhindert. Das theoretische Translationsprodukt des Plasmids war sequenzidentisch mit dem von pHIT-Vlc-49, mit dem Rosetta-Gami 2 nicht transformiert werden konnte.

Mit dem neuen Plasmid konnte erst TOP10F⁻ und nach Reisolierung auch Rosetta-Gami 2 erfolgreich transformiert werden. Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) exprimierte große Mengen rekombinantes Beta2-Toxin ins Zytoplasma. Die hohe Ausbeute ist zu Teilen sicherlich auf die optimierte *Codon Usage* des Wirtes zurückzuführen, der sieben selten von *E. coli* genutzte t-RNAs überexprimiert (2.2). 25 der 235 Aminosäuren des Beta2-Toxins werden durch solche t-RNAs kodiert.

Im ELISA besaß das Expressionsprodukt, wie auch schon das sequenzidentische, ebenfalls zytoplasmatisch mit N-terminalem Tag exprimierte Beta2-Toxin aus TOP10F⁻-(pHIT-Vlc-45), eine deutlich geringere Affinität zum monoklonalen Anti-Beta2 Antikörper 2-4A5 als die anderen

rekombinanten Beta2-Varianten - ein möglicher Hinweis auf eine unterschiedliche Präsentation von Epitopen. Interessanter Weise konnten im Western Blot mit Streptactin-HRP-Konjugat und Immunblot mit polyklonalem Kaninchenserum acht auch schon in der Coomassiefärbung abgrenzbare Banden detektiert werden, die somit ein *Strep*-Tag® II und Epitope des Beta2-Toxins besaßen. Da ihre Masse (42-266 kDa) nicht dem Vielfachen der 29 kDa des monomeren Beta2 entsprach, handelte es sich wahrscheinlich um Proteinkomplexe, in denen neben dem rekombinanten Toxin *E. coli*-Proteine eingebunden waren. Eventuell wurden auch Oligomere des rekombinanten Beta2-Toxins, wie die von Gurjar *et al.* nachgewiesenen Dimere [73] oder die von Fisher beschriebenen Porenstrukturen, dargestellt [50]. Fisher vermutete, dass das Toxin erst nach Bindung an die Zielmembran Komplexe bildet, wie es beispielsweise für Entero- und Beta-Toxin von *C. perfringens* beschrieben wurde, und untersuchte daher das Toxin nach Präinkubation mit Caco-2-Zellen. Für Radio-Iod-gelabeltes Beta2 konnte er keine oligomeren Strukturen nachweisen, was er auf die durch den Iodierungsprozess beschleunigte Degradation des Toxins zurückführte. Auch in Blotting-Assays konnte er nur Beta2-Monomere detektieren. Allerdings wurde zur Extraktion des Toxins aus den Caco-2-Membranen SDS verwendet und die PAGE wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, welche Quartärstrukturen häufig auflösen [50].

Weshalb das von Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) gebildete Beta2-Toxin in multimerer Form vorlag, obwohl auch in diesem Fall eine denaturierende Gelelektrophorese (SDS, BME, Harnstoff) zur Auftrennung der Aufreinigungsprodukte genutzt wurde, bleibt ungeklärt. Eventuell führten die hohen Konzentrationen des Toxins erst zu detektierbaren Konzentrationen der Oligomerfraktionen.

Die gewonnene Beta2-Toxin-Suspension war im Zellversuch nicht toxisch. Auch die belasteten Mäuse zeigten keine Symptome, obwohl durch die hohe Dosierung (1200 µg) auch die Oligomer-fraktionen in relevanten Konzentrationen eingesetzt wurden.

Sollten *E. coli*-Proteine Bestandteil der Oligomere sein und mit hoher Affinität an Beta2-Toxin binden, würde dies sicherlich die Inaktivität des rekombinanten Produktes erklären. Wahrscheinlicher ist allerdings, besonders mit Blick auf neuere Erkenntnisse zur Sauerstoff- und Temperaturempfindlichkeit des Beta2-Toxins [50], dass die gewählten Expressionsbedingungen ungeeignet für die Gewinnung eines biologisch aktiven Produktes waren. Da die induzierten Kulturen konstant im Inkubator geschwenkt wurden, ist von einem relativ starken Sauerstoffeintrag ins Medium auszugehen. Zudem könnte auch der mechanische Einfluss des Schwenkens zur Inaktivierung geführt haben. Bei der anaeroben Kultivierung von *C. perfringens*-Stämmen wird auf eine Bewegung des Mediums verzichtet, da die Anzucht in Anaerobiergefäßen erfolgt. Der Ausschluss von Luftsauerstoff während der Expression wäre mit dem fakultativ anaeroben Expressionswirt *E. coli* möglich, in den anschließenden Aufschluss- (*French press*) und Aufreinigungsschritten (Zentrifugation, Säulenchromatographie) aber kaum

konsequent umsetzbar gewesen. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist eine rekombinante Expression von Beta2-Toxin in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen noch nicht beschrieben.

Von einer Temperaturinaktivierung des Beta2-Toxins ist aufgrund der gewählten Inkubationstemperatur von 30 °C nicht auszugehen. Allerdings ist für die zytoplasmatisch exprimierten Beta2-Varianten ein schädigender Einfluss durch die *French press* nicht auszuschließen. Der angewandte Druck von 180 MPa führt theoretisch zu einem kurzfristigen Temperaturanstieg im Ventil von bis zu 50 °C [232] (2.4.6), weshalb die Flüssigkeit vor und nach der Behandlung auf Eis gelagert wurde.

Um den natürlichen Expressionsbedingungen in *C. perfringens* nahe zu kommen sollte das Beta2-Gen inklusive seines Signalpeptids auf einen *B. subtilis*-Wirt übertragen und anaerob exprimiert werden. Das Signalpeptid kann, wie bereits in Versuchen mit Beta-Toxin demonstriert wurde [70], zur Translokation des Proteins ins Medium von *B. subtilis* genutzt werden. Eine Sequenzanalyse ergab, dass es vom Aufbau her typischen Sec-Type-Signalpeptiden von *B. subtilis* entspricht. Es besitzt einen positiv geladenen N-Terminus (Met-Ala-Ala), einen hydrophoben Mittelteil, der helixbrechende Glycin- und Prolin-Reste beinhaltet und eine Schnittstelle für eine Signalpeptidase am C-Terminus (Ala-Ser-Ala), die von der bazillären SPase I genutzt werden kann [85].

Das Toxingen wurde mit Vektor pHIT01, einem replikationsstabilen *E. coli*-*B. subtilis*-shuttle Vektor (2.2), ligiert. Der Beta2-kodierende Bereich des resultierenden Plasmids pHIT-Vlc-51 wurde sequenziert und entsprach exakt dem Wildtypoxingen (Tabelle 17). Nach Vermehrung in *E. coli* wurde pHIT-Vlc-51 auf den proteasedefizienten *B. subtilis*-Stamm WB800N (2.2) übertragen. Die einzige Arbeitsgruppe, die ebenfalls Beta2-Toxin in *B. subtilis* überexprimierte, nutzte nicht-Protease-defiziente Wirtsstämme und vermutete hierin die Ursache für die Inaktivität ihres Expressionsproduktes [75].

Parallel zur Transformation von *B. subtilis* wurde versucht das Plasmid auf eine natürliche *C. perfringens* Typ A-Alpha-toxindefektmutante (Stamm 121/91) zu übertragen, was jedoch, aufgrund einer Inkompatibilität des shuttle-plasmids mit dem Zielwirt, nicht gelang.

Die auf Produktschonung ausgerichtete Expression mit WB800N-(pHIT-Vlc-51) erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei lediglich 25 °C. Im Immun blot mit polyklonalem Anti-Beta2-Kaninchenserum konnte das rekombinante Toxin im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Wie bei den periplasmatisch in *E. coli* exprimierten Beta2-Varianten wurde es in Form einer Doppelbande detektiert, die Hinweis auf eine unvollständige Abspaltung des Signalpeptids durch Peptidasen, bzw. die Freisetzung eines immatures Produktes aus dem Zytoplasma ist.

Trotz Sequenzidentität mit dem Wildtypotoxin und durchgehend auf Schonung des Produktes ausgelegten Expressionsbedingungen konnten in den Zytotoxizitätsassays an IPEC-J2 und Caco-2-Zellen keine toxischen Effekte durch die konzentrierten Kulturüberständen beobachtet werden. Neben der Inaktivität des Produktes wären weitere Erklärungen hierfür

- eine in den gewählten Assays nicht darstellbare Aktivität,

- eine zu niedrige Konzentration des rekombinanten Beta2-Toxins oder
- die Abhängigkeit der Aktivität von einer weiteren Wirkkomponente aus *C. perfringens*.

Besonders die Zytotoxizitätsversuche mit Caco-2-Zellen sind in Ermangelung einer Positivkontrolle kritisch zu bewerten. Mit dem MTT-Test wurde die Glykolyserate der Zellen und hierdurch indirekt ihre Vitalität bestimmt. Diese wird, entsprechend den Untersuchungen von Fisher, bereits durch eine Beta2-Toxin-Konzentration von 4 µg/ml Medium auf die Hälfte verringert. In dieser Arbeit wurde jede Beta2-Variante in einer Konzentration von mindestens 100 µg/ml Medium eingesetzt und trotzdem nach 24-stündiger Inkubation weder ein zytopathischer Effekt beobachtet, noch eine Vitalitätsreduktion gemessen.

Allerdings nutzte Fisher zur Überprüfung der Zellvitalität ein anderes Verfahren, nämlich den Neutralrot-Test [50, 52]. Dieser zeigt bereits einen Integritätsverlust durch das vermeintlich porenbildende Beta2-Toxin an und ist daher vermutlich sensibler. Die Eignung der gewählten Aktivitätsassays zur Darstellung der Toxizität konnte nicht überprüft werden, da eine Positivkontrolle in Form von nativem Beta2-Toxin nicht zur Verfügung stand. Der Bezug eines biologisch aktiven Toxins von einer anderen Arbeitsgruppe war nicht möglich.

Die toxische Wirkung des Beta2-Toxins für Mäuse wurde mehrfach beschrieben. Die mittlere letale Dosis liegt nach intravenöser Applikation bei narkotisierten Mäusen zwischen 3 und 30 µg pro Tier [10, 31, 50]. Um durch die Nachwirkungen eine eventuelle Symptomatik nicht zu verschleiern wurden die gewonnen rekombinanten Toxine unbetäubten Mäusen intraperitoneal appliziert. Die intraperitoneale LD₅₀ der meisten Toxine ist höher als ihre intravenöse. Das Enterotoxin von *C. perfringens* beispielsweise ist bei intravenöser Applikation für Mäuse ca. 2,4-mal, das Beta-Toxin ca. 15-mal so toxisch wie bei intraperitonealer [34, 281, 282]. Deshalb wurde für das Beta2-Toxin eine Applikationsdosis von 50 µg/Tier, der mehr als fünfzehnfachen, intravenös letalen Dosis von 3 µg, festgesetzt. Das Beta2-Toxin aus Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) wurde, mit dem Ziel die enthaltenen Oligomerfraktionen in relevanten Konzentrationen zu testen, sogar in deutlich höherer Dosis (> 1200 µg) verabreicht.

Mit Blick auf die Ergebnisse Vilei et al., die bei parenteraler Applikation eine letale Dosis (LD₉₉) von ca. 200 µg/Tier ermittelten [47], wirken die verabreichten Dosen von 50 µg rBeta2-Toxin niedrig, hätten aber zumindest das Allgemeinbefinden der Mäuse beeinträchtigen müssen. Zudem besaß das Beta2-Toxin von Vilei vermutlich nur noch eine reduzierte Aktivität. Da Vilei keine Untersuchungen zur intravenösen Toxizität durchführte, ist eine Bewertung der Restaktivität durch den Vergleich mit den von Gibert et al. ermittelten letalen Dosen [10] nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden BALB/c-Inzucht-Mäuse mit den rekombinanten Beta2-Varianten belastet. Als sogenannte „all purpose mice“ mit eingeschränkter genetischer Vielfalt sind sie prinzipiell gut geeignet für Letalitätsversuche [283]. Allerdings ermittelte Fisher nach i. v.-Injektion seines Beta2-Toxins lediglich eine LD₅₀ von 30 µg/BALB/c-Maus [50]. Ob die in anderen Untersuchungen um den Faktor zehn erhöhte Letalität [10, 31] auf ein aktiveres Toxin

oder eine höhere Empfindlichkeit der belasteten Mäuse zurückzuführen ist, kann nicht beurteilt werden, zumal die genutzten Mauslinien ungenannt blieben.

