

Westfälische Wilhelms-Universität  
Institut für Infektiologie  
Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE)

**Orale Immunisierung mit rekombinanten *Escherichia coli* NISSLE 1917:  
Charakterisierung der humoralen Immunantwort gegen Oberflächen-  
exprimierte heterologe Antigene aus *Borrelia burgdorferi* und  
*Listeria monocytogenes***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Christian Buddenberg

Münster, 2005

**Dekan:** Prof. Dr. A. Steinbüchel

**Ester Gutachter:** Prof. Dr. M.A. Schmidt

**Zweiter Gutachter:** Prof. Dr. V. Gerke

**Tag der mündlichen Prüfungen:** 19.04.05

**Tag der Promotion:** 22.04.05

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	1
<b>2. Einleitung</b>	3
2.1 Das Immunsystem des Darms	4
2.2 Mukosale Vakzinierung	7
2.3 Das Bakterium <i>E. coli</i> NISSLE 1917	9
2.4 Der AIDA-Autotransporter als Werkzeug zur Präsentation heterologer Antigene	10
2.5 Verwendete Antigene	12
2.5.1 OspA und OspG aus <i>Borrelia burgdorferi</i>	12
2.5.2 Das p60 Protein aus <i>Listeria monocytogenes</i>	15
2.6 Zielsetzung	16
<b>3. Material und Methoden</b>	17
3.1 Verwendete Bakterienstämme	17
3.2 Verwendete Versuchstiere	17
3.3 Plasmide und Oligonukleotide	18
3.4 Antikörper und Antiseren	20
3.5 Stammlösungen, Puffer und Medien	22
3.5.1 Kulturmedien für Bakterien	22
3.5.2 Verwendete Antibiotika	23
3.6 Enzyme	23
3.7 Geräte	24
3.8 Arbeiten mit Bakterien	25
3.8.1 Flüssigkulturen	25
3.8.2 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen	25
3.8.3 Bestimmung der Zellzahl	25
3.8.4 Herstellung elektrokompeter Bakterien	26
3.8.5 Elektroporation kompetenter Bakterien mit Fremd-DNA	26
3.8.6 Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterien	27
3.8.7 Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Bakterien mit Fremd-DNA	27
3.9 Molekularbiologische Methoden	28
3.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	28
3.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Fäces	28
3.9.3 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel	28
3.9.4 Restriktion	29
3.9.5 Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA	29
3.9.6 Ligation	30
3.9.7 TA-Klonierung	30
3.9.8 Konzentrationsbestimmung von gereinigter DNA	32
3.9.9 Gelelektrophoretische Trennung von DNA	32
3.9.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
3.9.11 <i>E. coli</i> NISSLE 1917-spezifische PCR-Reaktion	34
3.10 Analyse und Präparation von Proteinen	35
3.10.1 Gesamtzellproteine aus <i>Escherichia coli</i>	35
3.10.2 Isolierung von Fusionsproteinen mit His <sub>6</sub> -tag	36
3.10.3 Proteinbestimmung	37
3.10.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
3.10.5 Färbung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel	39
3.10.6 Immunochemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	40
3.10.6.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	40

3.10.6.2	Färben der PVDF-Membran.....	41
3.10.6.3	Trocknen der PVDF-Membran .....	41
3.10.6.4	Immunochemischer Nachweis der immobilisierten Proteine.....	41
3.10.7	Immunofluoreszenzanalysen.....	42
3.10.8	Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen .....	43
3.11	Immunologische Arbeiten .....	44
3.11.1	Arbeiten mit den Versuchstieren.....	44
3.11.2	Entnahme der Blutproben.....	44
3.11.3	Entnahme der Speichelproben.....	45
3.11.4	Aufbereitung der Blutproben .....	45
3.11.5	Aufbereitung der Speichelproben.....	45
3.11.6	Mukosale Immunisierung.....	46
3.11.7	Intraperitoneale Immunisierung mit rekombinanten Proteinen .....	47
3.11.8	ELISA ( <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> ).....	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
4.1	Konstruktion der oralen Lebendvektoren.....	50
4.1.1	Verwendete Antigene .....	50
4.1.2	Konstruktion der Immunisierungsplasmide .....	51
4.2	Analyse der oralen Lebendvektoren.....	56
4.3	Analyse des Wachstums der Lebendvektoren.....	62
4.4	Klonierung und Isolierung von Fusionsproteinen mit His <sub>6</sub> -tag .....	64
4.5	Intraperitoneale Immunisierung mit rekombinanten Antigenen .....	66
4.6	Durchführung der oralen Immunisierungsstudie.....	69
4.7	Etablierung der <i>E. coli</i> NISSLE 1917-spezifischen PCR .....	70
4.7.1	Optimierung der <i>E. coli</i> NISSLE-spezifischen PCR.....	71
4.7.2	Sensitivität der PCR zum Nachweis von <i>E. coli</i> NISSLE 1917.....	72
4.7.3	Kontrolle der Besiedlung der Versuchstiere mit <i>E. coli</i> NISSLE 1917 .....	73
4.8	Analyse der Immunantworten .....	80
4.8.1	Etablierung der ELISA.....	80
4.8.2	ELISA-Ergebnisse.....	80
4.8.2.1	Systemische Immunantwort nach oraler Immunisierung.....	80
4.8.2.2	Mukosale Immunantwort .....	85
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>87</b>
5.1	Konstruktion der oralen Lebendvektoren.....	90
5.2	Analyse des Wachstums der Lebendvektoren.....	91
5.3	Intraperitoneale Immunisierung mit rekombinanten Antigenen .....	92
5.4	Besiedlung der Versuchstiere mit <i>E. coli</i> NISSLE 1917 .....	93
5.5	Analyse der Immunantworten .....	95
5.6	Ausblick .....	97
<b>6.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>110</b>

## 1. Zusammenfassung

Im Verlauf der Evolution haben alle höheren Lebewesen komplexe und effiziente Abwehrmaßnahmen entwickelt, um sich vor Angriffen von Pathogenen zu schützen. Die Schleimhautoberflächen des Körpers sind besonders anfällig für Infektionen und es ist nicht überraschend, dass die große Mehrzahl von Infektionserregern über diese Route in den Körper eindringt. Das Immunsystem der Schleimhäute, das *mucosa-associated lymphoid tissue* (MALT), schützt diese besonders gefährdeten Stellen des Körpers vor der Besiedlung und Invasion durch Pathogene. Obwohl das MALT in den meisten Fällen in der Lage ist, pathogene Organismen erfolgreich zu bekämpfen, gibt es jedoch Krankheitserreger, die vom Immunsystem überhaupt nicht oder nur in seltenen Fällen erfolgreich abgetötet werden. Im Verlauf der Pathogenese kann es zu schweren Schädigungen des Wirtsorganismus kommen, so dass eventuell bleibende Schäden zurückbleiben, die die Lebensqualität der Betroffenen einschränken. Aus diesen Gründen wäre ein bestehender Immunschutz schon vor dem ersten Kontakt mit einem Pathogen ein probates Mittel, um eine Erkrankung und die eventuell damit verbundenen Komplikationen und nachfolgenden Schäden zu verhindern. Der überwiegende Teil der zur Zeit verwendeten Vakzine wird jedoch parenteral appliziert und induziert eine hauptsächlich systemische und keine mukosale Immunantwort. Eine mukosale Immunisierung über die orale Route hingegen würde nicht nur die Schleimhäute schützen, sondern auch eine systemische Immunantwort induzieren und stellt dabei die einfachste und am ehesten akzeptable Methode dar. Hierzu können zum Beispiel attenuierte Pathogene als Lebendvektoren eingesetzt werden. Der Einsatz solcher Mikroorganismen ist jedoch mit Risiken verbunden, da die Möglichkeit einer Reversion besteht. Als Alternative bietet sich der Gebrauch von apathogenen, kommensalen Bakterien an. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Lebendvektor-System zur oralen Immunisierung entwickelt, das aus dem apathogenen, probiotischen *E. coli* Stamm NISSLE 1917 besteht. Mit Hilfe des AIDA-Autotransporters wurden die äußeren Membranproteine OspA und OspG aus *Borrelia burgdorferi* bzw. p60 aus *Listeria monocytogenes* auf der Oberfläche von *E. coli* NISSLE 1917 präsentiert. Nach oraler Immunisierung der Versuchstiere wurden die spezifischen humoralen Immunantworten gegen die verwendeten Antigene in Serum und Speichel mit Hilfe eines Endpunkt-ELISA analysiert. Die Immunisierung mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917, die OspA bzw. OspG auf ihrer Oberfläche präsentierten, führte zu einer Erhöhung der Antigen-spezifischer Antikörpertiter im Serum. Auch konnten spezifische Antikörper gegen OspG im Speichel der immunisierten Versuchstiere nachgewiesen werden. Eine Immunisierung mit p60-

---

präsentierenden *E. coli* NISSLE 1917 führte zu keiner spezifischen Immunantwort gegen dieses Protein. Dies ist wahrscheinlich auf die sehr schwache Expression des Proteins in diesem Bakterienstamm zurückzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der probiotische *E. coli* Stamm NISSLE 1917, zusammen mit dem AIDA-Autotransporter, ein geeignetes System zur oralen Immunisierung darstellt.

## 2. Einleitung

Alle höheren Lebewesen sind in ihrer Umwelt einer Vielzahl von Mikroorganismen und potenziellen Pathogenen ausgesetzt. Im Verlauf der Evolution haben sie deshalb komplexe und effiziente Abwehrmaßnahmen entwickelt, um sich zu schützen. Eine erste und effektive Barriere zum Schutz vor Pathogenen stellt die Haut dar. Beim Menschen bildet die oberste Schicht aus abgestorbenen Keratinocyten eine physikalische Grenze, die Mikroorganismen in der Regel nur bei Verletzung überwinden können. Weiteren Schutz bieten auch die geringe Feuchtigkeit der Haut, ihr saurer pH-Wert von ungefähr 5,0 und das Vorhandensein von antimikrobiell wirkenden Peptiden, wie zum Beispiel Defensinen, S100-Proteinen, Cathelicidinen, Dermicidinen und Adrenomedullinen. Diese Proteine besitzen sowohl bakterizide, als auch fungizide Eigenschaften und sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass im Durchschnitt  $10^5$  Mikroorganismen pro Quadratmillimeter Haut nachgewiesen werden können [HARDER & SCHRÖDER, 2005]. Die Besiedlung der Haut mit Kommensalen bietet zusätzlich Schutz vor Pathogenen, da diese die ökologische Nische in der Haut besetzen und dadurch eine Ansiedlung und Ausbreitung schädlicher Keime verhindern können.

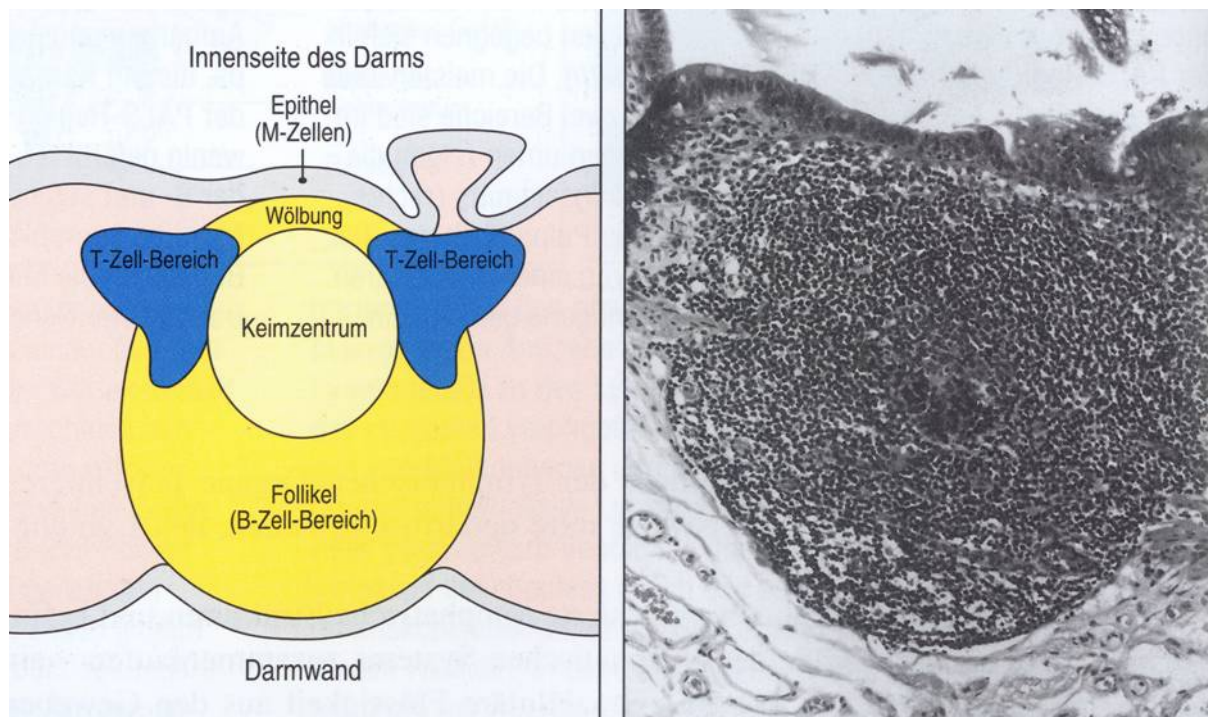
Bei einem Organismus handelt es sich jedoch nicht um ein geschlossenes System und zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels ist ein Austausch von verschiedenen Substanzen, wie zum Beispiel Gasen und Nährstoffen, essentiell. Dieser Austausch geschieht an den Schleimhäuten. Die Schleimhautoberflächen des Körpers sind besonders für Infektionen anfällig, da sie aufgrund ihrer physiologischen Funktionen wie zum Beispiel Gasaustausch (Lungen), Nahrungsaufnahme (Darm), Sinneswahrnehmung (Mund, Rachen, Nase, Auge) und Reproduktion (Uterus, Vagina) nur dünne und zusätzlich durchlässige Barrieren auf dem Weg ins Körperinnere bilden [JANEWAY *et al.* 2002]. Aufgrund der Exposition und Funktionen dieser Oberflächen ist es nicht überraschend, dass die große Mehrzahl von Pathogenen versucht, über diese Route in den Körper einzudringen. Im Verlauf der Evolution hat sich daher ein spezielles Kompartiment des Immunsystems zum Schutz der Schleimhäute entwickelt, das mukosale Immunsystem. Besondere Bedeutung besitzt das Immunsystem des Darms. Mit einer Oberfläche von  $200 \text{ m}^2$  bietet die Darmmukosa ausreichend Lebensraum für eine Vielzahl von Bakterien und es wird geschätzt, dass im Darm ungefähr  $10^{14}$  Bakterien leben, die ca. 500 Arten zuzurechnen sind [LU & WALKER, 2001; BERG, 1996].

## 2.1 Das Immunsystem des Darms

Das Immunsystem des Darms umfasst sowohl Komponenten des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems zählen die Anwesenheit von Verdauungsenzymen, eine Mukusschicht über der Mukosa, die von den meisten Mikroorganismen nicht überwunden werden kann [FREY *et al.*, 1996] und die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden durch die Epithelzellen, wie zum Beispiel Defensine, Cecropine und Lactoferrine [AYABE *et al.*, 2000; O'NEIL *et al.*, 1999]. Weiterhin sind die Epithelzellen bei Kontakt mit Mikroorganismen in der Lage, Chemokine (z.B. IL-8) auszuschütten und somit Phagozyten und professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) anzulocken [KAGNOFF, 1996]. Die rekrutierten Monocyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen sezernieren wiederum Chemokine und Cytokine, wodurch weitere Lymphocyten zum Infektionsherd gelockt werden und die Pathogene bekämpfen. Auf diese Weise wirken die Epithelzellen als Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem des Darms. Die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr bezieht die Erkennung von typischen molekularen Mustern der Mikroorganismen durch Rezeptoren mit ein, die von den Epithelzellen entweder sezerniert werden oder sich auf deren Oberfläche befinden. Bei den molekularen Mustern oder MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) handelt es sich zum Beispiel um Peptidoglykane, Lipopolysaccharide, Lipoproteine und Teichonsäuren. Da die verschiedenen Mikroorganismen (grampositive und gramnegative Bakterien, Mykobakterien und Pilze) unterschiedliche MAMPs exprimieren, ermöglicht eine Erkennung dieser Muster dem Immunsystem, Informationen über die Art und die potentielle Pathogenität der Mikroorganismen zu erhalten [DIDIERLAURENT *et al.*, 2002].

Neben dem angeborenen Immunsystem spielt das adaptive Immunsystem des Darms eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion und der Abwehr von Pathogenen. Die Bedeutung dieses Systems wird deutlich, wenn man bedenkt, dass schätzungsweise 70% aller Lymphocyten des Körpers in intra- und subepithelialen Geweben des Darm konzentriert sind [DIDIERLAURENT *et al.*, 2002]. Die adaptive Immunantwort erfolgt durch Zellen, die als *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) organisiert sind (Abb. 2.1). Damit es zur Induktion einer Immunantwort kommt, müssen Antigene aus dem Darmlumen in Kontakt mit Zellen des GALT kommen. Es gibt drei unterschiedliche Wege, wie Antigene die Epithelschicht des Darms überwinden: (1.) der absorptive Weg über die Enterocyten, (2.) mit Hilfe von M-Zellen und (3.) durch dendritische Zellen [NEUTRA *et al.*, 2001].





**Abb. 2.1:** Charakteristischer Aufbau des GALT. Wie die Zeichnung (links) zeigt, besteht der größte Teil des Gewebes aus B-Zellen. Diese bilden einen großen und gewölbten hochaktiven Follikel. In den Bereichen zwischen den Follikeln befinden sich T-Zellen. Antigene gelangen durch M-Zellen in das Gewebe. Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt einen Schnitt durch die Darmwand. Die Wölbung aus lymphatischem Gewebe ist unter dem Epithelgewebe sichtbar. Vergrößerung x 16. Aus JANEWAY *et al.* [2002].

Die Aufnahme von Antigen erfolgt bei Enterocyten durch vorherige Rezeptorbindung oder durch nicht-absorptive Endocytose. Nach erfolgter Prozessierung durch die Enterocyten werden die Antigene mit Hilfe von konventionellen und nichtkonventionellen MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Molekülen den intraepithelialen Lymphocyten (IEL) präsentiert [BÜNING *et al.*, 2005; SHAO *et al.*, 2001; KAISERLIAN, 1999; CHRIST & BLUMBERG, 1997]. Da die Enterocyten jedoch keine kostimulatorischen Moleküle wie zum Beispiel Proteine der B7-Familie oder CD40 exprimieren, wird angenommen, dass dieser Weg eher zu einer Suppression als zur Aktivierung von naiven T-Zellen führt [HERSHBERG *et al.*, 1997].

Der zweite Weg der Antigenaufnahme erfolgt mit Hilfe der M-Zellen (Abb. 2.2). M-Zellen sind Bestandteile des *follicle-associated epithelium* (FAE), welches sich sowohl phänotypisch, als auch funktionell vom Rest des übrigen Darmepithels unterscheidet. Im FAE befinden sich nur wenige Mukus produzierende Zellen und auch Paneth-Zellen, welche Defensine und Lysozym sezernieren [GIANNASCA *et al.*, 1994]. Weitere Eigenschaften sind das Fehlen von Poly-Ig-Rezeptoren [PAPPO & OWEN, 1988] und eine geringe Expression von

Membran-gebundenen Hydrolasen [OWEN & BHALLA, 1983]. All dies fördert den lokalen Kontakt von intakten Antigenen mit der Oberfläche des FAE.



**Abb.2.2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer M-Zelle. Im Gegensatz zu den benachbarten Enterocytten besitzen M-Zellen keinen regelmäßigen Mikrovillisaum. Deutlich ist ein Lymphocyt in der intraepithelialen Tasche zu erkennen. Vergrößerung 7500 x. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Frau Lilo Greune zur Verfügung gestellt.