Eine ebenfalls naheliegende Erklärung für die fehlende Zytotoxizität und Mausletalität aller Beta2-Varianten ist eine Abhängigkeit der Toxin-Aktivität von einer zusätzlichen Wirkkomponente. Trotz einer Vielzahl von Klonierungsversuchen gelang bislang nur mit *C. perfringens* die Gewinnung von biologisch aktivem Beta2-Toxin. Eventuell sind bestimmte Chaperone oder Faltungskatalysatoren für die native Konformation in Ursprungswirt verantwortlich. Cofaktoren für die biologische Wirkung könnten aber auch weitere Toxine, z. B. das Alpha-Toxin, sein. Von mehreren Arbeitsgruppen wurden synergistische Effekte diskutiert [9, 16, 284]. Eventuell könnten die vom Beta2-Toxin gebildeten großen Poren mit einer Durchlässigkeit für Partikel ≤ 342 kDa das Eindiffundieren anderer Toxine ermöglichen, die im Innern schon in kleinsten Dosen toxische Effekte hervorrufen. Für Alpha-Toxin und Perfringolysin O, welches wie Beta2-Toxin große Poren mit einem Durchmesser von 250 – 300 Å [285] ausbildet, konnte ein synergistischer Effekt nachgewiesen werden [286]. Zudem wurde in Versuchen am IHIT nachgewiesen, dass bereits sublytische Alphatoxindosen zur Zerstörung von Ferkel- und Kaninchen-Erythrozyten führen, wenn diese zuvor mit rekombinantem Beta2-Toxin aus TOP10F'-(pHIT-Vlc-40) präinkubiert wurden [23].

Die Abhängigkeit der Beta2-Aktivität von coexprimierten Faktoren oder Toxinen des natürlichen Wirtes muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Unter anderem sollen die bereits gewonnenen rekombinanten Toxine hierfür mit *C. perfringens*-Kulturüberständen oder –Lysaten vor dem Einsatz im Aktivitätsassay präinkubiert werden.

Außerdem sollten weitere Bakterienspezies mit phylogenetischer Nähe zu *C. perfringens*, die die Gegebenheiten im natürlichen Wirt eventuell besser simulieren, beispielsweise *Lactococcus lactis* oder *Streptococcus pneumoniae*, als Expressionswirte genutzt werden. Leider eignet sich das *E. coli*-*B. subtilis*-shuttle Plasmid pHIT-Vlc-51 für solche Versuche nicht, zumal auch die Transformation der *C. perfringens* Typ A Alphatoxindefektmutante nicht gelang.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zentraler Bestandteil der Bekämpfung *C. perfringens*-bedingter Durchfallerkrankungen von Ferkeln ist die Muttertierschutzimpfung mit Toxoidvakzinen. Da die zugelassenen Impfstoffe kein Beta2-Toxoid enthalten sind Neuentwicklungen unabdingbar. Eine Schlüsselrolle kommt der Herstellung der Toxine Beta und Beta2 zu, die für Wirksamkeitsnachweise, Pathogenitäts- und Immunisierungsstudien benötigt werden. Auf Grund ihrer besonderen Empfindlichkeit und der vielen Major- und Minortoxine, die *C. perfringens*-Wildstämme bilden, ist die heterologe, rekombinante Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung zweckmäßig.

Das Beta2-Toxin konnte mit dem pASK-IBA-Vektorsystem in *E. coli* TOP10F' exprimiert und in SDS-PAGE, ELISA, Western und Immunblot nachgewiesen werden. Ein C-terminal mit einem *Strep*-Tag® II versehenes Beta2-Toxin aus dem Periplasma induzierter Klone wurde zur Gewinnung poly- und monoklonaler Antikörper genutzt, die natives Beta2-Toxin im Kulturüberstand von *C. perfringens* detektierten. Es besaß jedoch keine Aktivität im Mausmodell oder im Zellkulturversuch mit Caco-2- und IPEC-J2-Zellen. Daher wurden weitere Expressionsklone erzeugt. Doch auch durch Variation der Position des *Strep*-Tag® II Affinitätsanhängsels (C- bzw. N-terminal), des Expressionskompartimentes (Zyto- und Periplasma) und des Expressionswirtes (TOP10F' und Rosetta-gami™ 2) gelang es in *E. coli* nicht, ein Beta2-Toxin mit toxischer Wirkung im Zell- oder Tierversuch zu gewinnen.

In einem weiteren Ansatz wurde das Beta2-Toxigen einschließlich seines Signalpeptids mittels Plasmidvektor pHT01 auf den phylogenetisch näher mit *C. perfringens* verwandten Expressionsstamm *B. subtilis* WB800N übertragen. Die Sequenz des rekombinanten Beta2-Toxins entsprach exakt der des Wildtyp-Toxins aus *C. perfringens*. Die Expressionsbedingungen waren auf Produktschonung des temperatur- und sauerstoffempfindlichen Produktes ausgerichtet. Dennoch waren Beta2-Toxin-haltige Konzentrate des Kulturüberstandes für Caco-2 und IPEC-J2-Zellen atoxisch.

Das Beta-Toxin-Gen *cpb* wurde mit Vektor pASK-IBA5plus ligiert und das resultierende Plasmid pHIT-Vlc-42 auf *E. coli* TOP10F' übertragen. Nach Induktion des Expressionsklons konnte das rekombinante Beta-Toxin mit N-terminalem *Strep*-Tag® II aus Ganzzelllysaten affinitätschromatographisch aufgereinigt und in SDS-PAGE, ELISA und Western Blot dargestellt werden. Nach intraperitonealer Applikation war es toxisch für BALB/c- und NMRI-Mäuse. Für letztere wurde eine halbletale Dosis von 78 µg/kg bzw. 1,56 µg/Tier ermittelt. Die letale Wirkung war damit im Vergleich mit einem aus *C. perfringens*-Kulturüberständen gewonnenen Toxin [34] reduziert, was vermutlich auf das Affinitätsanhängsel zurückzuführen ist. Drei rekombinante Beta-Toxine anderer Arbeitsgruppen zeigten in Anwesenheit eines Affinitätsanhängsels keine Aktivität [29, 71, 72].

Erstmals wurde somit ein fusioniertes, biologisch aktives Beta-Toxin erzeugt, das für Neutralisationsversuche im Rahmen der Impfstoffzulassung zur Verfügung steht. Die gewonnenen Beta2-Toxin-Varianten besitzen keine biologische Aktivität obwohl sie sich sequentiell vom nativen Toxin aus *C. perfringens* nicht bzw. lediglich durch das angefügte Affinitätsanhangsels unterscheiden. Sie können zur Herstellung von Antikörpern und als Impfantigen genutzt werden.

7 SUMMARY

A central element for prevention and control of *C. perfringens* associated diarrhoea in piglets is the vaccination of pregnant sows with toxoid vaccines. Because none of the commercial vaccines contains Beta2 toxoid new developments are indispensable. The production of the two toxins Beta and Beta2, which are needed for efficacy testings, pathogenicity and immunization studies, is of great importance. Because of their high sensitivity and the numerous major and minor toxins which are produced by *C. perfringens* wild-type strains, the toxins were to be overexpressed in *E. coli* and to be purified by affinity chromatography.

The Beta2 toxin was expressed in *E. coli* TOP10F' using the pASK-IBA vector system. Carrying a C-terminal *Strep*-Tag® II, it was purified from the periplasm of induced clones. The recombinant Beta2 was detected in SDS-PAGE, ELISA, Western and Immunoblot and used to produce poly- and monoclonal antibodies. Unfortunately, it did not show any activity in the mouse challenge or in cell culture assays with Caco-2 and IPEC-J2 cells. Therefore, further expression clones were generated. But although the position of the *Strep*-Tag® II (C- and N-terminal), the expression compartment (cyto- and periplasm) and the expression host (TOP10F' und Rosetta-gami™ 2) were varied, a Beta2 product with toxic effect in cell culture or animal trial could not be obtained. In another approach the Beta2 toxin gene with its original signal peptide was introduced into the *B. subtilis* expression strain WB800N, which is phylogenetically more closely related to *C. perfringens* than *E. coli*, using plasmid vector pHT01. The sequence of the recombinant Beta2 toxin was consistent with that of wild type toxin from *C. perfringens*. The terms of expression were adapted to preserve the temperature and oxygen sensitive product. Nevertheless, concentrates of culture supernatants containing the Beta2 toxin were non-toxic for Caco-2 and IPEC-J2 cells.

The Beta toxin gene *cpb* was ligated with vector pASK-IBA5plus and the resulting plasmid pHIT-Vlc-42 was introduced into *E. coli* TOP10F'. After induction of the expression clone, the recombinant Beta toxin with its N-terminal *Strep*-Tag® II was purified from whole cell lysates via affinity chromatography. Beta toxin was detectable in SDS-PAGE, ELISA and Western blot and showed toxic activity in BALB/c- and NMRI-mice after intraperitoneal application. For NMRI-mice a median lethal dose of 78 µg/kg or 1.56 µg/animal was calculated respectively. The lethal effect was reduced compared to toxin from *C. perfringens* culture supernatants [34], probably due to the affinity tag. Three Beta toxins from different work groups showed no activity in presence of an affinity tag [29, 71, 72], so that this is the first time that a fused, biologically active Beta toxin was generated, which is available for neutralization assays within the scope of vaccine approvals.

8 ANHANG

Tabelle 20: Verwendete Nährmedien, Lösungen und Puffer

Nährmedium / Puffer	Zusammensetzung
ABTS-Substratlösung für ELISA	20 mM Na-Citrat in PBS (pH 4,2) 10 ml ABTS 5 mg H ₂ O ₂ (30 %) 5 µl
Anodenpuffer I	Tris (1 M) 300 ml Methanol 200 ml <i>A. deionisata</i> 500 ml
Anodenpuffer II	Tris (1 M) 25 ml Methanol 200 ml <i>A. deionisata</i> 775 ml
Avertin	2,2,2-Tribrommethanol 2 g tertiärer Amylalkohol 2 ml <i>A. deionisata</i> ad 100 ml
BHI Regenerationsmedium	BHI 37 g Natriumthioglykolat 1 g Glukose 15 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
BHI-diluted-Medium	BHI 3,7 g Natriumthioglykolat 1 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
Blut-Agar-Nährboden	Blut-Agar (Basis) 40 g defibriertes Schafblut 50 ml <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
Coating-Puffer	Na ₂ CO ₃ (0,2 M) 17 ml NaHCO ₃ (0,2 M) 8 ml <i>A. deionisata</i> ad 100 ml
Coomassie-Entfärbelösung	Eisessig 10 ml Methanol 40 ml <i>A. deionisata</i> 50 ml
Coomassie-Färbefösung	Coomassie-Brillant-Blau G250 100 mg Eisessig 10 ml Methanol 40 ml <i>A. deionisata</i> 50 ml
HEPES-Puffer (pH 7,4) (10 x)	NaCl 80,0 g KCl 3,0 g HEPES 23,8 g D-Glucose (wasserfrei) 20,0 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
HS-Medium	SMM-Basis (10 x) 10 ml Glucose (20 %) 2,5 ml D,L-Tryptophan (1 mg/ml) 5 ml Caseinhydrolysat (2 %) 5 ml Hefeextrakt (10 %) 1 ml Arginin/Histidin (8 %/0,4 %) 10 ml <i>A. deionisata</i> ad 100 ml

Nährmedium / Puffer	Zusammensetzung	
Kathodenpuffer	Tris (1 M)	25 ml
	6-Aminocapronsäure	5,25 g
	Methanol	200 ml
	<i>A. deionisata</i>	770 ml
Lämmli-Probenpuffer	Tris-HCl (50 mM, pH 6,8)	1,25 %
	Glycerin	1 %
	SDS	2 %
	2-Mercaptoethanol	0,5 %
	Bromphenolblau (0,1 %)	0,25 %
	<i>A. deionisata</i>	ad 100 %
Leberbouillon nach Tarozzi	Standard-I-Nährbouillon	12,5 g
	Rinderleber	200-300 g
	Agar-Agar	1 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
LS-Medium	SMM-Basis (10 x)	10 ml
	Glucose (20 %)	2,5 ml
	D,L-Tryptophan (1 mg/ml)	0,5 ml
	Caseinhydrolysat (2 %)	0,5 ml
	Hefeextrakt (10 %)	5 ml
	MgCl ₂ (1 M)	0,25 ml
	CaCl ₂ (1 M)	0,05 ml
	<i>A. deionisata</i>	ad 100 ml
Luria-Bertani (LB)-Agar	NaCl	5 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Bacto® Trypton	5 g
	Bacto® Agar	16 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
	NaOH (1 M)	ad pH 8,0
Luria-Bertani (LB)-Bouillon	NaCl	5 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Bacto® Trypton	10 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
	NaOH (1 M)	ad pH 8,2
	Tris	12,11 g
Lysepuffer	Saccharose	171,15 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
	HCl (2 M)	ad pH 8,0
	MTT	0,1 g
MTT-Lösung	PBS	20 ml
	NaCl	10 g
PBS (pH 7,4)	KCl	0,25 g
	KH ₂ PO ₄	0,25 g
	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1,8 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,47 g
	Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g
PBS-Tween (pH 7,2)	NaCl	8,18 g
	Tween 20	0,5 ml
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml

Nährmedium / Puffer	Zusammensetzung
Probenpuffer nach Laemmli	Tris-Cl (0,5 M, pH 6,8) 1 ml Glycerol (87 %) 0,8 ml SDS (10 %) 1,6 ml 2-Mercaptoethanol 0,4 ml Bromphenolblau 0,02 g <i>A. deionisata</i> 4 ml HCl (37 %) ad pH 6,8
Puffer E	TRIS 12,11 g NaCl 8,77 g Desthiobiotin 0,54 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml HCl (2 M) ad pH 8,0
Puffer W	TRIS 12,11 g NaCl 8,77 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml HCl (2 M) ad pH 8,0
SDS-Elektrophoresepuffer (10 x)	Tris-Base 30,3 g Glycin 144 g SDS 10 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
Serumbouillon	Standard-I-Nährbouillon 25 g Rinderserum 100 ml <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
SMM-Basis (10 x)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g K ₂ HPO ₄ 14 g KH ₂ PO ₄ 6 g Natriumcitrat x 2 H ₂ O 1 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,2 g <i>A. deionisata</i> ad 100 ml
SMM-Medium	SMM-Basis 10 x 100 ml SMM-Mix mit Pyruvat 10 x 100 ml SMM-Spurenelementstock 100 x 10 ml Caseinhydrolysat (10 %) 10 ml NaNO ₃ (1M) 10 ml <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
SMM-Mix mit Pyruvat (10 x)	L-Phenylalanin 0,5 g L-Tryptophan 0,5 g Thiaminhydrochlorid 5 mg D-Glucose x H ₂ O 100 g Pyruvat Na-salt 55 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
SMM-Spurenelementstock (100 x)	CaCl ₂ 0,6 g FeCl ₂ x 4 H ₂ O 1,14 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O 0,1 g ZnCl ₂ 0,17 g CuCl ₂ x 2 H ₂ O 0,04 g CoCl ₂ x 6 H ₂ O 0,06 g Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O 0,06 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml
SMP Elektroporationspuffer	Saccharose 92,4 g 0,1 M Dinatriumphosphatlösung (pH 7,4) 70 ml MgCl ₂ 0,2 g <i>A. deionisata</i> ad 1000 ml

Nährmedium / Puffer	Zusammensetzung	
Substratlösung (Western Blot)	PBS (pH 7,4)	16 ml
	Methanol	4 ml
	4-Chlor-1-Naphtol	12 mg
	H ₂ O ₂ (30 %)	10 µl
TAE-Agarosegel (0,5 %-2 %)	TAE-Puffer	100 ml
TAE-Puffer (50 x)	Agarose Serva	0,5-2 g
	Tris-Base	242 g
	EDTA (pH 8,0) (0,5 M)	100 ml
	<i>A. deionisata</i>	500 ml
	Eisessig	ad pH 8,0
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
TE-Puffer	Tris	1,21 g
	EDTA	0,372 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
	HCl (2 M)	ad pH 8,0
TPG-Medium	BBL Trypticase Peptone	50 g
	Bacto Proteose	5 g
	Glukose	4 g
	Natriumthioglykolat	1 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
Trypsin-Gebrauchslösung	Trypsinlösung (0,25 %)	100 ml
	HEPES-Puffer (pH 7,4) (10 x)	100 ml
	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	0,1 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
Zeissler-Nährboden	Blut-Agar (Basis)	40 g
	Glucose	10 g
	defibriniertes Schafblut	50 ml
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
Zellkulturmedium 1	RPMI1640 (stabilisiertes Glutamin)	890 ml
	FCS	100 ml
	Penicillin (10000 IE/ml)-	
	Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung	10 ml
Zellkulturmedium 2	Dulbecco's modified eagle medium	470 ml
	Ham's F-12 medium	470 ml
	FCS	50 ml
	Penicillin (10000 IE/ml)-	
	Streptomycin (10000 µg/ml)-Lösung	10 ml

Tabelle 21: Verwendete Reagenzien und Materialien

Reagens	Bezugsquelle	Bestellnummer
4-Chloro-1-naphthol	Sigma-Aldrich	C8890
AatII	Fermentas	ER0991
ABTS	Serva	14364
Agarose Serva	Serva	11404
Alpha-Toxin, Phospholipase C	Sigma-Aldrich	P-4039
Alu-Gel [Al(OH) ₃]	Serva	12261.02
Amicon Ultra-15, PLGC Ultracel-PL, 10 kDa	Millipore	UFL901008
Ampicillin	Biomol	01503
Amplitaq DNA Polymerase Kit	Applied Biosystems	N808-0161
AmpliTaQ® DNA Polymerase with buffer II	Applied Biosystems	N8080153
AnaeroGen™ AN 25	Oxoid	AN0025A
AnaeroGen™ Beutel	Oxoid	AN0025
Anhydrotetracyclin	IBA GmbH	2-0401-001
Antikörper 2-4A5	[23]	-
Anti-rabbit Ig, biotinylated species-specific whole antibody (from donkey)	Amersham Life Science	RPN 1004
APS	Sigma-Aldrich	A3678
Atropinsulfat 0,5 mg/ml	Braun-Petzhold GmbH	0648037
BCA Protein Assay Kit	Pierce	23227
Bsal	New England Biolabs	R0535S
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	C0378-5G
D-Desthiobiotin	IBA GmbH	D1411-1G
dNTP-Mix	PAN Systems	PAN739027
ECL™ Anti-rabbit IgG, horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	Amersham Biosciences	NA934V
EcoRI	Fermentas	ER0271
Enterotoxaemia ELISA KIT	Bio-X Diagnostics	BIO K 095
Ethanol (99 %)	Merck	1.00983.1011
Ethidiumbromid	Serva	21251
F96 Maxisorp nunc immuno plate	Nunc	442404
Fötales Kälberserum (FCS)	A. F. Schützdecker GmbH	A15-245
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas	SM0318
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas	SM0241
Insulinspritze BD Micro-Fine+	Becton Dickinson	324803
IPTG	Carl-Roth GmbH	2316.3
Ketamin Gräub	A. Albrecht	400042.00.00
Ladepuffer (6 x)	Fermentas	R0619
Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker	Fermentas	SM0191
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce	23235
Microwell-Platten, 96-Loch, Flachboden	Nunc	167008
NcoI	Fermentas	ER0571
Nitrocellulose-Membran Protran BA 85	Whatman	9045652
Oligonukleotide	MWG Biotech AG	-
Penicillin / Streptomycin (100 x)	PAA Laboratories	P11-010
Pepton-Blockpuffer	Roche Diagnostics	11112589001
Plastik-Zellkulturfalschen, 10 ml	Nunc GmbH	17 8905
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN	20021
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN	12143
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN	12123
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN	28104
Renaturation Basic Kit for Proteins	Fluka	96827
RNAse, Ribonuclease A	Serva	34390
Rompun Lösung i. m.Vet	Bayer Tiergesundheit	1320422

Reagens	Bezugsquelle	Bestellnummer
RPMI 1640 Medium (2 mM stabilisiertes L-Glutamin und 2 g/l NaHCO ₃)	PAN BIOTECH GmbH	P04-18500
Save-lock tubes, 1,5 ml	Eppendorf	0030 120.086
Save-lock tubes, 2,0 ml	Eppendorf	0030 120.094
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen	LC5925
Silver Stain Kit	Bio-Rad	161-0443
<i>Strep</i> -Tactin-HRP-Konjugat	Institut für Bioanalytik	2-1502-001
<i>Strep</i> -Tactin-Superflow-Matrix-Säulen, 5 ml	Institut für Bioanalytik	2-1207-051
<i>Strep</i> -Tag Protein Ladder	Institut für Bioanalytik	2-1011-100
Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex	Amersham Life Science	RPN 1051
T4 DNA Ligase	Invitrogen	15224-017
TEMED	Serva	35925
Tetracyclin	Fermentas	ER0681
Ultrafree MC centrifugal filter	Millipore	UFL30GVOS
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂ (30 %)	Merck	8.22287.1000
XbaI	Fermentas	ER0681
ZebaTM Desalt Spin Column, 10 ml	Pierce	89893
Zellkultur-Flaschen, 10 ml	Nunc	178905
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner bio-one	227261

Tabelle 22: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Firma
BlueFlash Semi-Dry Blotter BF-M	Serva
Cycler TGradient 96, Best.-Nr. 050 801	Biometra
DU-600 Photometer	Beckmann
Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf
A-4-44-Rotor	
F45-30-11	
<i>French press</i>	Sim-Aminco Spectronic Instruments
Manual-Fill 40K Cell, FA-030	
Gelkammer Electro 4	Hybaid
Maxi Hybridisation Oven	Hybaid Limited
Minigel-Twin-Kammer 010-130	Biometra
Multiskan Ascent Photometer	Labsystems
ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech
RC-5B Kühlzentrifuge	Sorvall
SS 34-Rotor	
GS3-Rotor	
Rotator Bellco-Roller-Drum	Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald-Steinbach
Schüttelinkubator GFL 3032	GFL
Tischzentrifuge 5145 C	Eppendorf, Hamburg
UVIKON 810 Spektrophotometer	Kontron AG