M-Zellen sind spezialisiert für die Aufnahme von partikulären Antigenen aus dem Darmlumen und den Transport zu dem darunter liegendem lymphatischen Gewebe [NEUTRA *et al.*, 1996; NEUTRA & KRAEHENBUHL, 1992]. Morphologisch unterscheiden sich die M-Zellen von den übrigen Enterocytten durch das Fehlen eines regelmäßigen Mikrovillisaumes und einer ausgeprägten Glykokalyx. Eine weitere Besonderheit der M-Zellen ist das Vorhandensein einer so genannten intraepithelialen Tasche, in der sich Lymphocyten befinden. Diese entsteht durch starke Invagination der basolateralen Membran. Die Aufnahme von Antigenen erfolgt durch (Makro-)Pinocytose und Phagocytose. Nach anschließender

Transcytose gelangen die Antigene in die Tasche und kommen so mit den dort lokalisierten Lymphocyten in Kontakt, wodurch in der Regel eine adaptive Immunantwort induziert wird.

Der dritte Weg der Antigenaufnahme wird über dendritische Zellen vermittelt. Dieser Zelltyp ist spezialisiert auf die Präsentation von Antigenen gegenüber naiven T-Lymphocyten. RESCIGNO *et al.* [2001] konnten zeigen, dass dendritische Zellen in der Lage sind, zwischen die Epithelzellen zu wandern und die *tight junctions* zu öffnen, die das Epithel versiegeln. Mit Hilfe ihrer langen Fortsätze, den Dendriten, die sie zwischen die Epithelzellen in das Darmlumen schieben, sind sie in der Lage Antigene von dort aufzunehmen. Dendritische Zellen sind auch an der Aufnahme von Antigenen beteiligt, die über die M-Zell-Route das Epithel überwunden haben. Anschließend wandern sie in die *Lamina propria* und/oder Lymphknoten [HUANG *et al.*, 2000].

## 2.2 Mukosale Vakzinierung

Da die Schleimhäute aufgrund ihrer physiologischen Funktionen dünne und durchlässige Barrieren darstellen, ist es nicht überraschend, dass eine große Zahl von Pathogenen diese Gewebe besiedeln und als Eintrittspforten in das Körperinnere nutzen. So benutzen zum Beispiel enteroinvasive Bakterien der Gattungen *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* M-Zellen, um das Darmepithel zu überwinden und darunter liegende Gewebe zu besiedeln [SANSONETTI *et al.*, 1999]. Eine mukosale Immunsierung würde zu einer Aktivierung des Immunsystems der Schleimhäute führen und somit einen Schutz vor Pathogenen bieten, die über die Mukosa versuchen, den Körper zu besiedeln. Im Gegensatz zu parenteral applizierten Vakzinen bietet eine mukosale Immunisierung den Vorteil, dass neben der angestrebten mukosalen Immunantwort auch eine deutliche systemische Immunantwort induziert wird. Trotz mehrerer Ansätze in den vergangenen Jahrzehnten wird die überwiegende Zahl der heute verfügbaren Vakzine jedoch immer noch systemisch appliziert, wobei neben dem Fehlen der mukosalen Immunität auch ein Risiko der Verbreitung von Infektionen durch kontaminierte Spritzen und Kanülen besteht. Eine mukosale Vakzinierung über die orale Route stellt sicherlich die einfachste Methode dar. Die Vorteile oraler Vakzine liegen in der Verabreichung über eine nicht invasive Route und ein damit verbundenes geringes Risiko von Infektionen. Sie sind relativ kostengünstig in der Herstellung, sicher und gelangen direkt an ihren Wirkungsort, der Darmmukosa. Dazu muss das verwendete Antigen partikulär vorliegen, da eine Vakzine in löslicher Form über die Enterocyten aufgenommen würde, welches wiederum eher zu einer Suppression, als zu einer Aktivierung des Immunsystems des Darms führen würde. Im

Gegensatz dazu werden partikuläre Antigene in erster Linie durch die M-Zellen aufgenommen. Antigene könnten zum Beispiel in Mikropartikel verpackt oder an diese gekoppelt werden. Dadurch würde vermieden, dass diese durch Enterocyten aufgenommen werden, da diese Zellen, im Gegensatz zu M-Zellen, welche Partikel mit einer Größe von 30-300 nm aufnehmen können [FREY *et al.*, 1996], nicht in der Lage sind, Partikel mit einem Durchmesser von mehreren Nanometern aufzunehmen [ERMAK *et al.*, 1995; ELDRIDGE *et al.*, 1991; O'HAGAN *et al.*, 1989]. Ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass die Partikel auf dem Weg zu den M-Zellen im Mukus eingeschlossen werden könnten und somit nicht mehr die M-Zellen erreichen [FREY *et al.*, 1996].

Eine Alternative zum Gebrauch von Mikropartikeln ist die Verwendung „selbstreplizierender Vakzine“ als Lebendimpfstoffe zur oralen Immunisierung. Die Vorteile liegen in der einfachen und kostengünstigen Produktion und der unkomplizierten Lagerung, da die Bakterien gefriergetrocknet werden können und somit auch auf eine Kühlkette verzichtet werden kann. In der Regel werden attenuierte Pathogene als Lebendvektoren eingesetzt, da sie zusätzlich meist über gute Eigenschaften als Adjuvant verfügen [KOTTON & HOHMANN, 2004; HANTMAN *et al.*, 1999]. Nachteile bestehen jedoch in einer möglichen Reversion der Pathogenität durch Mutation oder horizontalen Gentransfer und auch darin, dass nicht alle Individuen gleich auf eine Immunisierung mit solchen Bakterien reagieren. So kommt es bei einigen Personen zur Ausbildung von Krankheitssymptomen, während andere die Immunisierung gut vertragen. Auch der Grad der Attenuierung ist von entscheidender Bedeutung für eine Bewertung eines Bakterienstammes für eine mögliche erfolgreiche Immunisierung. Eine zu starke Attenuierung führt eventuell zum Verlust der immunogenen Eigenschaften und ein zu wenig attenuiertes Pathogen kann möglicherweise Krankheitssymptome hervorrufen. Entscheidend ist die Balance zwischen Attenuierung und Immunogenität [HOHMANN *et al.*, 1996]. Zur Zeit sind international nur drei bakterielle Lebendvakzine kommerziell erhältlich und auch im klinischen Gebrauch: *Salmonella enterica* Serovar Typhi Ty21a, *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR und *Mycobacterium bovis* BCG [KOTTON & HOHMANN, 2004].

Eine Möglichkeit die Vorteile einer bakteriellen Lebendvakzine zu nutzen, ohne jedoch den Risiken bei der Verwendung von attenuierten Pathogenen ausgesetzt zu sein, besteht darin, apathogene, kommensale Bakterien für eine mukosale Immunisierung zu gebrauchen. So wurden zum Beispiel rekombinante *Streptococcus gordonii*, *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus* spp. erfolgreich als Vektoren für eine mukosale Immunisierung eingesetzt [BOLKEN *et al.*, 2002; MERCENIER *et al.*, 2000; MEDAGLINI *et al.*, 1997].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der seit Jahrzehnten therapeutisch eingesetzte apathogene und probiotische *E. coli* Stamm NISSLE 1917 zusammen mit dem AIDA-Autotransporter als Präsentationsmodul heterologer Antigene zur oralen Immunisierung von Mäusen verwendet.

### 2.3 Das Bakterium *E. coli* NISSLE 1917

Der probiotische *E. coli* Stamm NISSLE 1917 wurde von dem Arzt Prof. Dr. Alfred Nissle (1874-1965) während des ersten Weltkrieges als wirksames Therapeutikum gegen Darmerkrankungen beschrieben. Bei der Herstellung von Plattenkulturen für bakteriologische Kurse mit einem Gemisch menschlicher Stuhlproben und Kulturen von Typhuserregern stellte Nissle unterschiedliches Wachstum fest. In einigen Fällen hemmten die Kolibakterien das Wachstum der Typhuserreger und er konnte auch Unterschiede in der antagonistischen Wirkung zwischen den Kolibakterien beobachten. Offensichtlich gab es Kolistämme mit einer schwachen und einer starken antagonistischen Wirkung. Nissle untersuchte Stuhlproben von Patienten mit gastrointestinalen Infekten und von gesunden Personen. Hierbei beobachtete er, dass bei den erkrankten Patienten überwiegend „schwache“ Stämme vorkamen, wogegen sich bei Gesunden ein Übergewicht an „starken“ Stämmen zeigte. Bei der Suche nach solch „starken“ Stämmen fand Nissle während des ersten Weltkrieges im Verwundeten-Lazarett zwei Patienten, die niemals an gastrointestinalen Erkrankungen litten, obwohl in ihrer unmittelbaren Umgebung viele Patienten an solchen Infekten erkrankt waren und durch den engen Kontakt untereinander reichlich Gelegenheit bestand, sich anzustecken. Auch bei diesen Personen zeigte sich ein deutliches Übergewicht von „starken“ Stämmen.

Eine besonders starke antagonistische Wirkung zeigte der *E. coli* Stamm NISSLE 1917, ein Wildtypisolat, der bei der Untersuchung eines Pionierunteroffiziers entdeckt wurde. Dieser Unteroffizier diente im Balkankrieg in der Dobrudscha und war im Gegensatz zu seinen Kameraden von sämtlichen Darmerkrankungen verschont geblieben. Alfred Nissle erkannte schnell die therapeutische Eignung dieses Bakterienstammes für die Behandlung von gastrointestinalen Erkrankungen und meldete bereits Ende 1916 diesen Stamm beim Reichspatentamt unter dem Markennamen Mutaflor<sup>®</sup> zum Patent an. Nach dem Tod seiner zweiten Ehefrau im Jahre 1970, Nissle verstarb bereits 1965, wurde das Präparat Mutaflor<sup>®</sup> inklusive aller Rechte an die Firma Ardeypharm GmbH in Herdecke verkauft und wird seitdem von dieser vertrieben.

Der *E. coli* Stamm NISSLE 1917 gehört zum Serotyp O6:K5:H1, besitzt drei verschiedene fimbrielle Adhäsine [BLUM *et al.*, 1995] und seine antagonistische Wirkung ist

unter anderem vermutlich auf die Synthese von zwei Mikrozininen zurückzuführen [PATZER *et al.*, 2003]. Neben den Mikrozininen sind vermutlich noch weitere unbekannte Komponenten an dieser Hemmwirkung beteiligt. Wird *E. coli* NISSLE 1917 zusammen mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium auf INT407-Zellen gegeben, so ist eine Reduktion der Invasionsrate um 70% zu beobachten. Den gleichen Effekt sieht man, wenn der Versuch mit einer isogenen, Mikrozin-negativen Mutante von *E. coli* NISSLE 1917 durchgeführt wird. Auch ein direkter Kontakt von *E. coli* NISSLE 1917 mit Salmonellen oder den INT407-Zellen ist nicht erforderlich, da eine Reduktion der Invasionsrate auch dann zu beobachten ist, wenn *E. coli* NISSLE 1917 durch eine Membran, impermeabel für Bakterien, von den Salmonellen und den INT407-Zellen getrennt ist [ALTENHOEFER *et al.*, 2004]. WEHKAMP *et al.* [2004] konnten zudem zeigen, dass *E. coli* NISSLE 1917 die Expression von hBD-2, einem Defensin, in Caco-2-Zellen induziert. Weiterhin verfügt der Stamm über mindestens fünf Eisenaufnahmesysteme (Enterobaktin, Aerobaktin, Yersiniabaktin, Hämin, Citrat-System), wodurch er auch unter extremen Eisenmangel in der Lage ist zu wachsen und dadurch einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Bakterien besitzt.

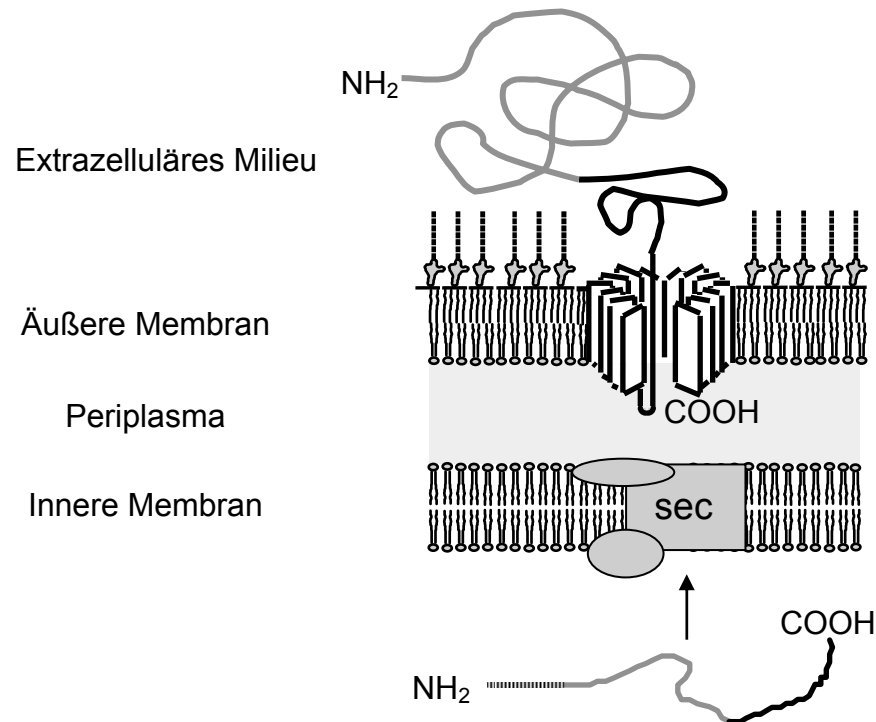
## 2.4 Der AIDA-Autotransporter als Werkzeug zur Präsentation heterologer Antigene

Gramnegative Bakterien haben verschiedene Mechanismen zur Sekretion von Proteinen in das extrazelluläre Milieu entwickelt. Diese Transportsysteme sind bezüglich ihres Aufbaus recht heterogen und werden zur Zeit in fünf Klassen eingeteilt (Typ I-V). Je nach Typ des Sekretionsmechanismus sind zwischen einem (Typ V) und 12-16 Proteinen (Typ II) am Aufbau des Transporters beteiligt wobei der Transport von Proteinen sowohl Sec-unabhängig, als auch Sec-abhängig erfolgen kann [HENDERSON *et al.*, 2004]. Im Fall der Autotransporter (Typ V) besteht der Sekretionsmechanismus aus nur einem Protein, da das zu sezernierende Peptid Teil des Transporters ist.

Das *adhesin involved in diffuse adherence* (AIDA) gehört zur Familie der Autotransporter und ist verantwortlich für den Phänotyp der diffusen Adhärenz des *E. coli* Stammes 2787 (O12:H27) [BENZ & SCHMIDT, 1989]. Das Protein besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, der  $\alpha$ -Domäne (AIDA-I) und der C-terminalen  $\beta$ -Domäne (AIDA<sup>c</sup>). Der Translokator, AIDA<sup>c</sup>, lässt sich noch weiter in einen aus 104 Aminosäuren bestehenden N-terminalen Bereich ( $\beta_1$ ) und einen 336 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Bereich

( $\beta_2$ ) unterteilen. Die  $\beta_2$ -Domäne stellt dabei den eigentlichen Transporter dar, der für die Translokation von AIDA-I über die äußere Membran verantwortlich ist.

Die  $\beta_1$ -Domäne ist die Verbindung zwischen dem Adhäsion und der  $\beta_2$ -Domäne und trägt zur Stabilisierung des Proteins bei [KONIECZNY *et al.*, 2001] (Abb.2.3).



**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung eines Autotransporters. Nach der Synthese im Cytoplasma wird das Protein über die innere Membran vermutlich mit Hilfe des Sec-Apparates in das Periplasma transportiert. Das Signalpeptid (gestrichelte Linie) wird abgespalten und die C-terminale Transporterdomäne (schwarz) integriert sich als  $\beta$ -barrel in die äußere Membran. Durch die dabei entstandene Pore gelangt die *Passenger*-Domäne (grau) in das extrazelluläre Milieu. Im Falle des AIDA-Autotransporters wird der Passagier (AIDA-I) wahrscheinlich autokatalytisch vom Translokator abgespalten und verbleibt nicht-kovalent an der bakteriellen Oberfläche.

Nach der Synthese des AIDA-Proteins im Cytoplasma wird dieses wahrscheinlich mit Hilfe des Sec-Mechanismus über die innere Membran transportiert und das Signalpeptid abgespalten. Die  $\beta_2$ -Domäne von AIDA<sup>c</sup> inseriert in die äußere Membran und bildet ein  $\beta$ -barrel aus 14  $\beta$ -Faltblättern. Durch die so gebildete Pore gelangt das Adhäsion (AIDA-I) über die äußere Membran in das extrazelluläre Milieu. Dort wird es autokatalytisch abgespalten und verbleibt nicht-kovalent an der Membran gebunden. Ein Austausch der N-terminalen Aminosäure der  $\beta_1$ -Domäne verhindert die Prozessierung und AIDA-I bleibt kovalent mit dem Transporter AIDA<sup>c</sup> verbunden.

Dass ein Austausch des Adhäsins gegen heterologe Antigene möglich ist, konnten zum Beispiel KONIECZNY *et al.* [2000] zeigen, indem sie den AIDA-Autoimporter nutzten, um funktionelle T-Zell-Epitope auf der Oberfläche von *E. coli* zu präsentieren.

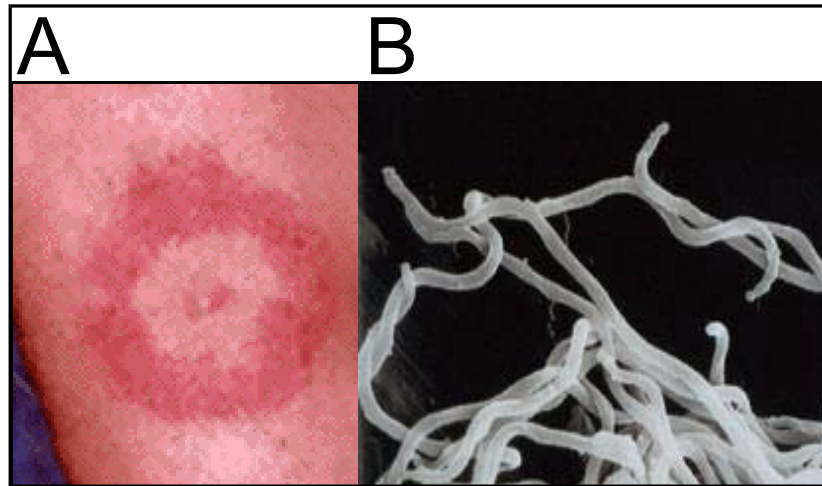
## 2.5 Verwendete Antigene

### 2.5.1 OspA und OspG aus *Borrelia burgdorferi*

Lyme-Borreliose ist eine sich schnell ausbreitende Infektion, die durch Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen wird und sowohl Menschen, als auch Tiere befällt. Ihren Namen verdankt die Krankheit dem Ort Lyme in Connecticut (USA), wo es 1977 zu einer rätselhaften Häufung von Arthritis bei Kindern kam [STEERE *et al.*, 1977]. Bei den meisten der Betroffenen war zuvor ein sich langsam ausbreitender roter Fleck auf der Haut beobachtet worden (Abb. 2.4). Diese Wanderröte oder *Erythema migrans* war der Wissenschaft schon seit dem frühen 20. Jahrhundert bekannt und wurde mit Zeckenbissen in Verbindung gebracht. Man nahm an, dass die Wanderröte durch von Zecken übertragene Bakterien verursacht würde. Um 1950 gelang es dann Spirochäten-ähnliche Strukturen in Hautproben im Bereich der Wanderröte zu beobachten, was zu dem Einsatz von Penicillin zur Behandlung eines *Erythema migrans* führte.