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Johnson, M. W., G. R. Fitzgerald, M. W. Welter, and C. J. Welter.** 1992. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. *Vet. Med.* **87**:382-386.
2. **Songer, J. G.** 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* **9**:216-34.
3. **Luginbuhl, A.** 2002. [The necrotizing enteritis by *Clostridium perfringens* type C in piglets: practical observations, control and epidemiology]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **144**:263-73.
4. **McClane, B. A., F. A. Uzal, M. F. Miyakawa, D. Lyerly, and T. Wilkins.** 2004. The enterotoxigenic clostridia, p. 698-752. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed.), *The Prokaryotes*. Springer New York.
5. **Niilo, L.** 1988. *Clostridium perfringens* Type C Enterotoxemia. *Can Vet J* **29**:658-664.
6. **Johannsen, U., S. Menger, W. Erwerth, and B. Kohler.** 1986. *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia (necrotizing enteritis) of suckling pigs. *Arch Exp Veterinarmed* **40**:881-909.
7. **Klaasen, H. L., M. J. Molkenboer, J. Bakker, R. Miserez, H. Hani, J. Frey, M. R. Popoff, and J. F. van den Bosch.** 1999. Detection of the beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunol Med Microbiol* **24**:325-32.
8. **Bueschel, D. M., B. H. Jost, S. J. Billington, H. T. Trinh, and J. G. Songer.** 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol* **94**:121-9.
9. **Waters, M., A. Savoie, H. S. Garmory, D. Bueschel, M. R. Popoff, J. G. Songer, R. W. Titball, B. A. McClane, and M. R. Sarker.** 2003. Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *J Clin Microbiol* **41**:3584-91.
10. **Gibert, M., C. Jolivet-Reynaud, and M. R. Popoff.** 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* **203**:65-73.
11. **Garmory, H. S., N. Chanter, N. P. French, D. Bueschel, J. G. Songer, and R. W. Titball.** 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect* **124**:61-7.
12. **Johansson, A., A. Aspan, E. Bagge, V. Baverud, B. E. Engstrom, and K. E. Johansson.** 2006. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol* **6**:47.
13. **Herholz, C., R. Miserez, J. Nicolet, J. Frey, M. Popoff, M. Gibert, H. Gerber, and R. Straub.** 1999. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J Clin Microbiol* **37**:358-61.
14. **Bacciarini, L. N., P. Boerlin, R. Straub, J. Frey, and A. Grone.** 2003. Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* beta2-toxin in the gastrointestinal tract of horses. *Vet Pathol* **40**:376-81.
15. **Dennison, A. C., D. C. Van Metre, P. S. Morley, R. J. Callan, E. C. Plampin, and R. P. Ellis.** 2005. Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. *J Am Vet Med Assoc* **227**:132-8.
16. **Manteca, C., G. Daube, T. Jauniaux, A. Linden, V. Pirson, J. Detilleux, A. Ginter, P. Coppe, A. Kaackenbeeck, and J. G. Mainil.** 2002. A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet Microbiol* **86**:191-202.
17. **Jost, B. H., H. T. Trinh, and J. G. Songer.** 2006. Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Vet Microbiol* **116**:158-65.

18. **Sting, R.** 2009. Detection of beta2 and major toxin genes by PCR in *Clostridium perfringens* field isolates of domestic animals suffering from enteritis or enterotoxaemia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **122**:341-7.
19. **Jost, B. H., S. J. Billington, H. T. Trinh, D. M. Bueschel, and J. G. Songer.** 2005. Atypical cpb2 genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infect Immun* **73**:652-6.
20. **Songer, J. G., and F. A. Uzal.** 2005. Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest* **17**:528-36.
21. **van Asten, A. J., J. G. Allaart, A. D. Meeles, P. W. Gloudemans, D. J. Houwers, and A. Grone.** 2008. A new PCR followed by MboI digestion for the detection of all variants of the *Clostridium perfringens* cpb2 gene. *Vet Microbiol* **127**:412-6.
22. **van Asten, A. J., G. N. Nikolaou, and A. Grone.** 2008. The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet J*.
23. **Sommer, A.** Dissertationsarbeit, nicht veröffentlicht. Etablierung und Evaluierung eines Capture-ELISA zum Nachweis des β 2-Toxins von *Clostridium perfringens* aus Feldisolaten. Justus-Liebig-Universität Giessen.
24. **Lebrun, M., P. Filee, B. Mousset, D. Desmecht, M. Galleni, J. G. Mainil, and A. Linden.** 2007. The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. *Vet Microbiol* **120**:151-7.
25. **Crespo, R., D. J. Fisher, H. L. Shivaprasad, M. E. Fernandez-Miyakawa, and F. A. Uzal.** 2007. Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. *J Vet Diagn Invest* **19**:329-33.
26. **Springer, S., and H. J. Selbitz.** 1999. The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* **24**:333-6.
27. **Hunter, S. E., J. E. Brown, P. C. Oyston, J. Sakurai, and R. W. Titball.** 1993. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **61**:3958-65.
28. **Steinthorsdottir, V., H. Halldorsson, and O. S. Andresson.** 2000. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microb Pathog* **28**:45-50.
29. **Shatursky, O., R. Bayles, M. Rogers, B. H. Jost, J. G. Songer, and R. K. Tweten.** 2000. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infect Immun* **68**:5546-51.
30. **Nagahama, M., S. Hayashi, S. Morimitsu, and J. Sakurai.** 2003. Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. *J Biol Chem* **278**:36934-41.
31. **Jolivet-Reynaud, C., M. R. Popoff, M.-A. Vinit, P. Ravisse, H. Moreau, and J. E. Alouf.** 1986. Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* Beta Toxin and Other Clostridial Toxins. *Zb. Bacteriol. Microbiol. Hyg. Suppl.*, pp. **15**:145-151.
32. **Miclard, J., M. Jaggi, E. Sutter, M. Wyder, B. Grabscheid, and H. Posthaus.** 2009. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Vet Microbiol*.
33. **Miclard, J., J. van Baarlen, M. Wyder, B. Grabscheid, and H. Posthaus.** 2009. *Clostridium perfringens* {beta}-toxin binding to vascular endothelial cells in a human case of enteritis necroticans. *J Med Microbiol* **58**:826-8.
34. **Sakurai, J., and Y. Fujii.** 1987. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* beta toxin. *Toxicon* **25**:1301-10.
35. **Nagahama, M., S. Morimitsu, A. Kihara, M. Akita, K. Setsu, and J. Sakurai.** 2003. Involvement of tachykinin receptors in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation. *Br J Pharmacol* **138**:23-30.
36. **Nagahama, M., A. Kihara, H. Kintoh, M. Oda, and J. Sakurai.** 2008. Involvement of tumour necrosis factor-alpha in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation in mice. *Br J Pharmacol* **153**:1296-302.

37. **Parnas, J.** 1976. About the influence of beta-toxin of *Clostridium perfringens* (type C) on the motorics of intestine segments (in vitro). I. Communication. Zentralbl Bakteriol [Orig A] **234**:243-6.
38. **Lawrence, G., and R. Cooke.** 1980. Experimental pigbel: the production and pathology of necrotizing enteritis due to *Clostridium welchii* type C in the guinea-pig. Br J Exp Pathol **61**:261-71.
39. **Bergeland, M. E.** 1972. Pathogenesis and immunity of *Clostridium perfringens* type C enteritis in swine. J Am Vet Med Assoc **160**:568-71.
40. **Sayeed, S., F. A. Uzal, D. J. Fisher, J. Saputo, J. E. Vidal, Y. Chen, P. Gupta, J. I. Rood, and B. A. McClane.** 2008. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. Mol Microbiol **67**:15-30.
41. **Vidal, J. E., B. A. McClane, J. Saputo, J. Parker, and F. A. Uzal.** 2008. Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. Infect Immun **76**:4396-404.
42. **Köhler, B.** 1997. Untersuchungen zur Diagnostik und Epidemiologie der Nekrotisierende Enteritis des Schweines in Norddeutschland. Prakt. Tierarzt **78**:1078-1094.
43. **Sakurai, J., and C. L. Duncan.** 1978. Some properties of beta-toxin produced by *Clostridium perfringens* type C. Infect Immun **21**:678-80.
44. **Sakurai, J., Y. Fujii, M. Matsuura, and K. Endo.** 1981. Pharmacological effect of beta toxin of *Clostridium perfringens* type C on rats. Microbiol Immunol **25**:423-32.
45. **Sakurai, J., Y. Fujii, K. Dezaki, and K. Endo.** 1984. Effect of *Clostridium perfringens* beta toxin on blood pressure of rats. Microbiol Immunol **28**:23-31.
46. **Sakurai, J., and M. Nagahama.** 2006. *Clostridium perfringens* beta-toxin: Characterization and action. Toxin Reviews **25**:89 - 108.
47. **Vilei, E. M., Y. Schlatter, V. Perreten, R. Straub, M. R. Popoff, M. Gibert, A. Grone, and J. Frey.** 2005. Antibiotic-induced expression of a cryptic cpb2 gene in equine beta2-toxigenic *Clostridium perfringens*. Mol Microbiol **57**:1570-81.
48. **Sayeed, S., M. E. Fernandez-Miyakawa, D. J. Fisher, V. Adams, R. Poon, J. I. Rood, F. A. Uzal, and B. A. McClane.** 2005. Epsilon-toxin is required for most *Clostridium perfringens* type D vegetative culture supernatants to cause lethality in the mouse intravenous injection model. Infect Immun **73**:7413-21.
49. **Fisher, D. J., M. E. Fernandez-Miyakawa, S. Sayeed, R. Poon, V. Adams, J. I. Rood, F. A. Uzal, and B. A. McClane.** 2006. Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. Infect Immun **74**:5200-10.
50. **Fisher, D. J.** 2006. *Clostridium perfringens* beta2 toxin: a potential accessory toxin in gastrointestinal diseases of humans and domestic animals. University of Pittsburgh.
51. **Fernandez-Miyakawa, M. E., D. J. Fisher, R. Poon, S. Sayeed, V. Adams, J. I. Rood, B. A. McClane, and F. A. Uzal.** 2007. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. Infect Immun **75**:1443-52.
52. **Fisher, D. J., K. Miyamoto, B. Harrison, S. Akimoto, M. R. Sarker, and B. A. McClane.** 2005. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. Mol Microbiol **56**:747-62.
53. **Petit, L., M. Gibert, and M. R. Popoff.** 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol **7**:104-10.
54. **Worthington, R. W., and M. S. Mulders.** 1975. The partial purification of *Clostridium perfringens* beta toxin. Onderstepoort J Vet Res **42**:91-8.
55. **Sakurai, J., and C. L. Duncan.** 1977. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. Infect Immun **18**:741-5.
56. **Hatheway, C. L.** 1990. Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev **3**:66-98.
57. **Rood, J. I., and S. T. Cole.** 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol Rev **55**:621-48.