Um den Ort Lyme herum gibt es große Wälder mit vielen Wildtieren, die oftmals von Zecken befallen sind. Die Umweltbedingungen vor Ort und die Symptome der Betroffenen führten schnell zu dem Verdacht, dass die Ursache für die Arthritis ein durch Zeckenbisse übertragbarer Erreger ist. Im Jahre 1982 gelang es BURGENDORFER *et al.* [1982] Spirochäten aus dem Mitteldarm von Zecken der Gattung *Ixodes dammini* zu isolieren. Die neu entdeckte Art bekam den Namen *Borrelia burgdorferi* und ein Jahr später, 1983, konnten die Bakterien erstmals aus dem Blut von Patienten kultiviert werden, bei denen zuvor eine Wanderröte aufgetreten war [BENACH *et al.*, 1983]. Die Borellien ließen sich weiterhin aus dem *Erythema migrans* selbst und aus der Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten isolieren, die an einer Meningoencephalitis litten und bei denen zuvor eine Wanderröte aufgetreten war.





**Abb. 2.4:** *Erythema migrans* nach einem Zeckenbiss (A). Deutlich ist der sich ausbreitende rote Fleck um die Stelle des Zeckenbisses zu erkennen. (B) Die Spirochäte *B. burgdorferi*. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. Quelle: Internet.

In Europa wird *Borrelia burgdorferi* durch den gemeinen Holzbock (*Ixodes ricinus*) übertragen (Abb. 2.5) und jährlich erkranken in Deutschland etwa 20000 bis 60000 Menschen an Lyme-Borreliose [FAULDE & HOFFMANN, 2001]. Während die Zecke Blut saugt, werden die Bakterien auf den Menschen übertragen und es entwickelt sich in der Folge eine systemische Infektion. Die Symptome der Borreliose umfassen akute Kopfschmerzen, Rückenschmerzen, Schüttelfrost und Erschöpfungszustände. In etwa 75% der Fälle tritt an der Bissstelle ein großer, kreisförmiger Ausschlag auf, den man als *Erythema migrans* bezeichnet. Erfolgt jetzt die richtige Diagnose, kann die Krankheit mit Antibiotika behandelt werden. Geschieht dies nicht, tritt die Lyme-Borreliose in ein chronisches Stadium ein und nach Wochen oder auch mehreren Monaten kann es dann zu schweren Krankheitssymptomen kommen. So entwickeln etwa 40-60% der Patienten eine Arthritis und bei 15-20% kommt es zu neurologischen Komplikationen wie Lähmungserscheinungen, Muskelschwäche und Gesichtszucken. Schädigungen des Herzens werden bei etwa 5% der Fälle beobachtet. Eine Behandlung einer chronischen Borreliose ist nur durch die intravenöse Gabe von Antibiotika möglich, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und somit die Borrelien im Zentralnervensystem zerstören können [STEERE, 2001].



**Abb. 2.5:** Der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*). Die Zecke wurde in der typischen Lauerhaltung fotografiert. Bei Erschütterungen, wechselnden Lichtverhältnissen oder CO<sub>2</sub>-Wahrnehmung streckt das Tier das erste Beinpaar in die Luft um sich an einem vorbeikommenden Tier oder Mensch festzuhalten. Quelle: Internet.

Als Modellantigene wurden in dieser Arbeit die äußeren Membranproteine OspA und OspG aus *Borrelia burgdorferi* verwendet. Die Borrelien exprimieren OspA auf ihrer Oberfläche nur, wenn sie sich im Mitteldarm der Zecken befinden [BARBOUR *et al.*, 1985]. Die genaue Funktion dieses Proteins mit einem Molekulargewicht von 31 kDa ist noch nicht ganz geklärt, aber es handelt sich vermutlich um ein Adhäsion, welches es den Borrelien ermöglicht, im Mitteldarm der Zecken zu verbleiben [PAL *et al.*, 2000]. Saugt eine Zecke nun Blut von ihrem Wirt und gelangt dieses in den Mitteldarm, entfernen die Bakterien OspA von der Oberfläche und können, da sie nicht länger an den Epithelzellen adhären, diesen verlassen und durch die Hämolymphe in die Speicheldrüsen einwandern [DE SILVA *et al.*, 1996; SCHWAN *et al.*, 2000]. Über den Speichel gelangen die Bakterien in den Säugerwirt und exprimieren dort das äußere Membranprotein OspG, mit einem Molekulargewicht von 22 kDa. [WALLICH *et al.*, 1995].

## 2.5.2 Das p60 Protein aus *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* ist ein intrazelluläres, grampositives, stäbchenförmiges Bakterium, das einzeln oder in kurzen Ketten vorkommt und mit kontaminierten Nahrungsmitteln aufgenommen wird. Das Bakterium ist säure-, kälte- und salztolerant und aufgrund der weiten Verbreitung in Boden und Wasser ist eine Kontamination frischer Nahrungsmittel praktisch immer möglich. Fleisch, Milchprodukte und andere Frischwaren sind deshalb häufiger mit diesem Pathogen kontaminiert. Bis etwa 1980 spielte *L. monocytogenes* als Lebensmittelvergifter und Humanpathogen keine bedeutende Rolle. Das Bakterium wurde vielmehr im Zusammenhang gebracht mit Enzephalitis und Aborten bei landwirtschaftlichen Nutztieren, die mit Silage gefüttert wurden. Im Jahr 1981 kam es in Halifax, Kanada, zu einem Ausbruch von Listeriose in 41 Fällen, darunter fünf Spontanaborte und vier Totgeburten. Als Ursache wurde infizierter Krautsalat ausgemacht, der aus mit Schafdung gedüngtem Weißkohl hergestellt wurde [SCHLECH *et al.*, 1983]. In Massachusetts starben 1983 vierzehn von 49 Menschen, die mit *L. monocytogenes* kontaminierte Milch getrunken hatten [FLEMING *et al.*, 1985] und weitere Ausbrüche in Kalifornien, 1985, und in der Schweiz, 1983-1987, betrafen mehr als 100 Menschen. Ursache in diesen Fällen war kontaminierter Weichkäse [LINNAN *et al.*, 1988; BILLE *et al.*, 1989]. Obwohl es zweifellos sehr häufig zu Kontakt mit *L. monocytogenes* kommen kann, tritt die Listeriose doch relativ selten auf. Man schätzt, dass jährlich nur etwa 2-15 Fälle pro 1000000 Menschen auftreten [ROCOURT *et al.*, 1997]. Betroffen sind in erster Linie Personen mit geschwächtem Immunsystem, wie zum Beispiel ältere Menschen, Neugeborene und Personen mit immunsuppressiven Erkrankungen. Die Listeriose ist trotz der relativ niedrigen Inzidenz eine schwere Erkrankung mit einer Mortalität von 20-30%. Die Symptome der Krankheit beim Menschen sind im Prinzip die gleichen wie beim Tier: Infektion des Gehirns und Aborte [LOW *et al.*, 1997].

Als Modellantigen zur Präsentation mit dem AIDA-Autotransporter wurde das Protein p60 ausgewählt. p60 ist ein extrazelluläres Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 60 kDa und ist essentiell für eine erfolgreiche Invasion der Wirtszellen [KUHN *et al.*, 1989; BUBERT *et al.*, 1992]. Weiterhin besitzt es eine Murein-Hydrolase-Aktivität [WUENSCHER *et al.*, 1993]. Listerien mit einer Mutation im *iap*-Gen, welches für p60 kodiert, zeigen eine gestörte Zellteilung und tendieren zur Bildung langer Ketten [PILGRIM *et al.*, 2003].

## 2.6 Zielsetzung

Obwohl die allermeisten Infektionen über die Schleimhäute ihren Anfang nehmen wird die überwiegende Zahl der verfügbaren Impfstoffe heute jedoch parenteral appliziert und induziert daher eine systemische, aber keine ausreichende mukosale Immunantwort.

Um eine Immunreaktion des GALT zu induzieren, muss das verwendete Antigen partikulär vorliegen. Es kann zum Beispiel in Mikropartikel verpackt oder an diese gekoppelt werden, da M-Zellen in der Lage sind, Partikel mit einem Durchmesser bis zu 300 nm aufzunehmen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von lebenden attenuierten Pathogenen als Vakzineträger. Diese verfügen oftmals über gute Eigenschaften als Adjuvant und führen zu einem guten Immunschutz. Der Gebrauch von attenuierten Pathogenen birgt jedoch auch Risiken. So ist nicht auszuschließen, dass diese Bakterien ihre Pathogenität durch Mutation oder horizontalen Gentransfer wiedererlangen.

Diese Gefahr besteht nicht bei der Verwendung von kommensale Mikroorganismen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der apathogene und probiotische *E. coli* Stamm NISSLE 1917, zusammen mit dem AIDA-Autotransporter, als Lebendvektor für eine orale Immunisierung geeignet ist. Weiterhin sollte geklärt werden, ob eine orale (mukosale) Immunisierung eine starke Immunantwort im Serum induziert, welche Schutz vor hämatogenen Infektionen wie zum Beispiel *Borrelia burgdorferi* bieten würde. Als Modellantigene sollten die äußeren Membranproteine OspA und OspG aus *Borrelia burgdorferi* und das p60 Protein aus *Listeria monocytogenes* verwendet und mit Hilfe des AIDA-Autotransporters auf der Oberfläche der Bakterien präsentiert werden.

### 3. Material und Methoden

Alle angegebenen Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma und Merck wenigstens in p.a. Qualität bezogen.

#### 3.1 Verwendete Bakterienstämme

In der Tabelle 2.1 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme bezeichnet und näher beschrieben.

**Tab. 3.1:** Verwendete *Escherichia coli* Stämme.

STAMM	GENOTYP	REFERENZ
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>b</sub> <sup>-</sup> m <sub>b</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3, der lysogene Phage kodiert für die T7-Polymerase)	STUDIER <i>et al.</i> , 1986
C600	F <sup>-</sup> (e14 <sup>-</sup> ) <i>hsdR</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 tonA21</i>	APPLEYARD, 1953
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> ,m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>	HANAHAHAN <i>et al.</i> , 1991
NISSLE 1917	O6:K5:H1	NISSLE, 1918
TOP 10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	GRANT <i>et al.</i> , 1990

#### 3.2 Verwendete Versuchstiere

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um weibliche Balb/c-Mäuse (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) im Alter von 9 bis 12 Wochen. Die Genehmigungsnummer des Tierversuchsantrages lautete G47/2002.

### 3.3 Plasmide und Oligonukleotide

#### Plasmide

- pABMutCys** pUC18 Derivat, das für ein mutiertes p60 Protein aus *Listeria monocytogenes* kodiert. Durch den Austausch des einzigen Cystein-Restes im p60 Protein durch ein Alanin wurde die Murein-Hydrolase-Aktivität des Proteins zerstört. Das Plasmid wurde freundlicherweise von H. Rüssmann (München) zur Verfügung gestellt.
- pUN6** Expressionsplasmid für AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine. Das Plasmid enthält den *orfB*-Promotor und die kodierenden Sequenzen für das Signalpeptid, die letzten fünf C-terminalen Aminosäuren von AIDA-I und den Translokator AIDA<sup>c</sup> [NIEWERTH, 2000].
- pET-24b(+)** Vektor für die Konstruktion von His<sub>6</sub>-tag-Proteinen, bezogen von Novagen, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach
- pCR2.1-TOPO** Vektor für die direkte Klonierung von *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten mittels Topoisomerase (TA-Cloning). Bezogen von Invitrogen GmbH, Karlsruhe.
- pOsp-A** Plasmid, das für das *outer surface protein A* (OspA) aus *Borrelia burgdorferi* kodiert. Das Plasmid wurde freundlicherweise von R. Wallich (Heidelberg) zur Verfügung gestellt.
- pZS7-7** Plasmid, das für das *outer surface protein G* (OspG) aus *Borrelia burgdorferi* kodiert. Das Plasmid wurde freundlicherweise von R. Wallich (Heidelberg) zur Verfügung gestellt.
- pMUT1-tet** Kryptisches Plasmid aus *E. coli* NISSLE 1917 mit einer Tetracyclinresistenz. Das Plasmid wurde freundlicherweise von T. Oelschläger (Würzburg) zur Verfügung gestellt.

pMUT2-km            Kryptisches Plasmid aus *E. coli* NISSLE 1917 mit einer Kanamycinresistenz. Das Plasmid wurde freundlicherweise von T. Oelschläger (Würzburg) zur Verfügung gestellt.

## Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Eurogentec (Ivoz-Ramet, Belgien) synthetisiert. Die Basenfolge wurde von den bekannten Sequenzen der Zielgene abgeleitet. Die unterstrichenen Nukleotidsequenzen entsprechen den Erkennungssequenzen der angegebenen Restriktionsendonukleasen.

AIDA-for        5'-CC ATC GAT <sup>ClaI</sup> ATC GGG TTT TGT GTA TTG ACC G-3'  
 AIDA-rev        5'-CC ATC GAT <sup>ClaI</sup> TTC GCT GAT AAG TTG TCC TAA GTC C-3'

p60-for         5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> AGC ACT GTA GTA GTC GAA GC-3'  
 p60-rev         5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> TAC GCG ACC GAA GCC ACC-3'

p60-for-neu     5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> GCT TTA TCC GTA AAA T-3'  
 p60-rev1366    5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> ATT TGT GTT TGT AGA TGG T-3'  
 p60-for1385    5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> GCT AAT AAA ACA AAT ACA AAT-3'

p60-for-His     5'-CGC GGA TCC <sup>BamHI</sup> GAG CAC TGT AGT AGT CGA AGC-3'  
 p60-rev-His    5'-CCG CTC GAG <sup>XhoI</sup> TAC GCG ACC GAA GCC AAC-3'

ospA-for        5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> ATG AAA AAA TAT TTA TTG G-3'  
 ospA-rev        5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> TTT TAA AGC GTT TTT AAT TTC-3'

ospG-for        5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> ATG AAT AAG AAA ATG AAA AAT-3'  
 ospG-rev        5'-GC TCT AGA <sup>XbaI</sup> TTT TTT ATC TTC TAT ATT TTG-3'

ospA-for-His    5'-CGC GGA TCC <sup>BamHI</sup> GAT GAA AAA ATA TTT ATT GG-3'  
 ospA-rev-His   5'-CCG CTC GAG <sup>XhoI</sup> TTT TAA AGC GTT TTT AAT TTC-3'

ospG-for-His 5'-CGC GGA TCC<sup>BamHI</sup> GAT GAA TAA GAA AAT GAA AAA T-3'

ospG-rev-His 5'-CCG CTC GAG<sup>XhoI</sup> TTT TTT ATC TTC TAT ATT TTG-3'

Muta 7 5'-GAC CCA GCG ATA ACC GGA TG-3'

Muta 8 5'-GTG AGA TGA TGG CCA CGA TT-3'

Muta 9 5'-GCG AGG TAA CCT CGA ACA TG-3'

Muta 10 5'-CGG CGT ATC GAT AAT TCA CG-3'

### 3.4 Antikörper und Antiseren

**Tab. 3.2:** Verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnung im *Western blot*.

BEZEICHNUNG / VERDÜNNUNG	BESCHREIBUNG	REFERENZ
αfp12 1:20000	polyklonales Kaninchen-serum gegen das gereinigte Fusionsprotein His <sub>6</sub> -AIDA <sup>c</sup>	SUHR, 1998
αPentaHis 1:2000	monoklonaler Antikörper der Klasse IgG <sub>1</sub> aus Maus gegen den His <sub>6</sub> -tag von rekombinanten Proteinen	QIAGEN, Hilden
αOspA 1:10000	polyklonales Mausserum gegen das outer surface protein A (OspA) aus <i>Borrelia burgdorferi</i>	Wallich, Heidelberg
αOspG 1:10000	polyklonales Mausserum gegen das outer surface protein G (OspG) aus <i>Borrelia burgdorferi</i>	Wallich, Heidelberg
αp60 1:500	monoklonaler Antikörper der Klasse IgG <sub>1</sub> aus Maus gegen das p60 Protein aus <i>Listeria monocytogenes</i>	Gentschev, Würzburg



**Tab. 3.3:** Verwendete Sekundärantikörper.

<b>BEZEICHNUNG / VERDÜNNUNG</b>	<b>BESCHREIBUNG</b>	<b>HERSTELLER</b>
GAM-AP 1: 7500	Durch Affinitätschromatographie isoliertes Ziegenserum spezifisch gegen Maus IgG, welches an Alkalische Phosphatase gekoppelt ist.	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
GAR-AP 1:7500	Durch Affinitätschromatographie isoliertes Ziegenserum spezifisch gegen Kaninchen IgG, welches an Alkalische Phosphatase gekoppelt ist.	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
GAM-IgG-PO 1:5000	Durch Affinitätschromatographie isoliertes Ziegenserum spezifisch gegen Maus IgG ( $\gamma$ Kette), welches an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist.	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
GAM-IgA-PO 1:5000	Durch Affinitätschromatographie isoliertes Ziegenserum spezifisch gegen Maus IgA ( $\alpha$ Kette), welches an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist.	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
GAM-Cy2 1:50	Durch Affinitätschromatographie isoliertes Ziegenserum spezifisch gegen Maus IgG, welches an den Fluoreszenzfarbstoff Cy2 gekoppelt ist.	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
GAR-Cy2 1:50	Durch Affinitätschromatographie isoliertes Ziegenserum spezifisch gegen Kaninchen IgG, welches an den Fluoreszenzfarbstoff Cy2 gekoppelt ist.	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

### 3.5 Stammlösungen, Puffer und Medien

Die verwendeten Puffer und Stammlösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach SAMBROOK *et al.* (1989) oder AUSUBEL *et al.* (1994) bzw. den Herstellerangaben entsprechend angesetzt. Hiervon abweichende Pufferzusammensetzungen sind im Verlauf des Kapitels jeweils bei der ersten Erwähnung im Zusammenhang mit der behandelten Methode aufgeführt.

#### 3.5.1 Kulturmedien für Bakterien

##### LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
<i>A. bidest.</i>	ad 1000 ml
pH 7.0	

##### TB-Medium

Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54 g
NaCl	10 g
Glycerin	4 ml
<i>A. bidest.</i>	ad 1000 ml

##### Standard I Medium

Standard I Pulver	25 g
<i>A. bidest.</i>	ad 1000 ml
pH 7.0	

##### MacConkey-Bouillon

MacConkey-Pulver	35 g
<i>A. bidest.</i>	ad 1000 ml
pH 7.0	

Zur Verfestigung der Nährmedien wurde den Lösungen 1,5% (w/v) Bacto-Agar oder Select-Agar zugesetzt. Die Lösungen wurden vor Gebrauch 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und bei Bedarf Antibiotika zugesetzt (Temperatur der Lösung **nicht** über 60°C). Auf Platten für Blau-/Weiß-Screening wurden vor Gebrauch 40 µl einer X-gal-Lösung (40 mg / ml in DMF) ausplattiert und diese bei 37°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.5.2 Verwendete Antibiotika

#### Ampicillin

20 mg / ml des Natriumsalzes in *A. bidest.*, sterilfiltriert. Lagerung bei -20°C.

Arbeitskonzentration 100µg / ml.

#### Kanamycin

10 mg / ml Kanamycinsulphat in *A. bidest.*, sterilfiltriert. Lagerung bei -20°C.

Arbeitskonzentration 30µg / ml.

#### Tetracyclin

12 mg / ml Tetracyclin • HCl in 70% Ethanol, sterilfiltriert. Lagerung bei -20°C.

Arbeitskonzentration 12µg / ml.

### 3.6 Enzyme

**Tab. 3.4:** Verwendete Enzyme.

ENZYM	HERSTELLER	AKTIVITÄT	FUNKTION
<i>Bam</i> HI	MBI	10 U / µl	Restriktion 5'-GGATCC-3'
<i>Cl</i> AI	MBI	10 U / µl	Restriktion 5'-ATCGAT-3'
<i>Xba</i> I	MBI	10 U / µl	Restriktion 5'-TCTAGA-3'
<i>Xho</i> I	MBI	10 U / µl	Restriktion 5'-CTCGAG-3'
T4 DNA Ligase	MBI	60 U / µl	Phosphodiesterbindung zwischen 3'- und 5'-Termini
CIAP	NEB	10 U / µl	Hydrolyse von 5'-Phosphatgruppen
<i>Pfu</i> -Polymerase	MBI	2,5 U / µl	5' → 3' DNA-Polymerase-Aktivität 3' → 5' Exonuklease-Aktivität
Phusion-Polymerase	Finnzymes	2 U / µl	5' → 3' DNA-Polymerase-Aktivität 3' → 5' Exonuklease-Aktivität
<i>Taq</i> -Polymerase	MBI	5 U / µl	5' → 3' DNA-Polymerase-Aktivität
Benzonase	Novagen	25 U / µl	Hydrolyse von Nukleinsäuren
Lysozym	Roche		Aufschluss von Bakterien

### 3.7 Geräte

Die nachfolgende Auflistung stellt die in der Arbeit verwendeten Geräte und deren Bezugsquelle zusammen.

Autoklav:	Vaculab S 3000, MMM GmbH (München)
Brutschränke:	Modell 500, Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)
Elektrophoresekammer:	ZMBH (Heidelberg) für Agarosegele Hofer Scientific Instruments, Amersham biosciences (Freiburg)
Elektroporator:	Easyject Plus, Equi Bio Ltd. (Kent, UK), bezogen über PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
<i>ELISA</i> -Lesegerät:	Emax™ precision microplate reader, Molecular Devices, bezogen über MWG Biotech (Erlangen)
<i>ELISA</i> -Waschgerät:	Columbus Washer, Tecan (Crailsheim)
Geltrockner:	Hofer Scientific Instruments, Amersham biosciences (Freiburg)
Gelgießkammer:	Multiple Gel Caster SE 200, Hofer Scientific Instruments, Amersham biosciences (Freiburg)
Haubeninkubator:	Certomat R/H, Braun Diessel Biotech (Melsungen)
Magnetrührer:	IKAMAG RH, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG – IKA- Labortechnik (Staufen)
Mikroskope:	Phasenkontrastmikroskop BH-2, Olympus (Hamburg) Photomikroskop Axiophot, Carl Zeiss (Oberkochen)
Mikrowelle:	Micromat, AEG (München)
pH-Meter:	Φ 32 pH-Meter, Beckman-Coulter (München)
Spannungsgeber:	Elektrophoresis Constant Power Supply EPS 500/400, Amersham biosciences (Freiburg)
Spektralphotometer:	DU 640, Beckman-Coulter (München) Biophotometer, Eppendorf (Hamburg)
SemiDry Blotgerät:	BioRad (München)
Sterilbänke:	Tecnoflow, Integra Biosciences (Fernwald)
Thermocycler:	Hybaid PCR Sprint, Hybaid (Engelsbach)
Ultraschallgerät:	450/250 Sonifier, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik (Schwäbisch Gmünd)
Vortex:	Vortex Genie 2, LHD (Heidelberg)

---

Wasserbad:	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen:	Beckman J2-MI (München)
	Eppendorf Kühlzentrifuge 5417 R (Hamburg)
	Heraeus Sepatech Varifuge 3.0 R (Hanau)

## **3.8 Arbeiten mit Bakterien**

### **3.8.1 Flüssigkulturen**

Flüssigkulturen wurden in Standard I, TB- oder LB-Medium mit ggf. entsprechender Supplementation durch Antibiotika bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Vorkulturen (Übernachtskulturen) wurden mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aber mit einem Aliquot einer Stammkultur angeimpft.

Stammkulturen (Glycerinkulturen) wurden aus einer exponentiell wachsenden Kultur (OD<sub>600</sub> 0,5 – 0,9) nach Zugabe von 30% (v/v) Glycerin (Endkonzentration) hergestellt und bei -70°C gelagert.

### **3.8.2 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkulturen**

Das Bakterienwachstum in Flüssigkulturen wurde durch die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600$  nm verfolgt.

### **3.8.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Bakterienzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde unter dem Mikroskop die Anzahl der Bakterien in vier Gruppenquadraten ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet (VF = Verdünnungsfaktor; Kammerfaktor =  $1,25 \times 10^6$ ):

$$\text{Bakterien / ml} = (\text{Zellzahl} \times \text{VF} \times 1,25 \times 10^6) / 4$$

Das benötigte Volumen der Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (4000 x g; 5 min, RT) und das Sediment zur Einstellung des erforderlichen Titters in der entsprechenden Menge Medium resuspendiert.

### 3.8.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an eine Methode aus „*Current Protocols in Molecular Biology*“ [AUSUBEL *et al.*, 1994], die auf einer Publikation von Dower *et al.* [1988] basiert.

500 ml Standard I Medium wurden in einer Verdünnung von 1:200 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~ 0,7 inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in gekühlte Zentrifugenbecher überführt, 15 min auf Eis inkubiert und dann sedimentiert (5000 x g; 20 min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 ml eiskaltem *A. bidest.* resuspendiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Auf diese Weise wurde das Pellet noch zweimal gewaschen um eventuelle Reste des Nährmediums und somit störende Salze zu entfernen. Es folgte ein letzter Waschschrift mit 10% (v/v) Glycerin und danach wurden die sedimentierten Bakterien in einer Volumeneinheit (bezogen auf das Volumen des Pellets) 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Bakterien wurden in Alliquots von 150 µl bei -70°C gelagert.

### 3.8.5 Elektroporation kompetenter Bakterien mit Fremd-DNA

Bei der Elektroporation werden die Zellmembranen von kompetenten Bakterien durch einen kurzen Puls hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle permeabel. Da bei dieser Methode mit sehr hohen Spannungen im Kilovolt-Bereich gearbeitet wird, ist es wichtig, dass die eingesetzte DNA salzfrei ist. Andernfalls kommt es zur Ausbildung eines Lichtbogens. Für die Elektroporation wurden 150 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 25 ng bis 50 ng Fremd-DNA versetzt und gemischt. Die Bakteriensuspension wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und diese direkt in das Elektroporationsgerät gestellt. Nach Anlegen eines elektrischen Pulses (2500 V; 25 µF; 201 Ω) wurden die Bakterien in 1 ml Standard I Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde ein Alliquot von 100 µl bis 200 µl auf vorgewärmten (37°C), mit Antibiotika

supplementierten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **3.8.6 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien**

Die Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien erfolgte in Anlehnung an eine Methode beschrieben in SAMBROOK *et al.* [1989]. Dazu wurden 50 ml Standard I Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~0,7 bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in gekühlte Zentrifugenbecher überführt und sedimentiert (2000 x g; 15 min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Kalzium erhöht stark die Bereitschaft der Bakterienzelle DNA aufzunehmen. Nach erneuter Zentrifugation (2000 x g; 15 min; 4°C) wurde das Sediment in 2 ml einer eiskalten 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung + 15% (v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 150 µl bei -70°C gelagert.

### **3.8.7 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien mit Fremd-DNA**

Für die Transformation wurden 150 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 25 ng bis 50 ng Fremd-DNA erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen für die Dauer von 90 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 850 µl Standard I Medium versetzt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C und 180 rpm wurde ein Aliquot von 100 µl bis 200 µl auf vorgewärmten (37°C), mit Antibiotika supplementierten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

## 3.9 Molekularbiologische Methoden

### 3.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Bakterien wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Nach einer Fällung der Proteine und der genomischen DNA wurde die Plasmid-DNA aus dem geklärten Lysat durch Anionenaustauscherchromatographie isoliert. Alle benötigten Materialien und Reagenzien stammten aus kommerziellen *Kits* der Firma Qiagen (QIAPrepSpin MiniPrep Kit / QIAfilter Plasmid Midi Kit). Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Fäces

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Fäces wurde ein kommerzielles *Kit* der Firma Qiagen verwendet (QIAPrepSpin MiniPrep Kit).

Zehn Kotstückchen wurden in 250 µl *A. bidest.* aufgenommen und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung eventuell vorhandener DNAsen durch fünfminütiges Kochen im Wasserbad. Anschließend wurden 250 µl Puffer „P1“ zugegeben und die Fäcesproben mit einem sterilen Holzstab suspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer „P2“ und erneutem suspendieren, wurden die Proben mit 350 µl Puffer „N3“ versetzt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (14000 x g; 10 min; RT) wurden die Überstände auf Anionenaustauschersäulen gegeben und erneut zentrifugiert (14000 x g; 1 min; RT). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen jeweils einmal mit den Puffern „PB“ (500 µl) und „PE“ (750 µl) gewaschen und dann getrocknet (14000 x g; 1 min; RT). Anschließend wurden 30 µl *A. bidest.* auf die Säulen pipettiert, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zentrifugiert (14000 x g; 1 min; RT). Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.9.3 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel

Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen *Kit* der Firma PeqLab (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit). Dazu wird die entsprechende Bande mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten, in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit Bindepuffer überführt und bei 55°C so lange inkubiert, bis das Gelstück vollständig



geschmolzen war. Die Isolierung der DNA erfolgte durch Anionenaustauscherchromatographie.

### 3.9.4 Restriktion

Die Restriktion erfolgte abhängig vom verwendeten Enzym in dem vom Hersteller empfohlenen enzyspezifischen Reaktionspuffer. Die Inkubationszeit variierte zwischen 1h und 8 h bei einer Temperatur von 37°C. Falls möglich wurden die Restriktionsendonukleasen nach Ablauf der Reaktion hitzedenaturiert (65°C; 20 min) oder durch die Verwendung von kommerziellen *Kits* (z.B. E.Z.N.A. Cycle Pure Kit von PeqLab) aus dem Restriktionsansatz entfernt.

Zur schnellen Analyse von Klonen wurde alternativ eine Restriktion in der Mikrowelle durchgeführt. Dazu wurden die Restriktionsansätze für zweimal 20 sec mit einer Pause von ebenfalls 20 sec zwischen den Bestrahlungen der Mikrowellenstrahlung (600 W) ausgesetzt. Das Magnetron der Mikrowelle erzeugt ein Wechselstromfeld und die hochfrequente Umpolung in diesem elektromagnetischen Feld zwingt die Wasserdipole dazu, sich ständig ihrer Ladung gemäß in diesem Feld auszurichten, d.h. sie schwingen bis zu 5 Milliarden Mal pro Sekunde hin und her. Dadurch kommt es zu einer schnellen Durchmischung des Restriktionsansatzes, wodurch sich die bei der Restriktion beteiligten Reaktionspartner schneller finden und die Hydrolyse des Zuckerphosphatrückgrades katalysiert werden kann.

#### Beispiel für einen Restriktionsansatz:

DNA-Lösung (1 µg / µl)	1 µl
Restriktionspuffer (10x)	1 µl
Restriktionsendonuklease (1 U / µl)	1 µl
<i>A. bidest.</i>	ad 10 µl

### 3.9.5 Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA

Während der Klonierung von DNA-Fragmenten mit einem durch ein Restriktionsenzym linearisierten Vektor tritt ohne Dephosphorylierung eine hohe Religationsrate des Vektors auf, sofern man nicht die 5'-Phosphatgruppen entfernt. Dazu wurde den entsprechenden Restriktionsansätzen 1/10 Volumen einer alkalischen Phosphatase (Calf Intestine Alkaline

Phosphatase, CIAP, 5 U /  $\mu$ l) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die CIAP entfernt die 5'-Phosphatgruppen der DNA und verhindert so eine Religation des Vektors.

### 3.9.6 Ligation

DNA-Fragmente, die nach Restriktion komplementäre kohäsive oder glatte Enden besitzen, können durch Ligasen miteinander verbunden werden. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden von DNA-Molekülen. Wegen ihrer Fähigkeit, sowohl überstehende, als auch glatte Enden zu verknüpfen, wird in der Molekularbiologie sehr oft die T4-Ligase verwendet und bakteriellen Ligasen vorgezogen. Um die Wahrscheinlichkeit eines Insertionsereignisses von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA zu erhöhen, wurde die zu inserierende DNA im Vergleich zum Vektor im molaren Überschuss eingesetzt. Die Berechnung der einzusetzenden DNA erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Insertmenge[ng]} = \frac{\text{Vektormenge[ng]} \times \text{Insertgröße[kb]} \times \text{Insertmenge[mol]}}{\text{Vektorgröße[kb]} \times \text{Vektormenge[mol]}}$$

Beispiel für einen Ligationsansatz:

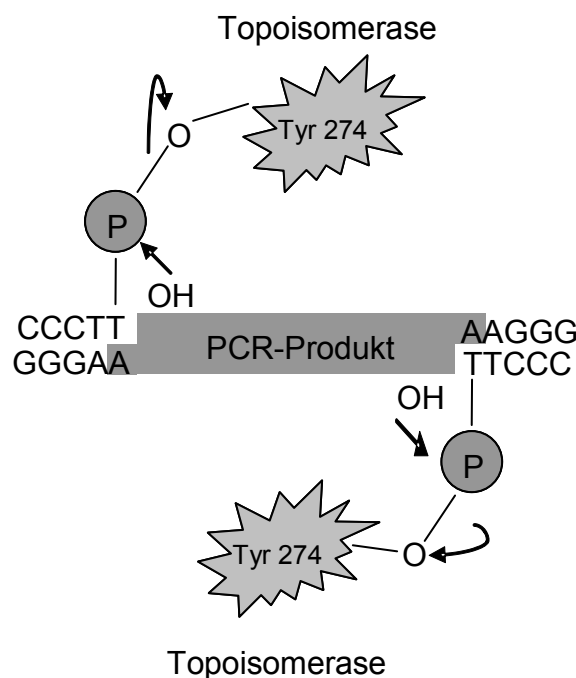
Vektor-DNA	50 – 100 ng
Insert-DNA	variabel
Ligase-Puffer (10x)	1 $\mu$ l
<i>A. bidest.</i>	ad 10 $\mu$ l

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei 15°C im Wasserbad.

### 3.9.7 TA-Klonierung

Da einige Restriktionsendonukleasen dazu neigen, angefügte Schnittstellen an den Enden von PCR-Produkten nicht effektiv zu schneiden, wurde in dieser Arbeit in solchen Fällen auf die so genannte TA-Klonierung zurückgegriffen. Hierzu wurde ein kommerzielles *Kit* der Firma Invitrogen verwendet (TOPO TA Cloning). Der linearisierte Vektor pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> trägt an beiden 3'-Enden Thymidin-Überhänge, an denen kovalent über das 3' Phosphat die DNA mit

dem Tyrosin 274 der Topoisomerase I aus *Vaccinia* Virus verbunden ist. Diese Phosphotyrosinbindung kann nun von der 5'-Hydroxylgruppe des zu klonierenden PCR-Produktes nach der Hybridisierung von Adenosin mit Thymidin angegriffen werden, wobei die Topoisomerase abgelöst wird und die DNA-Moleküle miteinander verknüpft werden. Da die *Taq*-Polymerase eine nicht-Template-abhängige Transferaseaktivität besitzt, die ein einzelnes Adenosin an das 3'-Ende von PCR-Produkten anhängt und der Vektor ein überhängendes 3'-Thymidin, kann das PCR-Fragment effizient in den Vektor ligieren (Abb. 3.1). Die Insertion erfolgt in das *LacZ* $\alpha$ -Gen, so dass Klone, welche den rekombinanten Vektor enthalten durch Blau-Weiss-Screening identifiziert werden können.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der „Cloning Site“ des Vektors pCR2.1<sup>®</sup>-TOPO.

In Anlehnung an TOPO TA Cloning Kit Handbuch, Invitrogen.

DNA-Fragmente, die mit anderen Polymerasen amplifiziert worden sind, wie zum Beispiel *Pfu* oder *Phusion*, besitzen keine Adenosinüberhänge und müssen daher durch Inkubation mit der *Taq*-Polymerase am 3'-Ende adenyliert werden (0,7-1,0 U / Ansatz; 10 min; 72°C). Für die TOPO-Klonierungsreaktion wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Frisches PCR-Produkt	0,5-4 $\mu$ l
Salzlösung (Kit)	1 $\mu$ l
TOPO <sup>®</sup> Vektor	1 $\mu$ l
<i>A. bidest</i>	ad 6 $\mu$ l

Der Ansatz wurde gut durchmischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur Transformation in CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* TOP 10 (s. 3.8.7) auf Eis oder bei -20°C gelagert.

### 3.9.8 Konzentrationsbestimmung von gereinigter DNA

Da die DNA-Konzentration in Lösungen proportional zu der von ihr absorbierten UV-Strahlung ist, kann man mit Hilfe der UV-Absorptionsspektrometrie auf die Konzentration von DNA in Lösungen schließen. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm entspricht eine Absorption von 1,0 einer dsDNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  [DILLON *et al.*, 1985]. Um Angaben über Verunreinigungen der DNA-Lösung mit Proteinen zu machen, wird ebenfalls die Absorption bei  $\lambda = 280$  nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge besitzen Proteine ihr Absorptionsmaximum. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm sollte bei reiner DNA-Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrige Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, höhere auf eine Kontamination mit RNA. Die Messungen erfolgten in Kunststoffküvetten (UVette, Eppendorf) mit Hilfe des Biophotometers der Firma Eppendorf.

### 3.9.9 Gelelektrophoretische Trennung von DNA

Zur Trennung und Analyse von DNA-Fragmenten wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese verwendet.

Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass DNA bei alkalischem pH-Wert aufgrund des deprotonierten Zuckerphosphatrückgrades als Anion vorliegt und sich somit in einem elektrischen Feld auf die Anode hin zubewegt. Verwendet man nun Agarose als Trägermaterial, so erfolgt eine Trennung der DNA nach Größe. Kleinere Fragmente bewegen sich schneller in der Gelmatrix als größere. Durch Änderung der Agarosekonzentration kann die Porengröße des Gels beeinflusst werden und somit der Fragmentgrößenbereich, der besonders effektiv getrennt werden kann. Typischerweise werden Agarosekonzentrationen zwischen 0,5% (w/v) und 2% (w/v) verwendet. Da die räumliche Struktur der DNA einen Einfluss auf die Migration im Gel ausübt, sollte für eine genaue Bestimmung der DNA-Größe nur linearisierte DNA eingesetzt werden.

Die entsprechende Agarosemenge wurde in 100 ml TAE-Puffer durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung in den mit

Klebeband zugeklebten Gelschlitten gegossen, in dem sich auch noch zwei Kämme zur Probenaussparung befanden. Nach dem Erstarren wurde das Klebeband entfernt und der Schlitten mit dem Gel in die entsprechende, mit TAE-Puffer gefüllte, Elektrophoresekammer gegeben. Die mit Gelladepuffer (6 x Loading Dye, MBI) versetzten Proben wurden nach Entfernen der Kämme in die Aussparungen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem elektrischen Feld von 150 V für ca. 45 – 60 min.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 10-15 min in Ethidiumbromidlösung (2 mg / l) gefärbt. Ethidiumbromid ist ein im UV-Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) fluoreszierender Farbstoff, der zwischen die Basenpaare der DNA-Doppelhelix interkaliert und diese somit sichtbar macht.