58. **Czczulin, J. R., R. E. Collie, and B. A. McClane.** 1996. Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally cpe-negative type A, B, and C isolates of *C. perfringens*. *Infect Immun* **64**:3301-9.
59. **Roberts, I., W. M. Holmes, and P. B. Hylemon.** 1988. Development of a new shuttle plasmid system for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* **54**:268-70.
60. **Bannam, T. L., and J. I. Rood.** 1993. *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants. *Plasmid* **29**:233-5.
61. **Matsushita, C., O. Matsushita, M. Koyama, and A. Okabe.** 1994. A *Clostridium perfringens* vector for the selection of promoters. *Plasmid* **31**:317-9.
62. **Kim, A. Y., and H. P. Blaschek.** 1989. Construction of an *Escherichia coli*-*Clostridium perfringens* shuttle vector and plasmid transformation of *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* **55**:360-5.
63. **Lyras, D., and J. I. Rood.** 1998. Conjugative transfer of RP4-oriT shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium perfringens*. *Plasmid* **39**:160-4.
64. **Allen, S. P., and H. P. Blaschek.** 1990. Factors involved in the electroporation-induced transformation of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett* **58**:217-20.
65. **Phillips-Jones, M. K.** 1990. Plasmid transformation of *Clostridium perfringens* by electroporation methods. *FEMS Microbiol Lett* **54**:221-6.
66. **Scott, P. T., and J. I. Rood.** 1989. Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. *Gene* **82**:327-33.
67. **Jiraskova, A., L. Vitek, J. Fevery, T. Ruml, and P. Branny.** 2005. Rapid protocol for electroporation of *Clostridium perfringens*. *J Microbiol Methods* **62**:125-7.
68. **Jirásková, A.** 2004. Optimization and development of genetic tools to manipulate *Clostridium perfringens*, one of the bilirubin-reducing bacteria. Diploma thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
69. **Sakurai, J., Y. Fujii, and M. Matsuura.** 1980. Effect of oxidizing agents and sulfhydryl group reagents on beta toxin from *Clostridium perfringens* type C. *Microbiol Immunol* **24**:595-601.
70. **Steinthorsdottir, V., V. Fridriksdottir, E. Gunnarsson, and O. S. Andresson.** 1998. Site-directed mutagenesis of *Clostridium perfringens* beta-toxin: expression of wild-type and mutant toxins in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **158**:17-23.
71. **Steinthorsdottir, V., V. Fridriksdottir, E. Gunnarsson, and O. S. Andresson.** 1995. Expression and purification of *Clostridium perfringens* beta-toxin glutathione S-transferase fusion protein. *FEMS Microbiol Lett* **130**:273-8.
72. **Nagahama, M., A. Kihara, T. Miyawaki, M. Mukai, Y. Sakaguchi, S. Ochi, and J. Sakurai.** 1999. *Clostridium perfringens* beta-toxin is sensitive to thiol-group modification but does not require a thiol group for lethal activity. *Biochim Biophys Acta* **1454**:97-105.
73. **Gurjar, A. A., N. H. Yennawar, H. P. Yennawar, K. R. Rajashankar, N. V. Hegde, and B. M. Jayarao.** 2007. Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of recombinant *Clostridium perfringens* beta 2-toxin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**:484-7.
74. **Harrison, B., D. Raju, H. S. Garmory, M. M. Brett, R. W. Titball, and M. R. Sarker.** 2005. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene. *Appl Environ Microbiol* **71**:8362-70.
75. **Lebrun, M., P. Filee, M. Galleni, J. G. Mainil, A. Linden, and B. Taminiau.** 2007. Purification of the recombinant beta2 toxin (CPB2) from an enterotoxaemic bovine *Clostridium perfringens* strain and production of a specific immune serum. *Protein Expr Purif* **55**:119-31.
76. **Timoney, J. F., M. Hartmann, L. Fallon, E. Fallon, and J. Walker.** 2005. Antibody responses of mares to prepartum vaccination with *Clostridium perfringens* bacterin and beta2 toxin. *Vet Rec* **157**:810-2.
77. **Waters, M., D. Raju, H. S. Garmory, M. R. Popoff, and M. R. Sarker.** 2005. Regulated expression of the beta2-toxin gene (cpb2) in *Clostridium perfringens* type a isolates from horses with gastrointestinal diseases. *J Clin Microbiol* **43**:4002-9.

78. **Xu, C. B., J. Zeng, C. L. Xu, and Y. J. Wang.** 2005. [Fusion of betal-toxin gene and beta2-toxin gene from *Clostridium perfringens* type C]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **45**:205-8.
79. **Westers, L., H. Westers, and W. J. Quax.** 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta* **1694**:299-310.
80. **Baneyx, F.** 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**:411-21.
81. **Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-74.
82. **Bundesgesundheitsministerium.** 2001. Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten.
83. **McNeff, C., Q. Zhao, E. Almlof, M. Flickinger, and P. W. Carr.** 1999. The efficient removal of endotoxins from insulin using quaternized polyethyleneimine-coated porous zirconia. *Anal Biochem* **274**:181-7.
84. **Cognet, I., A. B. de Coignac, G. Magistrelli, P. Jeannin, J. P. Aubry, K. Maisnier-Patin, G. Caron, S. Chevalier, F. Humbert, T. Nguyen, A. Beck, D. Velin, Y. Delneste, M. Malissard, and J. F. Gauchat.** 2003. Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of *Escherichia coli* BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation. *J Immunol Methods* **272**:199-210.
85. **Meima, R., J. M. van Dijk, S. Holsappel, S. Bron, and F. in Baneyx.** 2004. Expression Systems in *Bacillus*. In F. Baneyx (ed.), *Protein Expression Technologies - Current Status and Future Trends*.
86. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin, and et al.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-56.
87. **Schumann, W.** 2007. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv Appl Microbiol* **62**:137-89.
88. **Li, W., X. Zhou, and P. Lu.** 2004. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **155**:605-10.
89. **Wu, S. C., J. C. Yeung, Y. Duan, R. Ye, S. J. Szarka, H. R. Habibi, and S. L. Wong.** 2002. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol* **68**:3261-9.
90. **Wu, S. C., R. Ye, X. C. Wu, S. C. Ng, and S. L. Wong.** 1998. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *J Bacteriol* **180**:2830-5.
91. **Wu, X. C., W. Lee, L. Tran, and S. L. Wong.** 1991. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J Bacteriol* **173**:4952-8.
92. **Wong, S. L.** 1989. Development of an inducible and enhancible expression and secretion system in *Bacillus subtilis*. *Gene* **83**:215-23.
93. **Doi, R. H., S. L. Wong, and F. kawamura.** 1986. Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins. *Trends Biotechnol*:232-235.
94. **Dubnau, D., and C. M. Lovett.** 2002. Transformation and recombination, p. 453-471. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM press, Washington D.C.
95. **Xue, G.-P., J. S. Johnson, and B. P. Dalrymple.** 1999. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods* **34**:183-191.

96. **Bron, S., S. Holsappel, G. Venema, and B. P. Peeters.** 1991. Plasmid deletion formation between short direct repeats in *Bacillus subtilis* is stimulated by single-stranded rolling-circle replication intermediates. *Mol Gen Genet* **226**:88-96.
97. **Bron, S., W. Meijer, S. Holsappel, and P. Haima.** 1991. Plasmid instability and molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **142**:875-83.
98. **Ehrlich, S. D., C. Bruand, S. Sozhamannan, P. Dabert, M. F. Gros, L. Janniere, and A. Gruss.** 1991. Plasmid replication and structural stability in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **142**:869-73.
99. **Titok, M. A., J. Chapuis, Y. V. Selezneva, A. V. Lagodich, V. A. Prokulevich, S. D. Ehrlich, and L. Janniere.** 2003. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid* **49**:53-62.
100. **Anfinsen, C. B.** 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**:223-30.
101. **Löffler, G., and P. E. Petrides.** 1997. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag.
102. **Dill, K. A.** 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**:7133-55.
103. **Stabenau, A.** 2003. Trocknung und Stabilisierung von Proteinen mittels Warmlufttrocknung und Applikation von Mikrotropfen. Ludwig-Maximilians-Universität München.
104. **Tanford, C.** 1968. Protein denaturation. *Adv Protein Chem* **23**:121-282.
105. **Zale, S. E., and A. M. Klibanov.** 1986. Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? *Biochemistry* **25**:5432-44.
106. **Dill, K. A., and D. Shortle.** 1991. Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem* **60**:795-825.
107. **Shortle, D. R.** 1996. Structural analysis of non-native states of proteins by NMR methods. *Curr Opin Struct Biol* **6**:24-30.
108. **Fersht, A.** 1977. *Enzyme Structure and Metabolism*. W.H. Freeman & Co Ltd.
109. **Shortle, D.** 1996. The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *Faseb J* **10**:27-34.
110. **Zippelius, R.** 2002. Untersuchungen zum Einfrier- und Auftauverhalten pharmazeutischer Humanproteinlösungen im Großmaßstab. Ludwig-Maximilians-Universität München.
111. **Ellis, J.** 1987. Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328**:378-9.
112. **Hemmingsen, S. M., C. Woolford, S. M. van der Vies, K. Tilly, D. T. Dennis, C. P. Georgopoulos, R. W. Hendrix, and R. J. Ellis.** 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**:330-4.
113. **Mujacic, M., and F. Baneyx.** 2004. Expression, Folding and Degradation in *Escherichia coli*. In F. Baneyx (ed.), *Protein Expression Technologies - Current Status and Future Trends*.
114. **Bukau, B., F. X. Schmid, and J. Buchner.** 1999. Assisted protein folding, p. 3-10. In B. Bukau (ed.), *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanisms*. Harwood Academic.
115. **Schäffner, J.** 2000. Einfluß niedermolekularer Medienzusätze und sezernierter, ATPunabhängiger Chaperone auf die Ausbeute therapeutischer Proteine im Periplasma von *Escherichia coli*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
116. **Baneyx, F., and J. L. Palumbo.** 2003. Improving heterologous protein folding via molecular chaperone and foldase co-expression. *Methods Mol Biol* **205**:171-97.
117. **Thomas, J. G., A. Ayling, and F. Baneyx.** 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* **66**:197-238.
118. **Nishihara, K., M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, and T. Yura.** 1998. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**:1694-9.
119. **Roman, L. J., E. A. Sheta, P. Martasek, S. S. Gross, Q. Liu, and B. S. Masters.** 1995. High-level expression of functional rat neuronal nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8428-32.

120. **Cloney, L. P., D. R. Bekkaoui, and S. M. Hemmingsen.** 1993. Co-expression of plastid chaperonin genes and a synthetic plant Rubisco operon in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol* **23**:1285-90.
121. **Goloubinoff, P., A. Mogk, A. P. Zvi, T. Tomoyasu, and B. Bukau.** 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13732-7.
122. **Thomas, J. G., and F. Baneyx.** 1996. Protein folding in the cytoplasm of *Escherichia coli*: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES molecular chaperone machines. *Mol Microbiol* **21**:1185-96.
123. **Dale, G. E., H. J. Schonfeld, H. Langen, and M. Stieger.** 1994. Increased solubility of trimethoprim-resistant type S1 DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. *Protein Eng* **7**:925-31.
124. **Lee, S. C., and P. O. Olins.** 1992. Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**:2849-52.
125. **Yokoyama, K., Y. Kikuchi, and H. Yasueda.** 1998. Overproduction of DnaJ in *Escherichia coli* improves in vivo solubility of the recombinant fish-derived transglutaminase. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**:1205-10.
126. **Vonrhein, C., U. Schmidt, G. A. Ziegler, S. Schweiger, I. Hanukoglu, and G. E. Schulz.** 1999. Chaperone-assisted expression of authentic bovine adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **443**:167-9.
127. **Nishihara, K., M. Kanemori, H. Yanagi, and T. Yura.** 2000. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**:884-9.
128. **Missiakas, D., J. M. Betton, and S. Raina.** 1996. New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol Microbiol* **21**:871-84.
129. **Homuth, G., S. Masuda, A. Mogk, Y. Kobayashi, and W. Schumann.** 1997. The dnaK operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J Bacteriol* **179**:1153-64.
130. **Li, M., and S. L. Wong.** 1992. Cloning and characterization of the groESL operon from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**:3981-92.
131. **Yuan, G., and S. L. Wong.** 1995. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* groE regulatory mutants: evidence for orf39 in the dnaK operon as a repressor gene in regulating the expression of both groE and dnaK. *J Bacteriol* **177**:6462-8.
132. **Yuan, G., and S. L. Wong.** 1995. Regulation of groE expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the sigma A-like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE). *J. Bacteriol.* **177**:5427-5433.
133. **Zuber, U., and W. Schumann.** 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**:1359-63.
134. **Wu, X. C., S. C. Ng, R. I. Near, and S. L. Wong.** 1993. Efficient production of a functional single-chain antidigoxin antibody via an engineered *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Biotechnology (N Y)* **11**:71-6.
135. **Jacobs, M., J. B. Andersen, V. Kontinen, and M. Sarvas.** 1993. *Bacillus subtilis* PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences. *Mol Microbiol* **8**:957-66.
136. **Kontinen, V. P., P. Saris, and M. Sarvas.** 1991. A gene (prsA) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. *Mol Microbiol* **5**:1273-83.
137. **Kontinen, V. P., and M. Sarvas.** 1993. The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion. *Mol Microbiol* **8**:727-37.
138. **Goldberg, A. L., and A. C. St John.** 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu Rev Biochem* **45**:747-803.
139. **Gottesman, S.** 1990. Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: genetic solutions. *Methods Enzymol* **185**:119-29.
140. **Friebs, K. H.** 2000. Maßnahmen zur Verbesserung der Produktion von rekombinanten Proteinen und Plasmid-DNS. Habilitationsschrift, Technische Fakultät Universität Bielefeld.