### 3.9.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

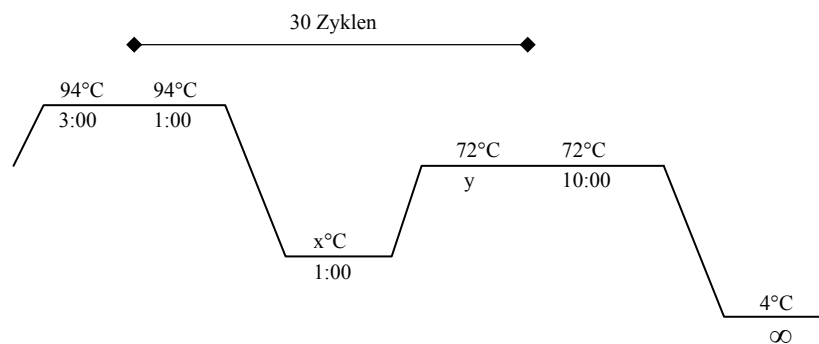
Mit Hilfe der PCR [MULLIS *et al.*, 1987] kann ein Stück DNA, das in sehr geringen Konzentrationen vorliegt, millionenfach amplifiziert werden. Bedingung hierfür sind Sequenzinformationen über das 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments, um Primer abzuleiten. Die Primer binden jeweils an das 3'-Ende der komplementären DNA-Stränge und sind gegeneinander orientiert. Die Methode beruht im Wesentlichen auf einem Zyklus von Temperaturänderungen. Der erste Schritt ist die Denaturierung der DNA durch eine Temperaturerhöhung auf 94°C. Dadurch wird die Doppelhelix aufgebrochen und die DNA liegt nun als Einzelstrang vor. Dann wird die Temperatur auf die spezifische Annealing-Temperatur der Primer abgesenkt und die Primer binden an die homologen Bereiche der DNA. Die Temperatur ist abhängig von dem relativen GC-Gehalt der Primer. Je höher der Anteil an Guanin und Cytosin, desto höher ist auch die Annealing-Temperatur. Anschließend wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Dies ist das Temperaturoptimum der am häufigsten verwendeten Polymerasen, nämlich der *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* und der *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Die Polymerase bindet an die DNA und synthetisiert, ausgehend von den Primern, die komplementären Stränge mittels der zugesetzten dNTP's (Elongation). Anschließend beginnt ein neuer Zyklus mit Denaturierung, Annealing und Elongation. Typischerweise werden 25 bis 35 solcher Zyklen durchgeführt.

Die verwendeten Oligonukleotide waren zwischen 26 und 33 Nukleotide lang (s. 3.3). Die optimalen Hybridisierungstemperaturen wurden, ausgehend von den Angaben der Hersteller über die  $T_m$ -Werte, experimentell mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt (Primus 96 advanced<sup>®</sup> Gradient, PeqLab).

Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Template-DNA	1 ng – 200 ng
Puffer (10 x)	5 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
Primer (10 pM)	je 1 µl
Polymerase	2,5 U
<i>A. bidest.</i>	ad 50 µl

Die Reaktionsbedingungen für die PCRs sind der folgenden Abbildung zu entnehmen.



**Abb. 3.2:** Schematische Darstellung des Temperaturverlaufes der PCR.

x = empirisch ermittelte Hybridisierungstemperatur (meist 56°C – 58°C).

y = Elongationszeit in Minuten, abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der verwendeten Polymerase (Herstellerangaben).

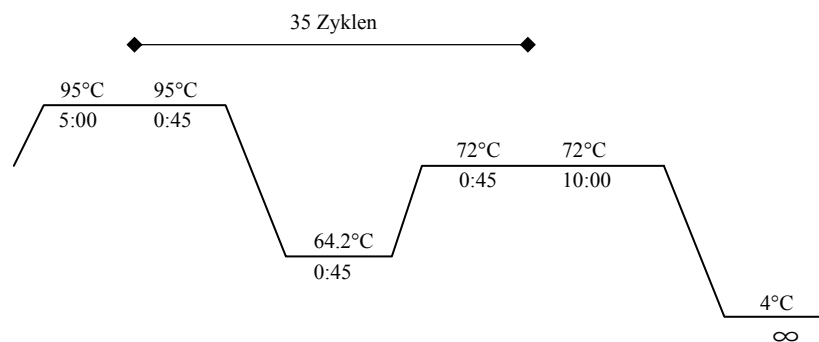
### 3.9.11 *E. coli* NISSLE 1917-spezifische PCR-Reaktion

Mit Hilfe der PCR-Diagnostik ist es möglich, den probiotischen *E. coli* Stamm NISSLE 1917 sicher zu identifizieren [BLUM-OEHLER *et al.*, 2003]. Diese Methode basiert auf der Amplifikation von zwei DNA-Fragmenten, die auf einem der beiden kryptischen Plasmide kodiert sind. Diese kryptischen Plasmide sind sehr stabil und spezifisch für *E. coli* NISSLE 1917. Für die PCR wurden die Primer Muta 7/8 und Muta 9/10 verwendet, die alle gegen das kryptische Plasmid pMUT2 gerichtet sind. Die amplifizierten DNA-Fragmente besitzen eine Länge von 427 bp (Muta 7/8) und 313 bp (Muta 9/10).

Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Template-DNA	1 $\mu$ l
Puffer (10 x)	2,5 $\mu$ l
dNTP-Mix	0,5 $\mu$ l
Primer (10 pM)	je 1 $\mu$ l
Polymerase	1,25 U
<i>A. bidest.</i>	ad 25 $\mu$ l

Als Template-DNA wurden 1  $\mu$ l einer Bakteriensuspension oder aus Fäces isolierte Plasmid-DNA (s. 3.9.2) verwendet. Abbildung 3.3 zeigt das verwendete PCR-Programm.



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung des PCR-Programms zum Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 mit den Primern Muta 7/8 und Muta 9/10. Zeitangaben in Minuten.

## 3.10 Analyse und Präparation von Proteinen

### 3.10.1 Gesamtzellproteine aus *Escherichia coli*

Zur Gewinnung der Gesamtzellproteine aus *E. coli* wurden 1 ml einer Übernachtskultur oder einer sich im exponentiellen Wachstum befindlichen Kultur zentrifugiert (14000 x g; 1 min; RT) und das Pellet in 50  $\mu$ l SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurde die Probe für 10 min im Wasserbad bei 100°C inkubiert, anschließend zentrifugiert (14000 x g; 2 min; RT) und der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

SDS-Probenpuffer (4 x):	Tris-HCl	0,32 M
	Glycerin	17,4 % (v/v)

---

SDS	4 % (w/v)
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	1,2 M
pH 6,8	

### 3.10.2 Isolierung von Fusionsproteinen mit His<sub>6</sub>-tag

Zur Isolierung der in dieser Arbeit verwendeten Antigene wurden die entsprechenden DNA-Fragmente in den Vektor pET24b(+) kloniert. Die auf diese Weise entstandenen Plasmide pCB4, pCB5 und pCB6 kodieren für Fusionsproteine mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag. Die Vektoren wurden in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert.

Die Isolierung der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe der Immobilisierten Metall Affinitäts-chromatografie (IMAC) [PORATH *et al.*, 1975]. Hierbei binden die Fusionsproteine reversibel über den His<sub>6</sub>-tag an ein immobilisiertes Metallion. Die Proteine können entweder über ein Absenken des pH-Wertes oder durch einen Überschuss an Imidazol von der Matrix eluiert werden.

500 ml LB-Medium, supplementiert mit Kanamycin, wurden mit 10 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1,0 inkubiert. Die Synthese des Fusionsproteins wurde durch die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG) mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 26°C und 180 rpm wurden die Zellen geerntet (4000 x g; 10 min; 4°C) und bei -20°C über Nacht gelagert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 15 ml eiskaltem Extraktions-/Waschpuffer resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch Behandlung mit Lysozym (Biozol) und Ultraschall. Dazu wurden die Zellen mit 1 mg / ml Lysozym versetzt und 40 min auf Eis inkubiert. Zur Verringerung der Viskosität der Suspension wurden 15  $\mu$ l Benzonase (25 U /  $\mu$ l) zugegeben, welche Nukleinsäuren hydrolysiert. Nach Aufschluss der Zellen mit Ultraschall wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (20000 x g; 15 min; 4°C) entfernt und das geklärte Lysat mit 700  $\mu$ l Matrix (TALON<sup>TM</sup> Metal Affinity Resin, Clontech) versetzt. Die Bindung der Fusionsproteine über den His<sub>6</sub>-tag an das Kobaltion der Matrix erfolgte während einer einstündigen Inkubation bei 4°C und 15 rpm auf einem Drehinkubator (GFL 3025). Die beladene Matrix wurde zentrifugiert (1700 x g; 2 min; 4°C), in 50 ml eiskaltem Extraktions-/Waschpuffer resuspendiert und bei 4°C auf einem Drehinkubator für 10 min inkubiert. Auf diese Weise wurde die Matrix noch zweimal gewaschen und anschließend in Einwegsäulen (TALON<sup>TM</sup> Disposable



Gravity Columns, Clontech) überführt. Die Matrix wurde noch zweimal mit jeweils 5 ml Extraktions-/Waschpuffer gewaschen und das Fusionsprotein mit 2 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in 500 µl Fraktionen gesammelt und bei – 20°C gelagert.

Extraktions-/Waschpuffer:	Na-Phosphat	50 mM
	NaCl	1,5 M
	Imidazol	10 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	Triton X-100	0,2 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	10 mM
	pH 7,0	
Elutionspuffer:	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	250 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	Triton X-100	0,1 % (v/v)
	pH 8,0	

### 3.10.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte in Anlehnung an die Methode von BRADFORD [1976]. Diese Methode beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm bei der Bindung von Coomassie<sup>®</sup> Blue G-250 an Proteine im sauren Milieu. Ebenso ist ein Farbumschlag von Braun nach Blau zu beobachten. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe eines kommerziellen *Kits* der Firma PIERCE Biotechnology (Coomassie<sup>®</sup> Plus Protein Assay Reagent Kit) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.10.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der Proteine erfolgte nach einer Methode von LAEMMLI [1970]. Es handelt sich hierbei um eine diskontinuierliche elektrophoretische Methode bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Abmessungen der Gele betragen etwa 6 cm x 8 cm bei einer Dicke von 0,075 cm. Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug 5%, die des Trenngels 10% bis 15% je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine. Die polymerisierten Gele wurden in feuchte Papiertücher eingewickelt und in fest verschließbare Plastikbeutel bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Es wurden gleichzeitig fünf Gele gemäß den Angaben in Tabelle 3.5 gegossen.

**Tab. 3.5:** Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele (fünf Stück).

	10%	12,5%	15%	SAMMELGEL
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	---
Sammelgelpuffer	---	---	---	3 ml
Acrylamidlösung	12 ml	15 ml	18 ml	3 ml
H <sub>2</sub> O	16,5 ml	13,5 ml	10,5 ml	11,85 ml
APS	330 µl	330 µl	330 µl	180 µl
TEMED	18 µl	18 µl	18 µl	9 µl

Acrylamid-Stammlösung (30 %): Acrylamid 30 g  
 N,N'-Methylenbisacrylamid 8 g  
*A. bidest.* ad 100 ml

Sammelgelpuffer: Tris-HCl 750 mM  
 EDTA 12 mM  
 SDS 0,6% (w/v)  
 pH 6,8

Trenngelpuffer: Tris-HCl 1,8 M  
 EDTA 9,6 mM  
 SDS 0,48% (w/v)  
 pH 8,8

---

Ammoniumpersulphatlösung:	APS (Serva, Heidelberg)	10% (w/v)
Laemmli-Puffer (10 x)	Tris	0,25 M
	Glycin	1,92 M
	SDS	1% (w/v)
	pH 8,3	
SDS-Probenpuffer (4 x):	Tris-HCl	0,32 M
	Glycerin	17,4% (v/v)
	SDS	4 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,04% (w/v)
	β-Mercaptoethanol	1,2 M
	pH 6,8	

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 10 min bei 100°C im Wasserbad mit SDS-Probenpuffer inkubiert (3 Volumen Probe und 1 Volumen Puffer). Dadurch werden die Proteine vollständig denaturiert und mit SDS beladen, wodurch sie eine negative Nettoladung erhalten. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 30 mA durchgeführt.

### 3.10.5 Färbung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel

Die Färbung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte durch Verwendung des Farbstoffes Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue R 250. Hierzu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 15 min in der Coomassie<sup>®</sup>-Färbelösung unter Schütteln inkubiert und anschließend in der Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut erkennbar waren. Nach dem Trocknen der Gele auf einem Gel Trockner für 90 min bei 60°C unter Vakuum konnten die Gele dauerhaft gelagert werden.

Coomassie-Färbelösung:	Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue R 250	3,3 mM
	Ethanol	50% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
	filtrieren	

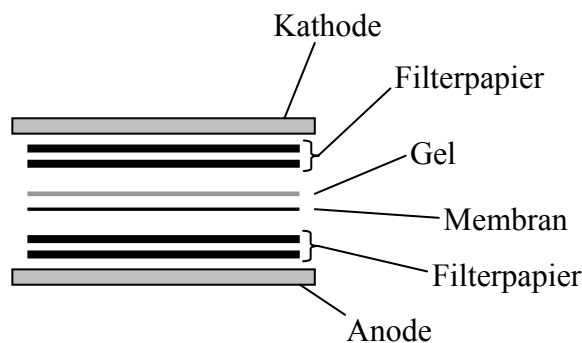
Entfärbelösung:	Ethanol	10% (v/v)
	Essigsäure	7% (v/v)

### 3.10.6 Immunochemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden diese mit Hilfe eines *Semi-Dry-Blotters* auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, MILLIPORE, Schwalbach) übertragen und im Anschluss durch eine als *Western blotting* bezeichnete Methode immunochemisch nachgewiesen [BURNETTE, 1981].

#### 3.10.6.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde für 15 sec in 100% Methanol aktiviert, 2 min in *A. bidest.* gewaschen und dann für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Abbildung 3.4 zeigt schematisch den Aufbau eines solchen *Blots*. Die Filterpapiere wurden mit Transferpuffer befeuchtet.



**Abb. 3.4:** Schematischer Aufbau eines *Semy-Dry-Blots*.

Durch Anlegen einer Spannung von 20 V für 30 min wurden die negativ geladenen Protein- / SDS-Komplexe auf die PVDF-Membran übertragen.

Transferpuffer:	Tris-HCl	48 mM
	Glycin	9 mM
	pH 9,2	

### 3.10.6.2 Färben der PVDF-Membran

Zur Überprüfung des Transfers der Proteine auf die Membran wurde diese für eine Minute mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Ponceau-S lagert sich unspezifisch an die Membran und Proteine an und kann aufgrund der höheren Affinität zu Proteinen leichter von der Membran (als von den Proteinen) mit *A. bidest.* gewaschen werden. Die Proteine erscheinen als rötliche Banden. Da es sich bei dieser Methode um eine reversible Färbung handelt, kann der Farbstoff vollständig durch Waschen mit *A. bidest.* entfernt werden.

Ponceau-S-Lösung:	Ponceau-S Rot	0,5% (w/v)
	Essigsäure	1% (v/v)

### 3.10.6.3 Trocknen der PVDF-Membran

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese vollständig getrocknet. Dieser Schritt ist notwendig, wenn im weiteren Verlauf ein sogenannter „schneller“ *Western* ohne Blocken durchgeführt werden sollte. Durch das Trocknen der Membran kehrt diese wieder zu ihrem Hydrophoben Zustand zurück. Antikörper können nun nicht mehr unspezifisch an die Membran binden, sondern nur noch spezifisch an die immobilisierten Proteine.

Zum Trocknen der PVDF-Membran wurde diese für 10 sec in 100% Methanol geschwenkt um den wässrigen Puffer zu verdrängen. Anschließend wurde die Membran auf Papierhandtücher gelegt und bei Raumtemperatur für 15 min getrocknet. Eine vollständig getrocknete Membran erscheint opak.

### 3.10.6.4 Immunochemischer Nachweis der immobilisierten Proteine

Nach dem Trocknen der PVDF-Membran (s. 3.10.6.3) wurde diese für 45 min in Blockingpuffer mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran in DPBS für jeweils 10 sec wurde die Membran für 30 min in Blockingpuffer mit dem jeweiligen sekundären Antikörper inkubiert und anschließend erneut für zweimal 10 sec mit DPBS gewaschen. Zum Nachweis des sekundären Antikörpers, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert war, wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer mit 50 µl NBT-Lösung und 50 µl BCIP-Lösung bis zum Erreichen einer ausreichenden Farbentwicklung inkubiert.

DPBS:	NaCl	140 mM	AP-Puffer:	Tris-HCl	100 mM
	KCl	2,7 mM		NaCl	100 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM		MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM		pH 9,5	
	pH 7,4				

Blockingpuffer: DPBS + 1% BSA (GERBU, Gaiberg) + 0,05% Tween<sup>®</sup>-20

BCIP-Lösung: BCIP (BTS, Sankt Leon-Rot) 50 mg / ml in DMF

NBT-Lösung: NBT (BTS, Sankt Leon-Rot) 50 mg / ml in 70% (v/v) DMF

### 3.10.7 Immunofluoreszenzanalysen

2 ml LB-Medium, komplementiert mit Antibiotika, wurden mit 20 µl einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (3000 x g; 3 min; RT) und zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien in DPBS mit 2% (v/v) Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und dann dreimal mit DPBS gewaschen. Nach einstündigem Blocken mit 1% (w/v) BSA in DPBS erfolgte die Inkubation der Zellen mit den primären Antikörpern (Verdünnung immer 1:100) bei Raumtemperatur in DPBS + 0,1% (w/v) BSA für 60 min. Danach wurden die Bakterien dreimal mit DPBS gewaschen und mit einem Cy-2 konjugierten sekundären Antikörper (1:50) für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und in 40 µl DPBS aufgenommen. 10 µl der Bakteriensuspension wurden mit dem gleichen Volumen Einbettmedium auf einen Objektträger gebracht und vermischt. Das Präparat wurde mit einem Deckglas bedeckt und bei 4°C im Dunkeln bis zur vollständigen Aushärtung gelagert.

Einbettmedium:	Mowiol 4-88	2,4 g
	Glycerin (60°C)	6 g
	<i>A. bidest.</i>	6 ml, Inkubation über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur
	Tris-HCl (200 mM; pH 8,5)	12 ml
	DABCO	2,5% (w/v)

### 3.10.8 Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Um rekombinante Proteine mit einem His<sub>6</sub>-tag in besonders reiner Form zu erhalten, wurden diese aus SDS-Polyacrylamidgelen elektroeluiert. Dazu wurden die Proteine, wie unter 3.10.2 beschrieben, isoliert und anschließend in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer kommerziellen Färbelösung der Firma Qbiogene sichtbar gemacht (Electro-Blue<sup>TM</sup> Staining Solution). Bei dieser Lösung handelt es sich um ein nur leicht fixierendes Reagenz, wodurch die Elution aus dem Gel deutlich erleichtert wird. Da SDS mit dem Farbstoff interferiert und somit das Färben der Proteine negativ beeinflusst, musste die Menge an SDS durch dreimaliges Waschen des Polyacrylamidgels mit *A. bidest.* für jeweils 10 min reduziert werden. Danach wurde das Gel in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert, bis die gewünschte Intensität der Proteinbanden erreicht war. Die entsprechende Bande wurde mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und in einen mit Laemmli-Puffer gefüllten Dialyseschlauch (ZelluTrans, ROTH; MWCO: 4000 – 6000 Da) überführt, der an beiden Enden mit Kunststoffklammern dicht verschlossen wurde. Anschließend wurde der Dialyseschlauch in eine geeignete Elektrophoresekammer, gefüllt mit Laemmli-Puffer, gegeben. Die Elektroelution der Proteine erfolgte in einem elektrischen Feld mit einer Spannung von 100 V für 3 Stunden bei 4°C. Nach Beendigung der Elution wurde das Feld für 3 min kurz umgepolt, um eventuell an der Dialysemembran anhaftende Proteine wieder zu lösen. Anschließend wurde das Gelstück aus dem Dialyseschlauch entfernt und dieser in eine Schale mit PEG (15 – 20 kDa) gelegt. Durch das PEG erfolgte eine Einengung der Proben auf ca. 500 µl, wodurch die Proteine wesentlich konzentrierter vorlagen. Die konzentrierten Proben wurden dann für 5 Stunden gegen PBS bei 4°C dialysiert und anschließend mit *Detergent Absorber Gel* der Firma Roche behandelt, um das SDS aus den Proben zu entfernen. Dieser Schritt ist nötig, da SDS einen störenden Einfluss auf die Proteinbestimmung nach BRADFORD ausübt und somit zu falschen Ergebnissen führen würde. Das *Detergent Absorber Gel* wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die vom SDS befreiten Proben wurden bei -20°C gelagert.