141. **Miller, C. G.** 1996. Protein degradation and proteolytic modification. *In* N. F.C. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*.
142. **Gottesman, S.** 1996. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**:465-506.
143. **Kihara, A., Y. Akiyama, and K. Ito.** 1995. FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:4532-6.
144. **Jayasekera, M. M., S. K. Foltin, E. R. Olson, and T. P. Holler.** 2000. *Escherichia coli* requires the protease activity of FtsH for growth. *Arch Biochem Biophys* **380**:103-7.
145. **Baneyx, F., and G. Georgiou.** 1990. In vivo degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J Bacteriol* **172**:491-4.
146. **Baneyx, F., and G. Georgiou.** 1991. Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo. *J Bacteriol* **173**:2696-703.
147. **Meerman, H. J., and G. Georgiou.** 1994. Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)* **12**:1107-10.
148. **Riethdorf, S., U. Volker, U. Gerth, A. Winkler, S. Engelmann, and M. Hecker.** 1994. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* lon gene. *J Bacteriol* **176**:6518-27.
149. **Serrano, M., S. Hovel, C. P. Moran, Jr., A. O. Henriques, and U. Volker.** 2001. Forespore-specific transcription of the lonB gene during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:2995-3003.
150. **Noone, D., A. Howell, R. Collery, and K. M. Devine.** 2001. YkdA and YvtA, HtrA-like serine proteases in *Bacillus subtilis*, engage in negative autoregulation and reciprocal cross-regulation of ykdA and yvtA gene expression. *J Bacteriol* **183**:654-63.
151. **Deuerling, E., A. Mogk, C. Richter, M. Purucker, and W. Schumann.** 1997. The ftsH gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. *Mol Microbiol* **23**:921-33.
152. **Bolhuis, A., H. Tjalsma, H. E. Smith, A. de Jong, R. Meima, G. Venema, S. Bron, and J. M. van Dijk.** 1999. Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**:2934-41.
153. **Jensen, C. L., K. Stephenson, S. T. Jorgensen, and C. Harwood.** 2000. Cell-associated degradation affects the yield of secreted engineered and heterologous proteins in the *Bacillus subtilis* expression system. *Microbiology* **146 (Pt 10)**:2583-94.
154. **Stephenson, K., N. M. Carter, C. R. Harwood, M. F. Petit-Glatron, and R. Chambert.** 1998. The influence of protein folding on late stages of the secretion of alpha-amylases from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett* **430**:385-9.
155. **Noiva, R.** 1994. Enzymatic catalysis of disulfide formation. *Protein Expr Purif* **5**:1-13.
156. **Antelmann, H., E. Darmon, D. Noone, J. W. Veening, H. Westers, S. Bron, O. P. Kuipers, K. M. Devine, M. Hecker, and J. M. van Dijk.** 2003. The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions. *Mol Microbiol* **49**:143-56.
157. **Stephenson, K., S. Bron, and C. R. Harwood.** 1999. Cellular lysis in *Bacillus subtilis*; the affect of multiple extracellular protease deficiencies. *Letters in Applied Microbiology* **29**:141-145.
158. **Ye, R., L. P. Yang, and S. L. Wong.** 1996. Presented at the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry.
159. **Nagahari, K., S. Kanaya, K. Munakata, Y. Aoyagi, and S. Mizushima.** 1985. Secretion into the culture medium of a foreign gene product from *Escherichia coli*: use of the ompF gene for secretion of human beta-endorphin. *Embo J* **4**:3589-92.
160. **Makrides, S. C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**:512-38.
161. **Prinz, W. A., F. Aslund, A. Holmgren, and J. Beckwith.** 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* **272**:15661-7.

162. **Derman, A. I., and J. Beckwith.** 1995. Escherichia coli alkaline phosphatase localized to the cytoplasm slowly acquires enzymatic activity in cells whose growth has been suspended: a caution for gene fusion studies. *J Bacteriol* **177**:3764-70.
163. **Schneider, E. L., J. G. Thomas, J. A. Bassuk, E. H. Sage, and F. Baneyx.** 1997. Manipulating the aggregation and oxidation of human SPARC in the cytoplasm of Escherichia coli. *Nat Biotechnol* **15**:581-5.
164. **Bessette, P. H., F. Aslund, J. Beckwith, and G. Georgiou.** 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13703-8.
165. **Jurado, P., D. Ritz, J. Beckwith, V. de Lorenzo, and L. A. Fernandez.** 2002. Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. *J Mol Biol* **320**:1-10.
166. **Fabianek, R. A., H. Hennecke, and L. Thony-Meyer.** 2000. Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of Escherichia coli. *FEMS Microbiol Rev* **24**:303-16.
167. **Braun, P., G. Gerritse, J. M. van Dijl, and W. J. Quax.** 1999. Improving protein secretion by engineering components of the bacterial translocation machinery. *Curr Opin Biotechnol* **10**:376-81.
168. **Glockshuber, R.** 1992. Verbesserung der Ausbeute bei der Sekretion von disulfidverbrückten Proteinen.
169. **Bolhuis, A., G. Venema, W. J. Quax, S. Bron, and J. M. van Dijl.** 1999. Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in Bacillus subtilis. *J Biol Chem* **274**:24531-8.
170. **LaVallie, E. R., and J. M. McCoy.** 1995. Gene fusion expression systems in Escherichia coli. *Curr Opin Biotechnol* **6**:501-6.
171. **Nilsson, J., S. Stahl, J. Lundeberg, M. Uhlen, and P. A. Nygren.** 1997. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* **11**:1-16.
172. **Kapust, R. B., and D. S. Waugh.** 1999. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**:1668-74.
173. **Bucher, M. H., A. G. Evdokimov, and D. S. Waugh.** 2002. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of Pyrococcus furiosus maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**:392-7.
174. **Terpe, K.** 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**:523-33.
175. **Kopito, R. R.** 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* **10**:524-30.
176. **Chan, W., L. R. Helms, I. Brooks, G. Lee, S. Ngola, D. McNulty, B. Maleeff, P. Hensley, and R. Wetzel.** 1996. Mutational effects on inclusion body formation in the periplasmic expression of the immunoglobulin VL domain REI. *Fold Des* **1**:77-89.
177. **Carrio, M. M., and A. Villaverde.** 2005. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J Bacteriol* **187**:3599-601.
178. **Patro, S. Y., and T. M. Przybycien.** 1996. Simulations of reversible protein aggregate and crystal structure. *Biophys J* **70**:2888-902.
179. **Kiefhaber, T., R. Rudolph, H. H. Kohler, and J. Buchner.** 1991. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)* **9**:825-9.
180. **Lilie, H., E. Schwarz, and R. Rudolph.** 1998. Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Curr Opin Biotechnol* **9**:497-501.
181. **Oliver, D. B.** 1996. Periplasm. *In* Neidhardt (ed.), Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology, 2nd ed. ed. ASM Press, Washington D.C.
182. **Singh, S. M., and A. K. Panda.** 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* **99**:303-10.
183. **Ventura, S., and A. Villaverde.** 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol* **24**:179-85.
184. **Hockney, R. C.** 1994. Recent developments in heterologous protein production in Escherichia coli. *Trends Biotechnol* **12**:456-63.

185. **Brockmeier, U., M. Wendorff, and T. Eggert.** 2006. Versatile expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **52**:143-8.
186. **Lehninger, A. L.** 2001. *Lehninger Biochemie*.
187. **Ophardt, C. E.** 2003. Denaturation of Proteins - Virtual Chembook Elmhurst College, <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/568denaturation.html>.
188. **Hemschemeier, S. K.** Denaturierung von Proteinen durch Temperatur. FIZ CHEMIE Berlin, <http://www.chemgapedia.de/>.
189. **Sinclair, N. A., and J. L. Stokes.** 1963. Role of oxygen in the high cell yields of psychrophiles and mesophiles at low temperatures. *J Bacteriol* **85**:164-7.
190. **Ingraham, and Marr.** 1996. Effect of temperature, pH and osmotic stress on growth, p. 1570-1578. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and salmonella-cellular and molecular biology*.
191. **Nichols, D. S., P. D. Nichols, and T. A. McMeekin.** 1995. Ecology and physiology of psychrophilic bacteria from Antarctic saline lakes and ice-sea. *Sci Prog* **78**:311-348.
192. **Holtmann, G., and E. Bremer.** 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol* **186**:1683-93.
193. **Wang, Y. J., and M. A. Hanson.** 1987. Parenteral formulations of proteins and peptides: stability and stabilizers. *J. Parenter. Sci. Technol.* **42**:2-26.
194. **Van Den Berg, L., and D. Rose.** 1959. Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions; the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{-HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$. *Arch Biochem Biophys* **81**:319-29.
195. **Murase, N., and F. Franks.** 1989. Salt precipitation during the freeze-concentration of phosphate buffer solutions. *Biophys Chem* **34**:293-300.
196. **Anchordoquy, T. J., and J. F. Carpenter.** 1996. Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state. *Arch Biochem Biophys* **332**:231-8.
197. **Wisniewski, R.** 1998. Developing Large-Scale Cryopreservation Systems for Biopharmaceutical Products. *BioPharm Jun*:50-60.
198. **Cao, E., Y. Chen, Z. Cui, and P. R. Foster.** 2003. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng* **82**:684-90.
199. **Roempp, H., and J. Falbe.** 1989. *Roempp Chemie Lexikon*.
200. **Meltendorf, C.** 2001. *Vitrifikation von Hornhautlamellen*. Freie Universität Berlin.
201. **Eckhardt, B. M., J. Q. Oeswein, and T. A. Bewley.** 1991. Effect of freezing on aggregation of human growth hormone. *Pharm Res* **8**:1360-4.
202. **Strambini, G. B., and E. Gabellieri.** 1996. Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophys J* **70**:971-6.
203. **Charm, S. E., and B. L. Wong.** 1981. Shear effects on enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* **3**:111-118.
204. **Reese, E. T., and D. Y. Ryu.** 1980. Shear inactivation of cellulase of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol* **2**:239-240.
205. **Byrne, E. P., and J. J. Fitzpatrick.** 2002. Investigation of how agitation during precipitation, and subsequent processing affects the particle size distribution and separation of alpha-lactalbumin enriched whey protein precipitates. *Biochem. Eng. J.* **10**:17-25.
206. **Colombié, S., A. Gaunand, M. Rinaudo, and B. Lindet.** 2000. Irreversible lysozyme inactivation and aggregation induced by stirring: kinetic study and aggregates characterisation. **22**:277-283.
207. **Norde, W.** 1992. The behaviour of proteins at interfaces in relation to their structural stability. *Proceedings of an International Symposium in Maastricht*.
208. **Maa, Y.-F., and C. C. Hsu.** 1997. Protein Denaturation by Combined Effect of Shear and Air-Liquid Interface. *Biotechnology and Bioengineering* **54**:503-512.
209. **Yu, Z., K. P. Johnston, and R. O. Williams, 3rd.** 2006. Spray freezing into liquid versus spray-freeze drying: influence of atomization on protein aggregation and biological activity. *Eur J Pharm Sci* **27**:9-18.
210. **Morel, M. H., A. Redl, and S. Guilbert.** 2002. Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromolecules* **3**:488-97.