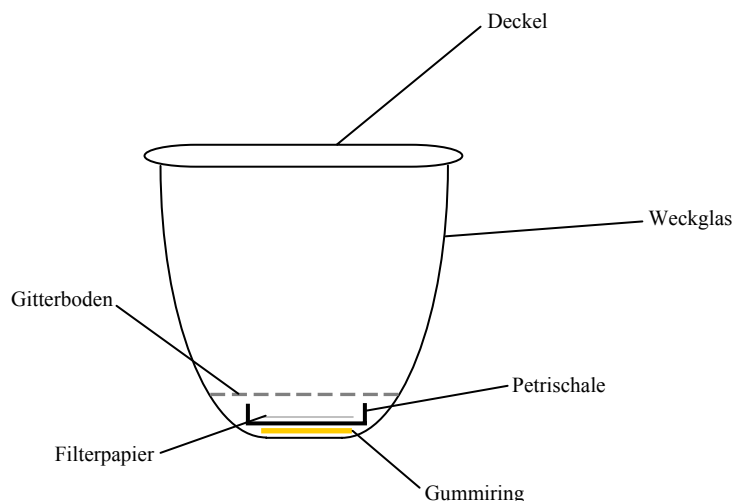
## 3.11 Immunologische Arbeiten

### 3.11.1 Arbeiten mit den Versuchstieren

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere (Balb/c-Mäuse) wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Zentrums für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE) des Universitätsklinikums Münster gehalten. Die spezifisch pathogenfreien Tiere wurden in IVC-Gestellen (*individually ventilated cages*) der Firma Tecniplast Deutschland GmbH (Hohenpreißenberg) gehalten und alle 3 bis 6 Monate stichprobenartig durch externe veterinärmedizinische Laboratorien auf mögliche Krankheiten hin untersucht.

### 3.11.2 Entnahme der Blutproben

Die Blutentnahme erfolgte am retroorbitalen Gefäßplexus mit Hilfe einer Hämatokritkapillare. Dazu wurden die Tiere mit dem Inhalationsanästhetikum Metofane (Janssen GmbH, Neuss) narkotisiert. Das Betäuben der Mäuse erfolgte in einem Weckglas, in dem sich eine Glaspetrischale mit einem Filterpapier unterhalb eines engmaschigen Gitterbodens befand. Abbildung 3.5 zeigt schematisch den verwendeten Versuchsaufbau.



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Narkotisierung der Versuchstiere.

300 µl Metofane wurden auf das Filterpapier pipettiert und das verschlossene Weckglas für 10 Minuten mit Hilfe einer Infrarotlampe erwärmt, um eine gesättigte Metofaneatmosphäre zu erzeugen. Anschließend wurden die Mäuse zur Narkotisierung in das Glas gegeben und nach Erreichen der Bewusstlosigkeit (30 – 60 sec) unter genauer Beobachtung für maximal zwei



weitere Minuten dort belassen. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Tiere entnommen und es erfolgte die Blutentnahme am retroorbitalen Gefäßplexus mit einer Hämatokritkapillare. Wenn möglich wurde in dieser Studie immer dasselbe Auge herangezogen. Maximal wurden 500 µl Blut pro Tier entnommen. Nach Beendigung der Blutentnahme wurde der Bulbus mit den Augenlidern bedeckt und sanft in die Augenhöhle gedrückt. Anschließend wurden die Tiere zurück in den Käfig gegeben.

### **3.11.3 Entnahme der Speichelproben**

Die Entnahme der Speichelproben erfolgte mit Hilfe kleiner Filtertampons. Um den Speichelfluss anzuregen, wurde den Tieren 50 µl einer Pilocarpinlösung (1 mg / ml Pilocarpin in DPBS; pH 7,4) intraperitoneal appliziert. Nach wenigen Minuten konnte eine deutlich gesteigerte Speichelsekretion beobachtet werden. Den Mäusen wurden die Filtertampons direkt vor das Maul gehalten, um den austretenden Speichel aufzufangen. Pro Tier wurden zwei Filtertampons verwendet. Die mit Speichel gefüllten Filtertampons wurden von ihrem Stiel entfernt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

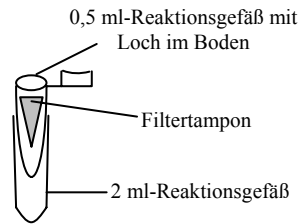
### **3.11.4 Aufbereitung der Blutproben**

Die Blutproben wurden nach der Entnahme für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10000 x g; 10 min; RT) und die Überstände vorsichtig in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Seren wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **3.11.5 Aufbereitung der Speichelproben**

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und anschließend das jeweilige Sekretgewicht bestimmt. Die Filtertampons wurden mit dem 10fachen des ermittelten Sekretgewichtes mit kaltem DPBS-PIB versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Proben durch mehrmaliges Invertieren oder durch kurzes Vortexen gemischt. Die Filtertampons wurden dann in 0,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, die in 2 ml-Reaktionsgefäße (ohne Deckel)

steckten (Abb. 3.6). Zuvor war bei den 0,5 ml-Reaktionsgefäßen der Boden mit einer Injektionsnadel durchstochen worden.



**Abb. 3.6:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Extraktion von Sekreten aus Filtertampons.

Durch Zentrifugation (10000 x g; 2 min; 4°C) wurde der Speichel aus den Filtertampons eluiert und anschließend in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Proteinaseinhibitor-Cocktail (100x PIC):

Aprotinin	0,1 mg / ml
Leupeptin Hemisulphat	0,5 mg / ml
AEBSF Hydrochlorid	4,8 mg / ml

Bestatin-Stammlösung (500x BES):

Bestatin	1 mg / ml
in DPBS	

PBS-PIB:

100x PIC	500 µl
500x BES	100 µl
Magermilchpulver (Fluka)	5% (w/v)
<i>A. bidest.</i>	ad 50 ml

### 3.11.6 Mukosale Immunisierung

Die mukosale Immunisierung erfolgte durch orales Applizieren des Lebendvektors. Dazu wurden 100 ml TB-Medium, welches mit Ampicillin supplementiert war, mit einer

Übernachtskultur der jeweiligen rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 Stämme inokuliert (1:100) und bei 37°C und 180 rpm für 4 h inkubiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und jedes Tier bekam pro Tag  $5 \times 10^9$  Bakterien (pCB1, pCB2, pCB3) oder  $2 \times 10^{10}$  Bakterien (pCB9, pCB10, pCB11), suspendiert in 50 µl Immunisierungspuffer, zu fressen. Dazu wurde das entsprechende Volumen Bakteriensuspension zentrifugiert (4000 x g; 10 min; 4°C) und die sedimentierten Zellen zweimal mit DPBS gewaschen, um eventuell vorhandenes Ampicillin aus dem Anzuchtmedium zu entfernen. Anschließend wurden die Bakterien in einem geeigneten Volumen Immunisierungspuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Der basische Immunisierungspuffer sollte die Überlebensrate der Bakterien bei ihrer Passage durch das saure Milieu des Magens erhöhen und somit zu einer besseren Kolonisierung der Mäuse beitragen. Zusätzlich enthielt der Puffer noch 50% (w/v) Glucose, um bei den Tieren die Akzeptanz zur Aufnahme der Bakteriensuspension zu erhöhen. Um Schäden an den Zellen aufgrund der hohen Osmolarität des verwendeten Puffers zu minimieren, wurden die Bakterien so schnell wie möglich den Mäusen oral appliziert. Abbildung 3.7 zeigt eine Maus bei der oralen Immunisierung.



**Abb. 3.7:** Orale Immunisierung einer Maus mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917.

Immunisierungspuffer:	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ / $\text{NaHCO}_3$	50 mM
	Glucose	50% (w/v)
	pH	9,76

### 3.11.7 Intraperitoneale Immunisierung mit rekombinanten Proteinen

Zur Überprüfung der Immunogenität der verwendeten Antigene wurden Mäuse mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen intraperitoneal immunisiert. Bei den Proteinen handelte es sich um Fusionsproteine mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag, die zuvor aus einem

SDS-Polyacrylamidgel elektroeluiert wurden. Die Proteine wurden zusammen mit einem Adjuvant (MPL<sup>®</sup> + TDM Adjuvant System, SIGMA) appliziert. Dazu wurde das Adjuvant mit 1 ml sterilem DPBS versetzt und für 2 – 3 Minuten durch Vortexen gemischt. Aliquots des Adjuvants wurden 1:1 mit dem entsprechenden Antigen in DPBS gemischt und auf 37°C erwärmt. Anschließend wurde den Tieren jeweils 15 µg Protein in einem Volumen von 200 µl mit Hilfe einer Subkutanspritze intraperitoneal appliziert. Drei Wochen später erfolgte eine weitere Immunisierung (Booster), die wie oben beschrieben durchgeführt wurde. Nach weiteren 14 Tagen wurde den Tieren, wie unter 3.11.2 beschrieben, Blut entnommen.

### 3.11.8 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Die quantitative Analyse der spezifischen humoralen Immunantwort gegen die verwendeten Antigene erfolgte mit Hilfe eines Endpunkt-ELISA nach der Methode von FREY *et al.* [1998]. Sowohl die verwendeten sekundären Antikörper, als auch das benutzte Substratsystem wurden im Überschuss eingesetzt, um sicherzustellen, dass der limitierende Faktor ausschließlich durch das titrierte Antigen dargestellt wird. Für jedes Antigen wurde experimentell die optimale Beschichtungskonzentration und der beste Beschichtungspuffer ermittelt. Dazu wurde die 96-well-Platten (Costar Corning Inc., NY) mit Antigenen einer Konzentration von 15 – 0,188 µg / ml beschichtet. Um einen eventuellen Einfluss des pH-Wertes des Beschichtungspuffers zu ermitteln, wurden drei verschiedene Puffersysteme verwendet. Ein saurer 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0, ein neutraler, salzreicher LPBS-Puffer mit pH 7,0 und ein alkalischer 50 mM Natriumkarbonatpuffer mit pH 9,0. Bezüglich des Puffersystems erwies sich der neutrale LPBS-Puffer als am besten geeignet. Für die verwendeten Antigene wurden folgende Konzentrationsoptima für das Beschichten der Platten ermittelt: p60 → 6 µg / ml; OspA → 3 µg / ml und OspG → 6 µg / ml.

Für die Analyse der von den Tieren entnommenen Proben wurden die Platten mit den jeweiligen Antigenen, gelöst in LPBS, mit der optimalen Konzentration über Nacht bei 4°C mit einem Volumen von 75 µl pro Kavität beschichtet. Anschließend wurden die Platten 4x mit 300 µl DPBS-T (DPBS mit 0,05% (v/v) Tween-20) je Kavität gewaschen und 2 Stunden bei 37°C mit 250 µl DPBS-T + 5% (w/v) Magermilchpulver pro Kavität inkubiert. Dieser Schritt diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen (Blocken). Nach erneutem viermaligen Waschen der Platten mit DPBS-T, wurden die Proben so auf die Platten aufgetragen, dass eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 titriert werden konnte. In jeder Kavität befand sich ein Volumen von 75 µl und die äußeren Kavitäten wurden mit *A. bidest.*

gefüllt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Platten 4x gewaschen und der sekundäre Antikörper (GAM-IgG-PO bzw. GAM-IgA-PO) mit einer Verdünnung von 1:5000 in DPBS-T + 0,5% (w/v) Magermilchpulver auf die Platten aufgebracht (75 µl / Kavität). Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C wurden die Platten erneut 4x mit DPBS-T gewaschen und in jede Kavität 75 µl Substratlösung [FREY *et al.*, 2000] pipettiert. Es folgte eine Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur von exakt 20 Minuten. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 125 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jede Kavität beendet und die Extinktion bei  $\lambda = 450$  nm mit Hilfe eines ELISA-Lesegerätes innerhalb der nächsten 30 Minuten bestimmt.

Substratlösung:      Lösung A      20 ml  
                         Lösung B      500 µl  
                         frisch ansetzen und bei RT im Dunkeln lagern.

Lösung A:            Kaliumcitrat    205 mM  
                         H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>            3,075 mM  
                         pH 4,0

Lösung B:            3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin      41 mM  
                         Tetrabutylammoniumborhydrid      8,2 mM  
                         gelöst in Dimethylacetamid.

LPBS:                Natriumphosphatpuffer              10 mM  
                         NaCl                                      10 mM  
                         pH                                            7,0

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Konstruktion der oralen Lebendvektoren

#### 4.1.1 Verwendete Antigene

Als Modelantigene wurden die äußeren Membranproteine OspA bzw. OspG aus *Borrelia burgdorferi* und das extrazelluläre Protein p60 aus *Listeria monocytogenes* ausgewählt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Polypeptidantigenen handelt es sich um Oberflächenproteine von zwei Humanpathogenen, die ihren Wirt auf unterschiedliche Art und Weise infizieren und besiedeln.

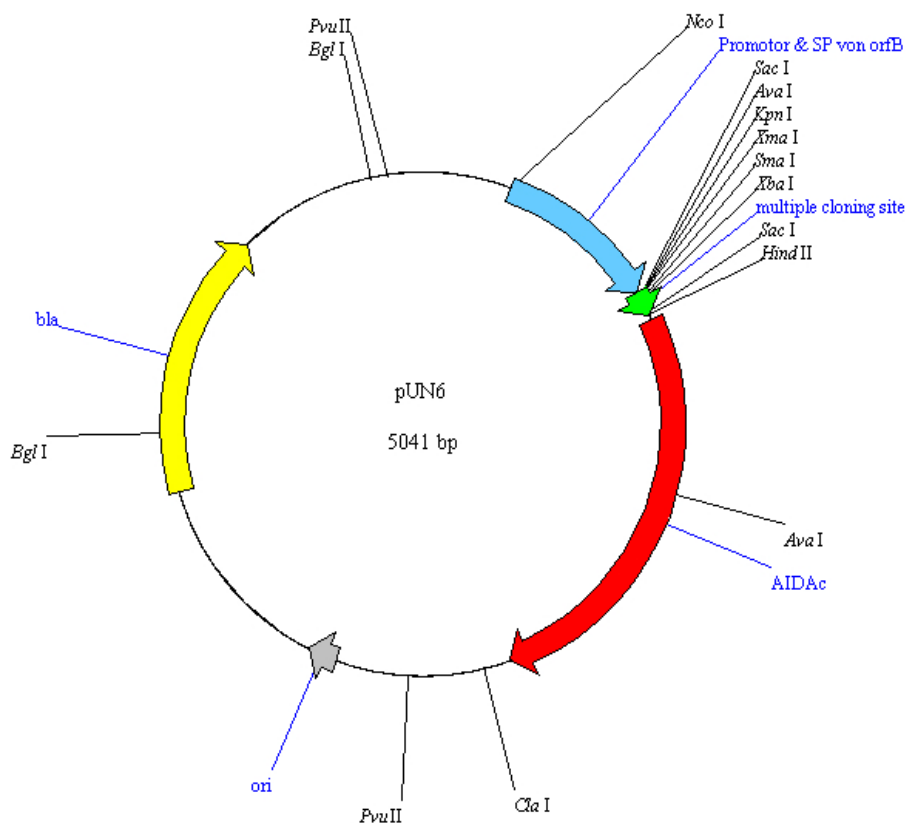
Die Spirochäte *Borrelia burgdorferi* ist ein extrazelluläres Bakterium und der Erreger der sogenannten Lyme-Borreliose [BURGDORFER *et al.*, 1982]. Bei dieser Krankheit handelt es sich um eine Zoonose, da die Bakterien durch Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen werden. Solange sich die Spirochäten im Mitteldarm der Zecke befinden, exprimieren sie OspA auf ihrer Oberfläche [BARBOUR *et al.*, 1985]. Die genaue Funktion dieses Proteins mit einem Molekulargewicht von 31 kDa ist noch nicht vollständig geklärt, aber es handelt sich vermutlich um ein Adhäsion, welches es den Borrelien ermöglicht, im Mitteldarm der Zecken zu verbleiben [PAL *et al.*, 2000]. Saugt eine Zecke nun Blut von ihrem Wirt und gelangt dieses in den Mitteldarm, entfernen die Bakterien OspA von ihrer Oberfläche und können, da sie nicht länger an den Epithelzellen adherieren, diesen verlassen und durch die Hämolymphe in die Speicheldrüsen einwandern [DE SILVA *et al.*, 1996; SCHWAN *et al.*, 2000]. Über den Speichel gelangen die Bakterien in den Säugerwirt und exprimieren dort das äußere Membranprotein OspG mit einem Molekulargewicht von 22 kDa. [WALLICH *et al.*, 1995]. STEERE *et al.* [1998] konnten zeigen, dass  $\alpha$ OspA-Antikörper im Serum eine Infektion mit Borrelien verhindern können. Ob dies auch für  $\alpha$ OspG-Antikörper zutrifft, ist noch nicht geklärt.

Das dritte verwendete Antigen, p60, stammt aus *Listeria monocytogenes*. Bei diesem Pathogen handelt es sich um ein intrazelluläres, gram-positives, stäbchenförmiges Bakterium, das einzeln oder in kurzen Ketten vorkommt und mit kontaminierten Nahrungsmitteln aufgenommen wird. p60 ist ein extrazelluläres Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 60 kDa und ist essentiell für eine erfolgreiche Invasion der Wirtszellen [KUHN *et al.*, 1989; BUBERT *et al.*, 1992]. Weiterhin besitzt es eine Murein-Hydrolase-

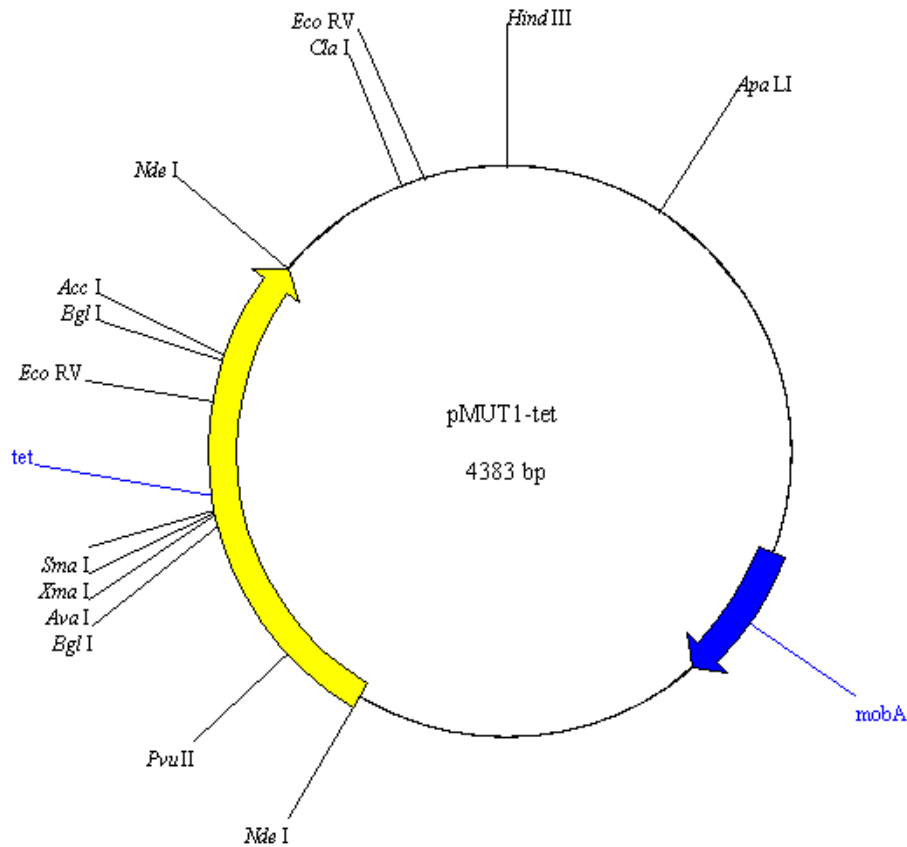
Aktivität [WUENSCHER *et al.*, 1993] und Listerien mit einer Mutation im *iap*-Gen, welches für p60 kodiert, zeigen eine gestörte Zellteilung und tendieren zur Bildung langer Ketten [PILGRIM *et al.*, 2002]. In dieser Arbeit wurde ein N-terminal verkürztes und mutiertes p60 verwendet, da das authentische p60 Protein von *E. coli* NISSLE 1917 überhaupt nicht exprimiert wurde.

#### 4.1.2 Konstruktion der Immunisierungsplasmide

Die kodierenden Sequenzen für die in 4.1.1 beschriebenen Antigene wurden mit Hilfe einer spezifischen PCR amplifiziert und in die Vektoren pUN6 [NIEWERTH, 2000] bzw. pMUT1-tet [BLUM-OEHLER *et al.*, 2003] kloniert (Abb. 4.1 & Abb. 4.2).



**Abb. 4.1:** Restriktionskarte des Plasmids pUN6. Der Vektor trägt die Promotorregion von *orfB* und die kodierende Sequenz für das Signalpeptid (SP), welches für den Transport aus dem Cytoplasma notwendig ist. Es folgt eine *multiple cloning site* und daran anschließend die kodierende Sequenz für die C-terminalen fünf Aminosäuren von AIDA-I sowie die kodierende Sequenz für AIDA<sup>c</sup>. Aufgrund von nur fünf C-terminalen Aminosäuren von AIDA-I wird ein mögliches Fusionsprotein, welches durch Insertion einer kodierenden Sequenz in die *multiple cloning site* zwischen Signalpeptid und AIDA<sup>c</sup> entsteht, nicht in das extrazelluläre Milieu entlassen, sondern bleibt kovalent mit dem Translokator verbunden.

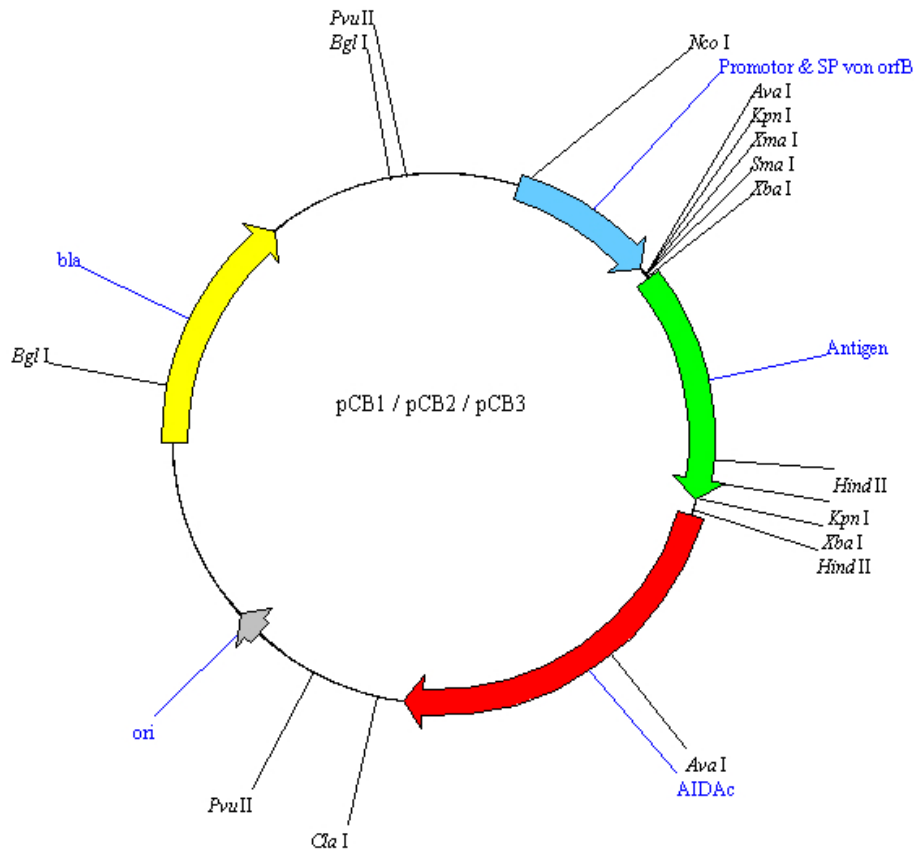


**Abb. 4.2:** Restriktionskarte des Plasmids pMUT1-tet. Ausgangsplasmid war das kryptische Plasmid pMUT1 aus *E. coli* NISSLE 1917, in das über eine *NdeI*-Schnittstelle eine Tetracyclinresistenzkassette eingesetzt wurde.

Die in der PCR verwendeten Primer besitzen am 5'-Ende eine angefügte Restriktionschnittstelle, über die die Amplifikate nach der Restriktion in den mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektor kloniert wurden.

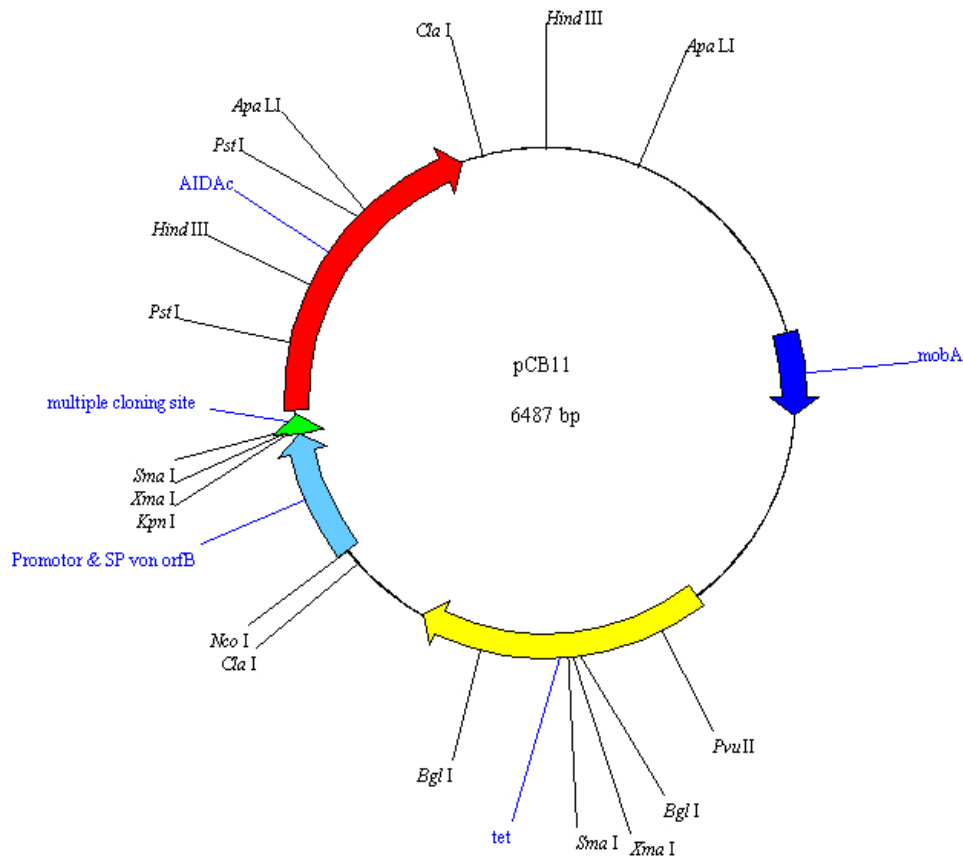
Für die Klonierung in den Vektor pUN6 wurden folgende Primerpaare für die PCR verwendet: ospA-for / ospA-rev (ospA), ospG-for / ospG-rev (ospG) und p60-for / p60 rev (p60). Die Amplifikate wurden über eine *XbaI*-Schnittstelle in das Plasmid pUN6 eingefügt und so die Vektoren pCB1, pCB2 und pCB3 (Abb. 4.3) erzeugt.



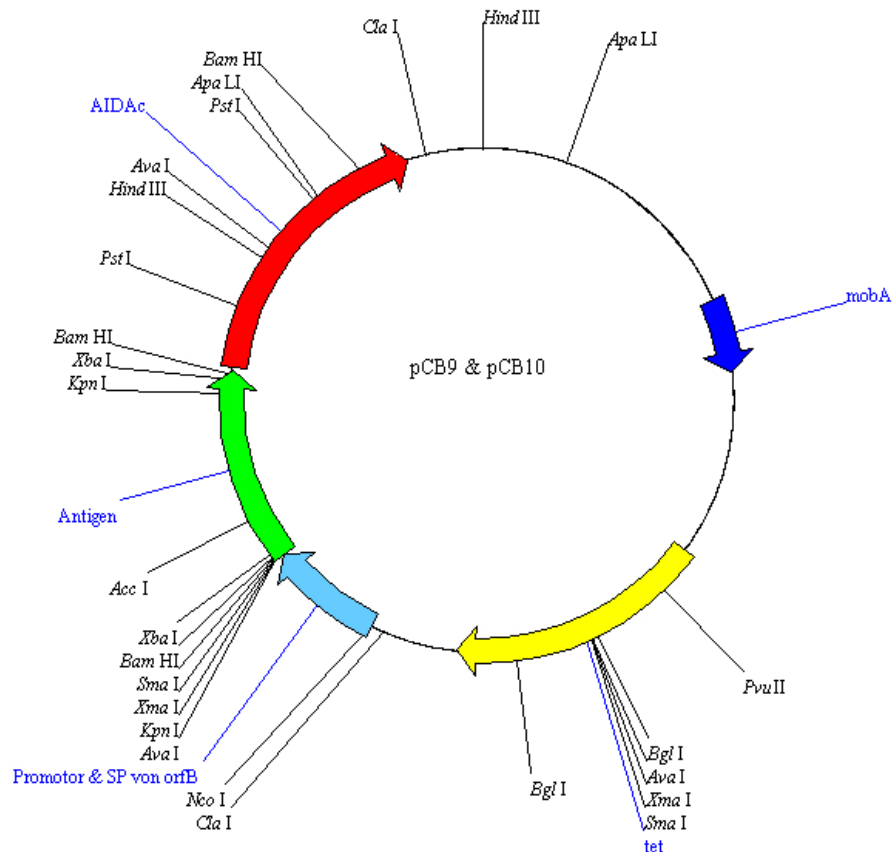


**Abb. 4.3:** Restriktionskarte der Plasmide pCB1, pCB2 und pCB3. Die drei Plasmide unterscheiden sich bezüglich der kodierenden Sequenz für das Antigen, welches über eine *Xba*I-Schnittstelle in den Vektor kloniert wurde. Bei pCB1 handelt es sich, bei dem in der Karte als Antigen bezeichneten Bereich, um die kodierende Sequenz für OspA. Die Größe von pCB1 beträgt 5866 bp. Im Fall von pCB2 steht „Antigen“ für die kodierende Sequenz eines N-terminal verkürzten und mutierten p60-Protein. Die Größe von pCB2 beträgt 5863 bp. Bei pCB3 beinhaltet „Antigen“ die kodierende Sequenz für OspG. Die Größe von pCB3 beträgt 5635 bp.

Für die Klonierungen in das kryptische Plasmid pMUT1-tet wurden die Primer AIDA-for und AIDA-rev verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass der Forward-Primer *upstream* des Promotorbereiches von *orfB* bindet und der Reverse-Primer *downstream* des Stopcodons von AIDA<sup>c</sup>. In Abhängigkeit davon, welcher Vektor als Matrize für die PCR verwendet wurde (pCB1, pCB3, pUN6), wurden die Plasmide pCB9, pCB10 und pCB11 (Abb. 4.4 & Abb. 4.5) generiert.



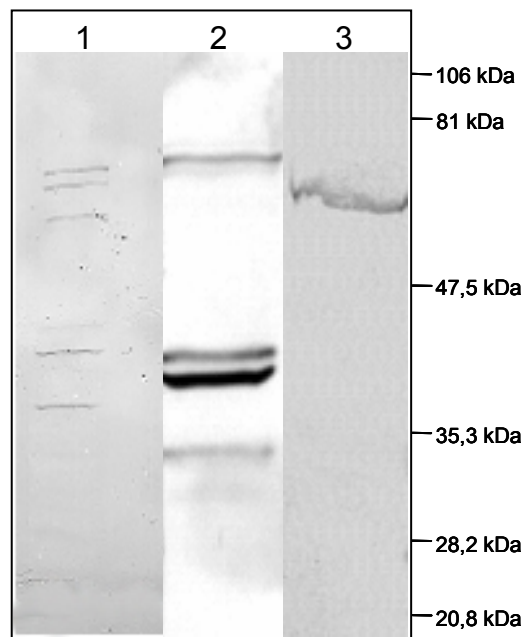
**Abb. 4.4:** Restriktionskarte des Vektors pCB11. Ausgangsplasmid war der Vektor pMUT1-tet, in dem über eine *Cla*I-Schnittstelle der Promotorbereich von *orfB*, die kodierende Sequenz des Signalpeptids, eine *multiple cloning site* und die kodierenden Sequenzen für die fünf C-terminalen Aminosäuren von AIDA-I und AIDA<sup>c</sup> eingefügt wurden. Aufgrund von nur fünf C-terminalen Aminosäuren von AIDA-I wird ein mögliches Fusionsprotein, welches durch Insertion einer kodierenden Sequenz in die *multiple cloning site* zwischen Signalpeptid und AIDA<sup>c</sup> entsteht, nicht in das extrazelluläre Milieu enlassen, sondern bleibt kovalent mit dem Translokator verbunden.



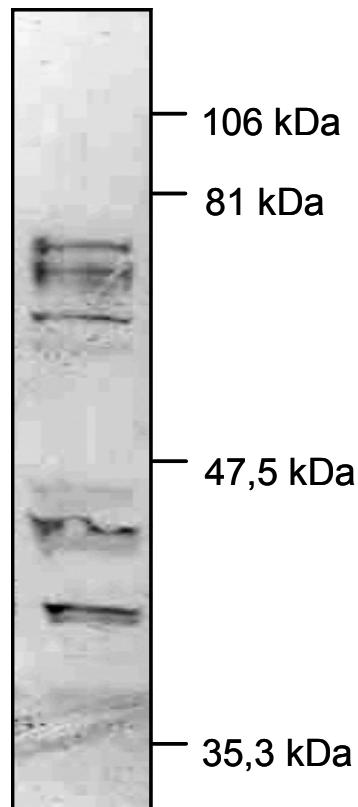
**Abb. 4.5:** Restriktionskarte der Vektoren pCB9 & pCB10. Ausgangsplasmid war der Vektor pMUT1-tet, in dem über eine *Cla*I-Schnittstelle der Promotorbereich von *orfB*, die kodierende Sequenz des Signalpeptids, eine *multiple cloning site* und die kodierenden Sequenzen für die fünf C-terminalen Aminosäuren von AIDA-I und AIDA<sup>c</sup> eingefügt wurden. In die *multiple cloning site* wurden die kodierenden Sequenzen für ospA bzw. ospG über eine *Xba*I-Schnittstelle kloniert. pCB9 trägt die genetische Information für OspA und pCB10 für OspG. Aufgrund von nur fünf C-terminalen Aminosäuren von AIDA-I wird ein mögliches Fusionsprotein, welches durch Insertion einer kodierenden Sequenz in die *multiple cloning site* zwischen Signalpeptid und AIDA<sup>c</sup> entsteht, nicht in das extrazelluläre Milieu enlassen, sondern bleibt kovalent mit dem Translokator verbunden.

## 4.2 Analyse der oralen Lebendvektoren

Die in 4.1.2 beschriebenen Plasmide wurden in dem *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  kloniert, mit Hilfe von Restriktionsanalysen untersucht und anschließend durch Elektroporation in den probiotischen *E. coli* Stamm NISSLE 1917 transformiert. Die Expression der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine wurde mit Hilfe von *Western Blots* und Immunofluoreszenzmikroskopie überprüft. Abbildung 4.6 zeigt einen *Western Blot* der mit Gesamtzellextrakten aus rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 durchgeführt wurde. Die Fusionsproteine OspA-AIDA<sup>c</sup> und OspG-AIDA<sup>c</sup> werden gut exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Expression von p60-AIDA<sup>c</sup> nur sehr schwach, obwohl dieses Protein von dem *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  gut exprimiert wird (Abb. 4.7). In Spur 1 und Spur 2 sind Abbaubanden der Proteine AIDA<sup>c</sup>-p60 und AIDA<sup>c</sup>-OspA zu erkennen.



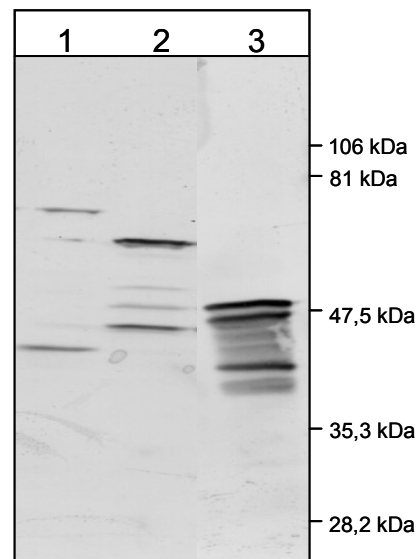
**Abb. 4.6:** *Western Blot* Analyse von rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917. Gesamtzellproteine aus exponentiell wachsenden Kulturen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und anschließend durch *semi dry blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler  $\alpha$ p60-Antikörper (Spur 1) oder polyklonales Serum gegen OspA (Spur 2) bzw. gegen OspG (Spur 3) eingesetzt. Die Detektion des gebundenen Erstantikörpers erfolgte mit einem konjugierten sekundären Antikörper GAM-AP und Substratreagenzien. Wie aus der Abbildung ersichtlich, exprimieren die Bakterien die Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine. **Spur 1:** Gesamtzellextrakt aus *E. coli* NISSLE 1917, transformiert mit pCB2 (p60-AIDA<sup>c</sup>). **Spur 2:** Gesamtzellextrakt aus *E. coli* NISSLE 1917 / pCB1 (OspA-AIDA<sup>c</sup>) **Spur 3:** Gesamtzellextrakt aus *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 (OspG-AIDA<sup>c</sup>).



**Abb. 4.7:** *Western Blot* von *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert mit pCB2. Gesamtzellextrakte einer exponentiell wachsenden Kultur wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und durch *semi dry blotting* auf eine PVDF-Membran transferiert. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler Antikörper gegen p60 verwendet. Die Detektion des gebundenen Erstantikörpers erfolgte mit einem konjugierten sekundären Antikörper GAM-AP und Substratreagenzien. Das Fusionsprotein p60-AIDA<sup>c</sup> wird gut exprimiert.