211. **Choi, H., K. Aboulfatova, H. J. Pownall, R. Cook, and J. F. Dong.** 2007. Shear-induced disulfide bond formation regulates adhesion activity of von Willebrand factor. *J Biol Chem* **282**:35604-11.
212. **Stathopoulos, P. B., G. A. Scholz, Y. M. Hwang, J. A. Rumfeldt, J. R. Lepock, and E. M. Meiering.** 2004. Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci* **13**:3017-27.
213. **van de Weert, M., W. E. Hennink, and W. Jiskoot.** 2000. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm Res* **17**:1159-67.
214. **Tian, Z. M., M. X. Wan, S. P. Wang, and J. Q. Kang.** 2004. Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin. *Ultrason Sonochem* **11**:399-404.
215. **Neis, U., and A. Tiehm.** 1999. Ultrasound in Environmental Engineering - Ultrasound in waste water and sludge treatment. TU Hamburg-Harburg Reports on Sanitary Engineering **25**:39-61.
216. **Doulah, M. S.** 1977. Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. *Biotechnol Bioeng* **19**:649-60.
217. **Mason, T. J., and D. Peters.** 2002. Practical sonochemistry: Uses and applications of ultrasound, 2nd ed. Horwood Publishing, Chichester, West Sussex, UK.
218. **Heindl, P.** 2005. Einfluss einer Hochdruckbehandlung auf die Stabilität und Infektiosität von Prion-Proteinen. Universität Karlsruhe.
219. **Heremans, K.** 2005. Protein dynamics: hydration and cavities. *Braz J Med Biol Res* **38**:1157-65.
220. **Heremans, K., F. Meersman, H. Pfeiffer, P. Rubens, and L. Smeller.** 2000. Pressure effects on biopolymer structure and dynamics. *High Pressure Research* **19**:233 - 240.
221. **Van Eldik, T., T. Asano, and W. J. Le Noble.** 1989. Activation and reaction volumes in solution. *Chem. Rev.* **89**:549-688.
222. **Mozhaev, V. V., K. Heremans, J. Frank, P. Masson, and C. Balny.** 1994. Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends Biotechnol* **12**:493-501.
223. **Balny, C., and P. Masson.** 1993. Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International* **9**:611-628.
224. **Hummer, G., S. Garde, A. E. Garcia, M. E. Paulaitis, and L. R. Pratt.** 1998. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:1552-5.
225. **Cheung, J. K., P. Shah, and T. M. Truskett.** 2006. Heteropolymer collapse theory for protein folding in the pressure-temperature plane. *Biophys J* **91**:2427-35.
226. **Silva, J. L., and G. Weber.** 1993. Pressure stability of proteins. *Annu Rev Phys Chem* **44**:89-113.
227. **Salmon, E. D.** 1975. Pressure-induced depolymerization of spindle microtubules. I. Changes in birefringence and spindle length. *J Cell Biol* **65**:603-14.
228. **Balny, C.** 2004. Pressure effects on weak interactions in biological systems. *Journal of Physics Condensed Matter* **16**:1245-1253.
229. **Gross, M., and R. Jaenicke.** 1994. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur J Biochem* **221**:617-30.
230. **Heremans, K.** 1982. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annu Rev Biophys Bioeng* **11**:1-21.
231. **Brookman, J. S. G.** 1974. Mechanism of cell disintegration in a high pressure homogenizer. *Biotechnol. Bioeng.* **16**:371-383.
232. **Kastelein, J.** 1992. Risk assessment in industrial biotechnology. *Agro-Industry Hi-Tech*:26-28.
233. **Molina-Garcia, A. D.** 1999. Hydrostatic pressure in ultracentrifugation (revisited). *Progress in colloid & polymer science.*
234. **Marcum, J. M., and G. G. Borisy.** 1978. Sedimentation velocity analyses of the effect of hydrostatic pressure on the 30 S microtubule protein oligomer. *J Biol Chem* **253**:2852-7.
235. **Patel, C. N., S. M. Noble, G. T. Weatherly, A. Tripathy, D. J. Winzor, and G. J. Pielak.** 2002. Effects of molecular crowding by saccharides on alpha-chymotrypsin dimerization. *Protein Sci* **11**:997-1003.

236. **Fukushima, D.** 1969. Denaturation of soybean proteins by organic solvents. *Cereal Chem* **46**:156-163.
237. **Nahar, S., and H. A. Tajmir-Riahi.** 1996. Complexation of Heavy Metal Cations Hg, Cd, and Pb with Proteins of PSII: Evidence for Metal-Sulfur Binding and Protein Conformational Transition by FTIR Spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* **178**:648-656.
238. **Nebra, Y., J. Jofre, and A. R. Blanch.** 2002. The effect of reducing agents on the recovery of injured *Bifidobacterium* cells. *J Microbiol Methods* **49**:247-54.
239. **Rudolph, R., G. Böhm, H. Lilie, and R. Jaenicke.** 1997. Folding Proteins, p. 57-99. In T. E. Creighton (ed.), *Protein Function: A practical approach*. Oxford University Press.
240. **Achebach, S., T. Selmer, and G. Unden.** 2005. Properties and significance of apoFNR as a second form of air-inactivated [4Fe-4S]₂FNR of *Escherichia coli*. *FEBS J.* **272**:4260-9.
241. **Alouf, J. E., and J. H. Freer.** 1991. Sourcebook of bacterial protein toxins.
242. **Nozaki, M., H. Kagamiyama, and O. Hayaishi.** 1963. Crystallization and some properties of metapycroatechase. *Biochem Biophys Res Commun* **11**:65-9.
243. **Nakanishi, Y., S. Murakami, R. Shinke, and K. Aoki.** 1991. Induction, Purification, and Characterization of Catechol 2,3-Dioxygenase from Aniline-assimilating *Pseudomonas* sp. FK-8-2. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**:1281-1289.
244. **Demain, A. L., and S. N. Agathos.** 1986. Studies on in vivo inactivation of gramicidin S synthetase and its retardation. *Can J Microbiol* **32**:208-14.
245. **Itakura, M., and E. W. Holmes.** 1979. Human amidophosphoribosyltransferase. An oxygen-sensitive iron-sulfur protein. *J Biol Chem* **254**:333-8.
246. **Glomski, I. J., M. M. Gedde, A. W. Tsang, J. A. Swanson, and D. A. Portnoy.** 2002. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol* **156**:1029-38.
247. **Schuerch, D. W., E. M. Wilson-Kubalek, and R. K. Tweten.** 2005. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:12537-42.
248. **DasGupta, B. R., and W. Tepp.** 1991. Botulinum neurotoxin type A breaks down at pH 5.0 at the two Asp-Pro bonds of the heavy chain. *Abstr Soc Neurosci* **17**:1526.
249. **Booth, I. R.** 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* **49**:359-78.
250. **Wilks, J. C., and J. L. Slonczewski.** 2007. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J Bacteriol* **189**:5601-7.
251. **Cheng, J., A. A. Guffanti, and T. A. Krulwich.** 1994. The chromosomal tetracycline resistance locus of *Bacillus subtilis* encodes a Na⁺/H⁺ antiporter that is physiologically important at elevated pH. *J Biol Chem* **269**:27365-71.
252. **Krulwich, T. A., R. Agus, M. Schneier, and A. A. Guffanti.** 1985. Buffering capacity of bacilli that grow at different pH ranges. *J Bacteriol* **162**:768-72.
253. **Kießling, A.** 2004. Untersuchungen über das Vorkommen und die Verbreitung von Beta2-Toxin-bildenden *Clostridium perfringens*-Stämmen mittels Mono- und Multiplex-PCR. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
254. **Meer, R. R., and J. G. Songer.** 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res* **58**:702-5.
255. **Phan, T. T., H. D. Nguyen, and W. Schumann.** 2006. Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* **46**:189-95.
256. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
257. **Anagnostopoulos, C., and J. Spizizen.** 1961. Requirements For Transformation In *Bacillus Subtilis*. *J Bacteriol* **81**:741-6.
258. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
259. **Kyhn-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**:203-9.

260. **Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **7**:203-14.
261. **Laber, B., W. Maurer, S. Scharf, K. Stepusin, and F. S. Schmidt.** 1999. Vitamin B6 biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-L-threonine and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate by PdxA and PdxJ protein. *FEBS Lett* **449**:45-8.
262. **Bungert, S., B. Krafft, R. Schlesinger, and T. Friedrich.** 1999. One-step purification of the NADH dehydrogenase fragment of the *Escherichia coli* complex I by means of Strep-tag affinity chromatography. *FEBS Lett* **460**:207-11.
263. **Ilk, N., C. Vollenkle, E. M. Egelseer, A. Breitwieser, U. B. Sleytr, and M. Sara.** 2002. Molecular characterization of the S-layer gene, *sbpA*, of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 and production of a functional S-layer fusion protein with the ability to recrystallize in a defined orientation while presenting the fused allergen. *Appl Environ Microbiol* **68**:3251-60.
264. **Song, L., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux.** 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**:1859-66.
265. **Schmidt, T.** 2007. Fa. IBA, Göttingen, persönliche Kommunikation.
266. **Walter, S.** 2002. Structure and function of the GroE chaperone. *Cell Mol Life Sci* **59**:1589-97.
267. **Cronan, J. E., Jr.** 2001. The biotinyl domain of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. Evidence that the "thumb" structure is essential and that the domain functions as a dimer. *J Biol Chem* **276**:37355-64.
268. **Wang, W. W., D. Das, and M. R. Suresh.** 2005. Biotin carboxyl carrier protein co-purifies as a contaminant in core-streptavidin preparations. *Mol Biotechnol* **31**:29-40.
269. **James, G. T.** 1978. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal Biochem* **86**:574-9.
270. **Applichem.** 2009. Product Information PMSF, <http://www.applichem.com/en/products/product-detail/as/pmsf-ibiochemical/>.
271. **Schierack, P., M. Nordhoff, M. Pollmann, K. D. Weyrauch, S. Amasheh, U. Lodemann, J. Jores, B. Tachu, S. Kleta, A. Blikslager, K. Tedin, and L. H. Wieler.** 2006. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* **125**:293-305.
272. **Franklin, M. A., A. G. Mathew, J. R. Vickers, and R. A. Clift.** 2002. Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *J Anim Sci* **80**:2904-10.
273. **Untersperger, M.** 2009. Ferkelhaltung: Kampf dem Absetzdurchfall, *Der fortschrittliche Landwirt*.
274. **Stevens, D. L.** 2000. The pathogenesis of clostridial myonecrosis. *Int J Med Microbiol* **290**:497-502.
275. **Vuillard, L., T. Rabilloud, and M. E. Goldberg.** 1998. Interactions of non-detergent sulfobetaines with early folding intermediates facilitate in vitro protein renaturation. *Eur J Biochem* **256**:128-35.
276. **Sapp, M., C. Volpers, M. Muller, and R. E. Streeck.** 1995. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol* **76** (Pt 9):2407-12.
277. **Sapp, M., C. Fligge, I. Petzak, J. R. Harris, and R. E. Streeck.** 1998. Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J Virol* **72**:6186-9.
278. **Novy, R., and B. Morris.** 2001. Use of glucose to control basal expression in the pET System. in *Novations* **13**.
279. **Karl, U.** 2007. Fa. IBA, Göttingen, persönliche Kommunikation.
280. **Grossman, T. H., E. S. Kawasaki, S. R. Punreddy, and M. S. Osburne.** 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **209**:95-103.
281. **Sugimoto, N., Y. M. Chen, S. Y. Lee, M. Matsuda, and C. Y. Lee.** 1991. Pathodynamics of intoxication in rats and mice by enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A. *Toxicon* **29**:751-9.

-
282. **Reynolds, D., H. S. Tranter, and P. Hambleton.** 1986. Scaled-up production and purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *J Appl Bacteriol* **60**:517-25.
283. **Davidson, J.** 2010. Fa. Charles River Laboratories, persönliche Kommunikation.
284. **Ceci, L., P. Paradies, M. Sasanelli, D. de Caprariis, F. Guarda, M. T. Capucchio, and G. Carelli.** 2006. Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of *Clostridium perfringens* type A in the disease complex. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **53**:518-23.
285. **Giddings, K. S., A. E. Johnson, and R. K. Tweten.** 2003. Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:11315-20.
286. **Awad, M. M., D. M. Ellemor, R. L. Boyd, J. J. Emmins, and J. I. Rood.** 2001. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Infect Immun* **69**:7904-10.

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

10.1 Abbildungen

Abbildung 1: Klonierungsstrategien für pGEM-T- <i>cpb</i> , pHIT-Vlc-42, -40 und -45	41
Abbildung 2: Klonierungsstrategien für pHIT-Vlc-46, -47, -48 und -49	42
Abbildung 3: Klonierungsstrategien für pHIT-Vlc-50 und -51	43
Abbildung 4: Darstellung des Beta-Toxingens in PCR-Produkt bzw. in Restriktions- und Aufreinigungsprodukt von pGEM [®] -T:: <i>cpb</i> mittels Agarosegelelektrophorese	51
Abbildung 5: Darstellung des linearisierten pASK-IBA5plus in Restriktions- und Aufreinigungsprodukt mittels Agarosegelelektrophorese	52
Abbildung 6: Darstellung der <i>cpb</i> - (interne PCR) bzw. vektor-spezifischen (externe PCR) Amplifikate von GVO TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42)-Klonen mittels Agarosegelelektrophorese	52
Abbildung 7: Vergleich der <i>cpb</i> -Sequenzen von <i>E. coli</i> TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42), <i>C. perfringens</i> CPC-Cph1 [71] und der Referenzsequenz aus <i>C. perfringens</i> NCTC 8533 [27]	53
Abbildung 8: Darstellung von rekombinantem Beta-Toxin in Aufreinigungsprodukten von Lysaten des induzierten TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42) durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	54
Abbildung 9: Darstellung des rekombinanten Beta-Toxins in Lysaten und Aufreinigungsprodukten von induziertem TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42) mittels <i>Strep</i> -Tag® II-Western Blot	55
Abbildung 10: Detektion Beta-Toxin-spezifischer Epitope in Aufreinigungsprodukten von induziertem TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-42) mittels Bio-X Enterotoxämie ELISA Kit	56
Abbildung 11: Transformationsansätze von Rosetta-Gami 2 und TOP10F ⁺ mit pHIT-Vlc-48 und -49 auf LBA mit unterschiedlichen Zusätzen	58
Abbildung 12: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-45)-Klone aus der <i>cpb2</i> - (574 bp) bzw. vektorspezifischen (933 bp) PCR	59
Abbildung 13: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-46)-Klone aus der <i>cpb2</i> - (574 bp) bzw. vektorspezifischen (919 bp) PCR	60
Abbildung 14: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-47)-Klone aus der <i>cpb2</i> - (574 bp) bzw. vektorspezifischen (972 bp) PCR	60

Abbildung 15: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-48)-Klone aus der <i>cpb2</i> - (574 bp) bzw. vektorspezifischen (894 bp) PCR.....	61
Abbildung 16: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-49)-Klone aus der <i>cpb2</i> - (574 bp) bzw. vektorspezifischen (908 bp) PCR.....	61
Abbildung 17: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-50)-Klone aus der <i>cpb2</i> - (574 bp) bzw. vektorspezifischen (1160 bp) PCR.....	62
Abbildung 18: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50)-Klone aus der <i>cpb2</i> - (574 bp) bzw. vektorspezifischen (1160 bp) PCR.....	62
Abbildung 19: Darstellung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikaten potentieller WB800N-(pHIT-Vlc-51)-Klone aus der <i>cpb2</i> - (574 bp) bzw. vektorspezifischen (1047 bp) PCR.....	64
Abbildung 20: Coomassie- und Silber-Färbung des in der SDS-PAGE aufgetrennten, konzentrierten Kulturüberstandes von induziertem WB800N-(pHIT-Vlc-51).....	65
Abbildung 21: Darstellung des rBeta2-Toxins in den mittels SDS-PAGE aufgetrennten Aufreinigungsprodukten der induzierten <i>E. coli</i> -Transformanten mittels Coomassie-Färbung.....	66
Abbildung 22: Darstellung des rBeta2-Toxins in den Aufreinigungsprodukten induzierter <i>E. coli</i> -Transformanten mittels <i>Strep</i> -Tag® II-Western und Immunblot.....	68
Abbildung 23: Darstellung des rBeta2-Toxins in den Aufreinigungsprodukten induzierter Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) mittels <i>Strep</i> -Tag® II-Western und Immunblot.....	68
Abbildung 24: Darstellung des rBeta2-Toxins im konzentrierten Kulturüberstand des induzierten WB800N-(pHIT-Vlc-51) mittels Immunblot.....	69
Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der Bindungsaffinitäten der rBeta2-Toxine aus TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-40), -(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46) und -(pHIT-Vlc-47) im 2-4A5-Fangantikörper-ELISA.....	70
Abbildung 26: Vergleichende Darstellung der Bindungsaffinitäten der rBeta2-Toxine aus TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-45) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) im 2-4A5-Fangantikörper-ELISA.....	71
Abbildung 27: Relative Aktivität von Caco-2-Zellen nach Inkubation mit rBeta2-Toxin aus TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-40) und -(pHIT-Vlc-45) im MTT-Test.....	72
Abbildung 28: Relative Aktivität von IPEC-J2-Zellen nach Inkubation mit rBeta2-Toxin aus TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-40), -(pHIT-Vlc-45), -(pHIT-Vlc-46) und -(pHIT-Vlc-47) im MTT-Test.....	72

Abbildung 29: Relative Aktivität von Caco-2-Zellen nach Inkubation mit 50 µg rBeta2-Toxin aus TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-45) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) im MTT-Test	73
Abbildung 30: Relative Aktivität von IPEC-J2-Zellen nach Inkubation mit 50 µg rBeta2-Toxin aus TOP10F ⁻ -(pHIT-Vlc-45) und Rosetta-Gami 2-(pHIT-Vlc-50) im MTT-Test	73
Abbildung 31: Relative Aktivität von Caco-2-Zellen nach Inkubation mit rBeta2-Toxin-haltigen Produkten von WB800N-(pHIT-Vlc-51) im MTT-Test	74
Abbildung 32: Relative Aktivität von IPEC-J2-Zellen nach Inkubation mit rBeta2-Toxin-haltigen Produkten von WB800N-(pHIT-Vlc-51) im MTT-Test	74

10.2 Tabellen

Tabelle 1:	Übersicht über die in der Literatur beschriebenen, rekombinant exprimierten Beta2-Toxine	8
Tabelle 2:	Vor- und Nachteile der Expressionskompartimente von <i>E. coli</i> [140]	17
Tabelle 3:	Überblick über die Eigenschaften wichtiger Affinitätsanhängsel [174]	20
Tabelle 4:	Überblick über die verwendeten Bakterienstämme	29
Tabelle 5:	Überblick über die verwendeten gentechnisch veränderten Organismen	30
Tabelle 6:	Übersicht über die für die Amplifikation der Toxingene im Rahmen der Klonierung eingesetzten Primer und Templates	31
Tabelle 7:	Übersicht über die zur Transformantenüberprüfung verwendeten Primer	32
Tabelle 8:	Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die PCR	35
Tabelle 9:	Übersicht über die Temperaturverläufe in den durchgeführten PCRs	36
Tabelle 10:	Übersicht über die durchgeführten Restriktionsversuche zur Gewinnung von Insert-DNA	37
Tabelle 11:	Übersicht über die durchgeführten Restriktionsversuche zur Gewinnung von Vektor-DNA	37
Tabelle 12:	Übersicht über die durchgeführten Ligationsversuche	38
Tabelle 13:	Übersicht über die teilsequenzierten Plasmide und die verwendeten Sequenzierungsprimer	40
Tabelle 14:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE	45
Tabelle 15:	Zur Renaturierung von rekombinantem Beta2-Toxin aus TOP10F ⁺ -(pHIT-Vlc-40) verwendete Puffer	47
Tabelle 16:	Übersicht über die Ergebnisse der mit dem rekombinantem Beta-Toxin an BALB/c- und NMRI-Mäusen durchgeführten Belastungsversuche	57
Tabelle 17:	Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der rekombinanten Beta2-Toxine mit der Referenzsequenz	63
Tabelle 18:	Übersicht über die mit den rekombinanten Beta2-Toxinen durchgeführten Belastungsversuche	75
Tabelle 19:	Überblick über die gewonnenen rekombinanten Toxine, ihre Nachweisbarkeit und ihre Toxizität	76
Tabelle 20:	Verwendete Nährmedien, Lösungen und Puffer	92
Tabelle 21:	Verwendete Reagenzien und Materialien	96
Tabelle 22:	Verwendete Geräte	97

DANKSAGUNG

Jeder Mitarbeiter des Instituts hat auf seine Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen und mich nach seinen Möglichkeiten unterstützt. Deshalb gilt auch allen mein herzlicher Dank! Alle waren stets hilfsbereit, das Arbeitsklima war herausragend und ich habe mich innerhalb kürzester Zeit als Teil einer großen Gemeinschaft begriffen.

Eine solche Atmosphäre ist sicherlich Hauptverdienst der Institutsleitung. Natürlich danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer außerdem für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung insbesondere auch bei der Finanzierung. Auch wenn es vielleicht nicht in seinem Interesse liegt würde ich mich freuen, wenn sich die Berufung seines Nachfolgers verzögert und er dem Institut noch eine Weile als Leiter erhalten bleibt.

Meiner Betreuerin Dr. Heike Schoepe möchte ich ganz herzlich für ihre Anleitung und Unterstützung danken, die sie mir auch nach ihrem Weggang nicht verwährte. Ihre manchmal genialen Geistesblitze haben die ein oder andere scheinbar auswegslose Situation erhellte!

Alexa Sommer möchte ich für die Einarbeitung danken. Sie hat mir in den ersten Monaten viel Zeit geopfert und sich nur selten von meinen nervigen Fragen aus der Ruhe bringen lassen.

Dr. Hermann Willems hat mit der Erzeugung eines ersten Expressionsklons die Basis für meine Arbeiten geschaffen. Besonderer Dank gilt ihm vor allem aber für die Unterstützung bei der Generierung immer neuer Primer. Ohne ihn macht „Oligo“ einfach keinen Spaß.

Dr. Melanie Moor war ein große Hilfe bei den Zellkulturversuchen. Ich danke ihr dafür, dass sie jedes Mal mitgelitten hat, wenn sich die Zellen von einem neuen Toxin unbeeindruckt zeigten.

Dr. Judith Tyczka hatte für mich jederzeit ein offenes Ohr und einen köstlichen Kaffee. Selbst die Anschaffung einer Saeco-Kaffeemaschine konnte mich über ihren Weggang nicht hinwegtrösten.

Dr. Reinhard Weiß war immer da, wenn ich mal Unterstützung oder Hilfe brauchte. Selbst wenn er eigentlich überhaupt keine Zeit hatte!

Immer wenn sich Office-Programme widerspenstig zeigten wusste Dr. Stefanie Barth die rettende Tastenkombination!

Sabine Grölz-Krug hat mir gezeigt wo der Hase lang läuft und ihn auch mal gehalten, wenn er immunisiert wurde. Sie, Gabriele Köpf und Anja Schwanitz haben mir im Labor den ein oder anderen Kniff gezeigt und hierdurch den praktischen Teil meiner Arbeit sicherlich um ein paar Monate verkürzt. Auch wenn das an der Gesamtdauer gemessen kaum ins Gewicht fällt möchte ich ihnen aufs herzlichste Danken.

Dankbar bin ich auch den Mitarbeitern der IBA GmbH, Herrn Dr. Schmidt, Herrn Dr. Karl und besonders Herrn Dr. Terpe, die mir unermüdlich Fragen beantwortet haben und zur Lösung von Problemen auch einmal bereit waren finanzielle Fragen auszublenken und unkonventionell zu helfen.

Den Impfstoffwerken Dessau-Tornau möchte ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes danken, auch wenn sie leider vor Projektende versiegte.

Prof. Dr. Wolfgang Schumann, Universität Bayreuth, danke ich für seine Unterstützung bei der Generierung des *B. subtilis*-Klons. Sein Fachwissen und seine Kontakte haben mir sehr geholfen.

Abschließend möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich abseits der Arbeit unterstützt haben.

Bei meinen Eltern, die meine verlängerte finanzielle Abhängigkeit großzügig toleriert haben. Ohne Ihren Rückhalt hätte ich mich auf das Abenteuer Promotion gar nicht erst eingelassen.

Bei meinem Bruder, der mir eigentlich erst in den Jahren meiner Doktorarbeit ein echter Freund geworden ist.

Bei meiner Freundin Geraldine, die für mich immer da war, wenn ich sie brauchte und mir die Kraft gegeben hat auch härtere Zeiten zu meistern.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Carsten Heydel

ISBN 978-3-86345-003-8



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.de>