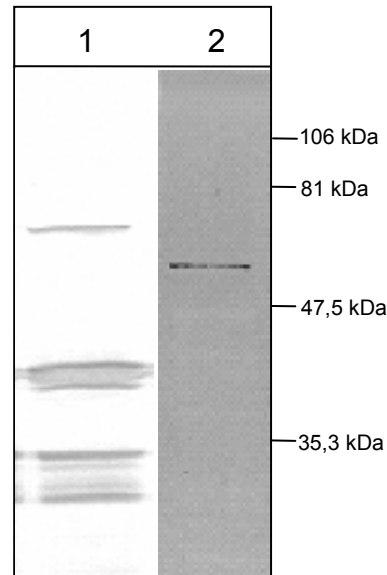
Die in den Abbildungen 4.6 und 4.7 gezeigten *Western Blots* wurden mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 bzw. *E. coli* DH5 $\alpha$  durchgeführt, die die Plasmide pCB1, pCB2 bzw. pCB3 tragen. Diese Plasmide entstanden aus dem Ausgangsplasmid pUN6 [NIEWERTH, 2000] durch Klonierung der kodierenden Sequenzen für die verwendeten Antigene in die *multiple cloning site*. Da diese Plasmide für den *E. coli* Stamm NISSLE 1917 recht artifiziell sind, besteht die Gefahr, dass die Bakterien diese verlieren, sobald der Selektionsdruck durch Ampicillin nicht mehr vorhanden ist. Um eine möglicherweise größere genetische Stabilität zu erreichen, wurde als Ausgangsplasmid für weitere Klonierungen der Vektor pMUT1-tet verwendet. Dieser Vektor basiert auf einem der beiden kryptischen Plasmide, pMUT1 und pMUT2, welche in *E. coli* NISSLE 1917 vorkommen. Diese Plasmide zeichnen sich durch hohe genetische Stabilität aus, wobei ihre genaue Funktion noch unklar ist [BLUM-OEHLER *et al.*, 2003]. Durch Insertion einer Tetracyclinresistenzkassette über eine *NdeI*-Schnittstelle in den Vektor pMUT1 entstand das Plasmid pMUT1-tet [ALTENHOEFER *et al.*, 2004]. Der natürliche

Promotorbereich von *orfB*, die kodierende Sequenzen für das Signalpeptid, den C-terminalen Teil von AIDA-I (fünf Aminosäuren), die Antigene OspA / OspG und den Translokator AIDA<sup>c</sup> wurden in den Vektor pMUT1-tet über eine *ClaI*-Schnittstelle eingefügt. Die daraus resultierenden Plasmide pCB9 und pCB10, welche für die Fusionsproteine OspA-AIDA<sup>c</sup> bzw. OspG-AIDA<sup>c</sup> kodieren, wurden mittels Restriktionsanalyse untersucht und in den *E. coli* Stamm NISSLE 1917 transformiert. Das Kontrollplasmid pCB11 unterscheidet sich von den Plasmiden pCB9 und pCB10 durch das Fehlen der kodierenden Sequenz für ein Antigen. Wie aus der Abbildung 4.8 ersichtlich, werden die Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine von *E. coli* NISSLE 1917 exprimiert, die zuvor mit den Plasmiden pCB9 bzw. pCB10 transformiert wurden. Der *Western Blot* wurde mit  $\alpha$ fp12, einem AIDA<sup>c</sup>-spezifischen, polyklonalen Antiserum als primären Antikörper durchgeführt. Der durch die N-terminalen Fusionen von OspA bzw. OspG an AIDA<sup>c</sup> resultierende Unterschied der jeweiligen Molekulargewichte der Fusionsproteine im Vergleich zum authentischen AIDA<sup>c</sup>-Protein kann durch die Verwendung von  $\alpha$ fp12 im *Western Blot* nachgewiesen werden.



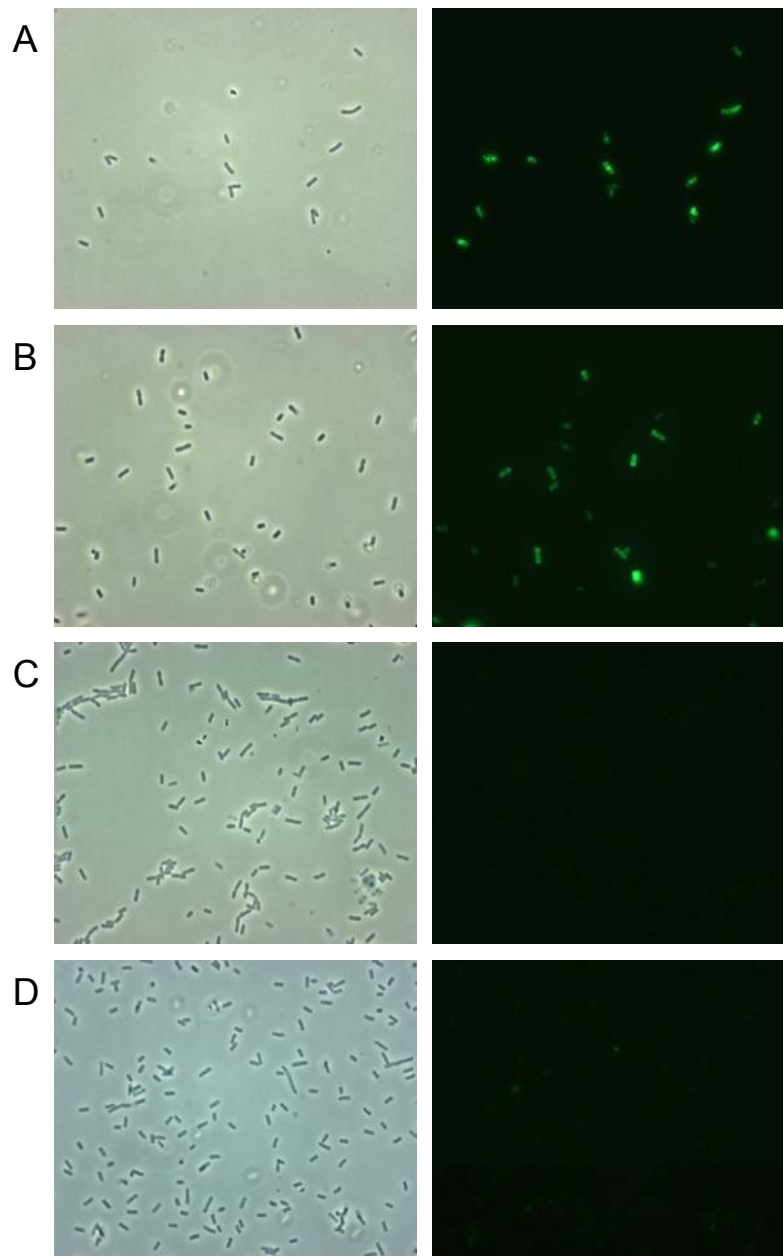
**Abb. 4.8:** *Western Blot* Analyse von rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917. Gesamtzellproteine aus exponentiell wachsenden Kulturen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und anschließend durch *semi dry blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Als primärer Antikörper wurde das AIDA<sup>c</sup>-spezifische, polyklonale Serum  $\alpha$ fp12 eingesetzt. Die Detektion des gebundenen Erstantikörpers erfolgte mit einem konjugierten sekundären Antikörper GAR-AP und Substratreagenzien. Die rekombinanten Bakterien exprimieren die Fusionsproteine OspA-AIDA<sup>c</sup> (**Spur 1**) und OspG-AIDA<sup>c</sup> (**Spur 2**) bzw. nur AIDA<sup>c</sup> (**Spur 3**).

Auch mit den spezifischen Seren gegen OspA und OspG konnte die Expression der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine durch rekombinante *E. coli* NISSLE 1917, transformiert mit den Plasmiden pCB9 bzw. pCB10, mit Hilfe von *Western Blots* nachgewiesen werden (Abb. 4.9).



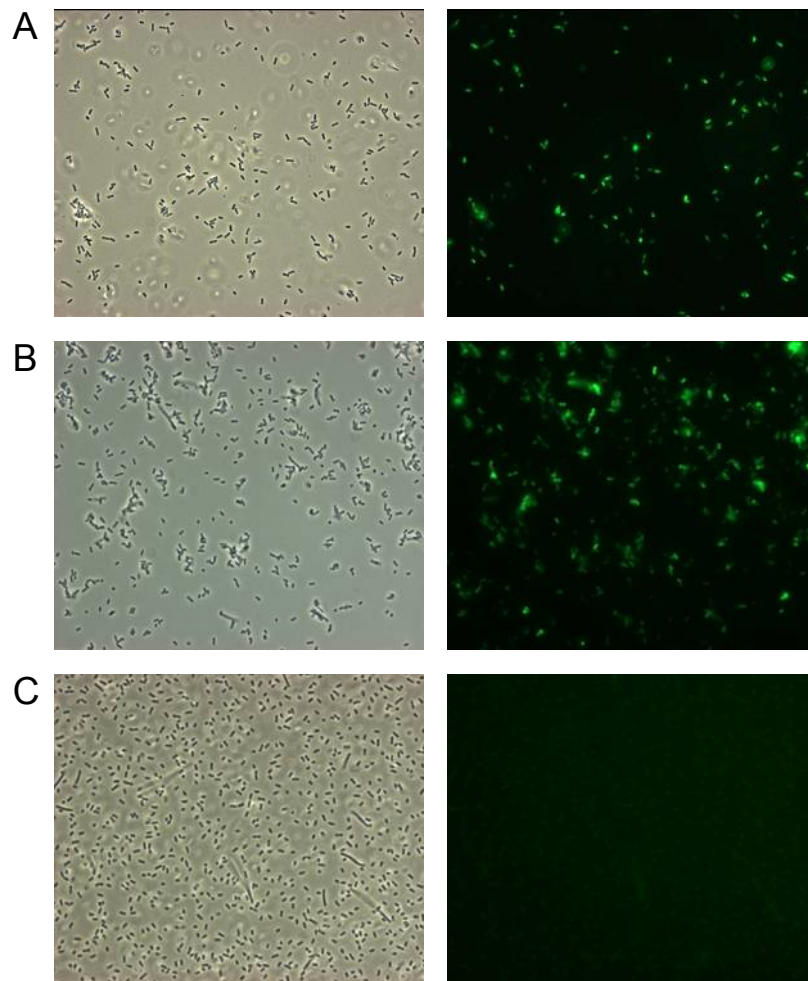
**Abb. 4.9:** *Western Blot* Analyse von rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917. Gesamtzellproteine aus exponentiell wachsenden Kulturen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und anschließend durch *semi dry blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Als primäre Antikörper wurden Seren spezifisch gegen OspA (**Spur 1**) und OspG (**Spur 2**) eingesetzt. Die Detektion des gebundenen Erstantikörpers erfolgte mit einem konjugierten sekundären Antikörper GAM-AP und Substratreagenzien. **Spur1:** Gesamtzellextrakt aus *E. coli* NISSLE 1917 / pCB9 (OspA-AIDA<sup>c</sup>). **Spur 2:** Gesamtzellextrakt aus *E. coli* NISSLE 1917 / pCB10 (OspG-AIDA<sup>c</sup>).

Nachdem die Expression der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine mittels *Western Blot* analysiert war, stellte sich die Frage, ob die rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 die Fusionsproteine auch auf der Bakterienoberfläche präsentieren. Denn nur wenn die Antigene auch auf der Oberfläche präsentiert werden, sind sie dem Immunsystem zugänglich und diese Klone kommen für die Vakzinierung in Frage. Die Oberflächenpräsentation der Antigene wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie (s. 3.10.7) nachgewiesen. Wie aus den Abbildungen 4.10 und 4.11 ersichtlich, lassen sich die Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine OspA-AIDA<sup>c</sup> und OspG-AIDA<sup>c</sup> auf der Oberfläche der rekombinanten Bakterien nachweisen. Dagegen konnte p60-AIDA<sup>c</sup> auf der Bakterienoberfläche mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht detektiert werden.



**Abb.4.10:** Immunofluoreszenzmarkierung rekombinanter *E. coli* NISSLE 1917. Zur Markierung der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine auf der Bakterienoberfläche wurden die intakten Bakterien mit den jeweiligen Antisera gegen die exprimierten Antigene inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde GAM-Cy2 verwendet. Exzitation und Emission dieses Fluoreszenzfarbstoffes erfolgten im Wellenlängenbereich von 530 bis 585 nm. In der rechten Spalte sind die Fluoreszenzaufnahmen abgebildet, in der linken die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen. **A** zeigt den *E. coli* Stamm NISSLE 1917 / pCB1, der OspA-AIDA<sup>c</sup> exprimiert. In **B** ist der *E. coli* Stamm NISSLE 1917 / pCB3 dargestellt, der OspG-AIDA<sup>c</sup> exprimiert. **C** zeigt den *E. coli* Stamm NISSLE 1917 / pCB2, der p60-AIDA<sup>c</sup> exprimiert. Die Expression des Fusionsproteins ist jedoch so schwach, dass eine Immunofluoreszenzmarkierung nicht möglich war. **D** stellt die Negativkontrolle *E. coli* NISSLE 1917 / pUN6 dar. Als primärer Antikörper wurde ein Mix aus den Antisera gegen OspA, OspG und p60 verwendet. Die Bakterien sind mit einer Vergrößerung von 1:1000 dargestellt.

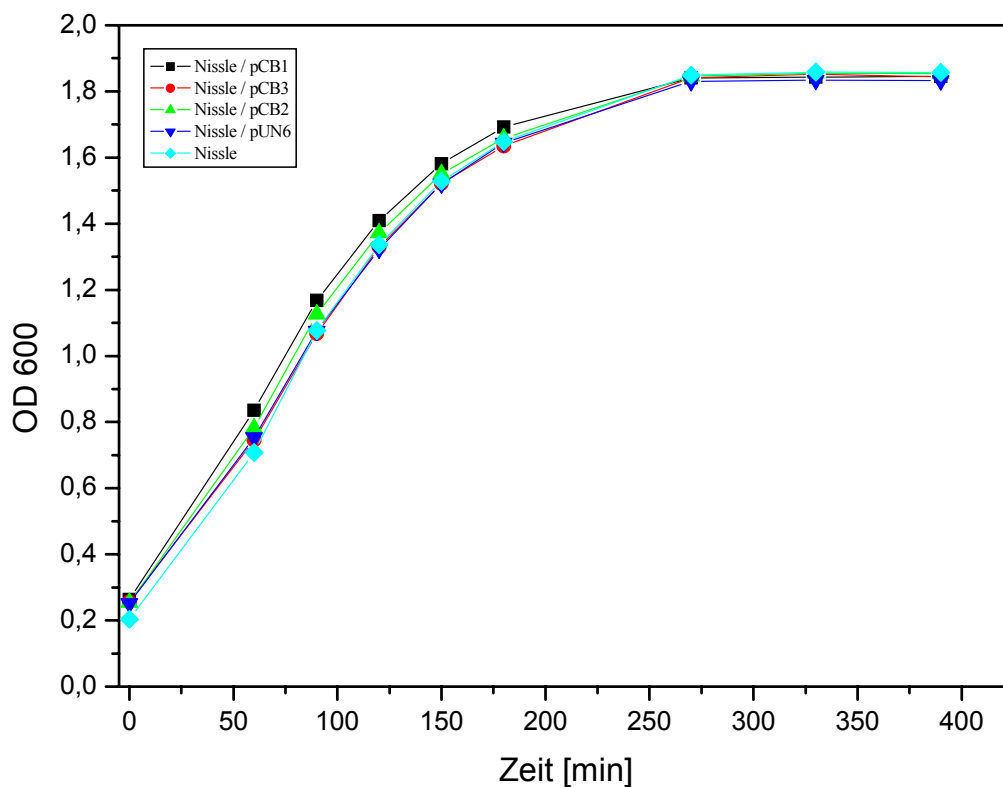




**Abb. 4.11:** Immunofluoreszenzmarkierung rekombinanter *E. coli* NISSLE 1917 transformiert mit pCB9 (**A**), pCB10 (**B**) und pCB11 (**C**). Zur Markierung der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine auf der Bakterienoberfläche wurden die intakten Bakterien mit dem jeweiligen Antiserum gegen OspA bzw. OspG inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde GAM-Cy2 verwendet. Exzitation und Emission dieses Fluoreszenzfarbstoffes erfolgten im Wellenlängenbereich von 530 bis 585 nm. In der rechten Spalte sind die Fluoreszenzaufnahmen abgebildet, in der linken die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen. **A** zeigt *E. coli* NISSLE 1917 / pCB9, der OspA-AIDA<sup>c</sup> exprimiert. In **B** ist *E. coli* NISSLE 1917 / pCB10 dargestellt, der OspG-AIDA<sup>c</sup> auf seiner Oberfläche präsentiert und **C** zeigt die Negativkontrolle *E. coli* NISSLE 1917 / pCB11. Als primärer Antikörper wurde ein Mix aus den Antiseren gegen OspA und OspG verwendet. Die Bakterien sind mit einer Vergrößerung von 1:640 dargestellt.

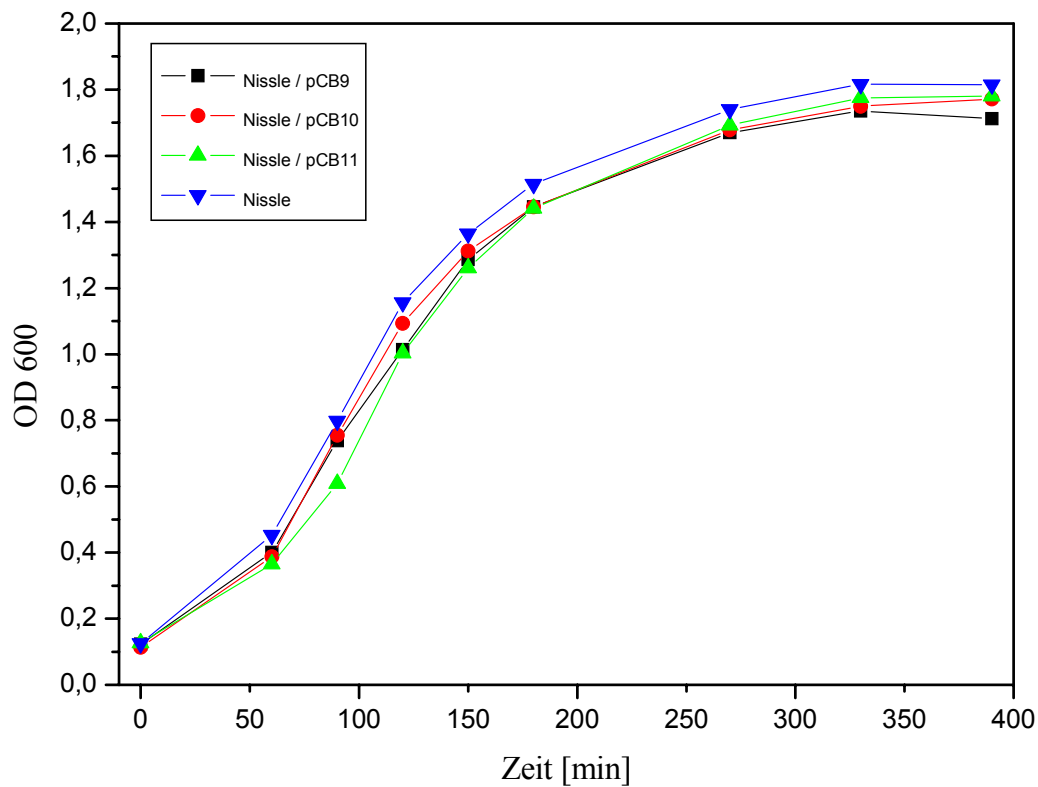
### 4.3 Analyse des Wachstums der Lebendvektoren

Um einen eventuellen Einfluss der Expression der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine auf das Wachstum der rekombinanten Bakterien zu ermitteln, wurde das Wachstum anhand der Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Zum Vergleich wurde auch das Wachstum des Wildtyps von *E. coli* NISSLE 1917 ermittelt. Abbildung 4.12 zeigt die grafische Darstellung der Ergebnisse der Analyse des Wachstums von Bakterien transformiert mit pCB1, pCB2, pCB3 bzw. pUN6, sowie des Wildtyps. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten von rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 und dem Wildtyp konnte nicht beobachtet werden. Die Expression der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine hat offensichtlich keinen negativen Effekt auf das Wachstum.



**Abb. 4.12:** Wachstumskurve von rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 und dem Wildtyp. Übernachtskulturen der Bakterien wurden mit LB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,2 verdünnt und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Unterschiede im Wachstum zwischen den rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 und dem Wildtyp sind nicht zu erkennen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

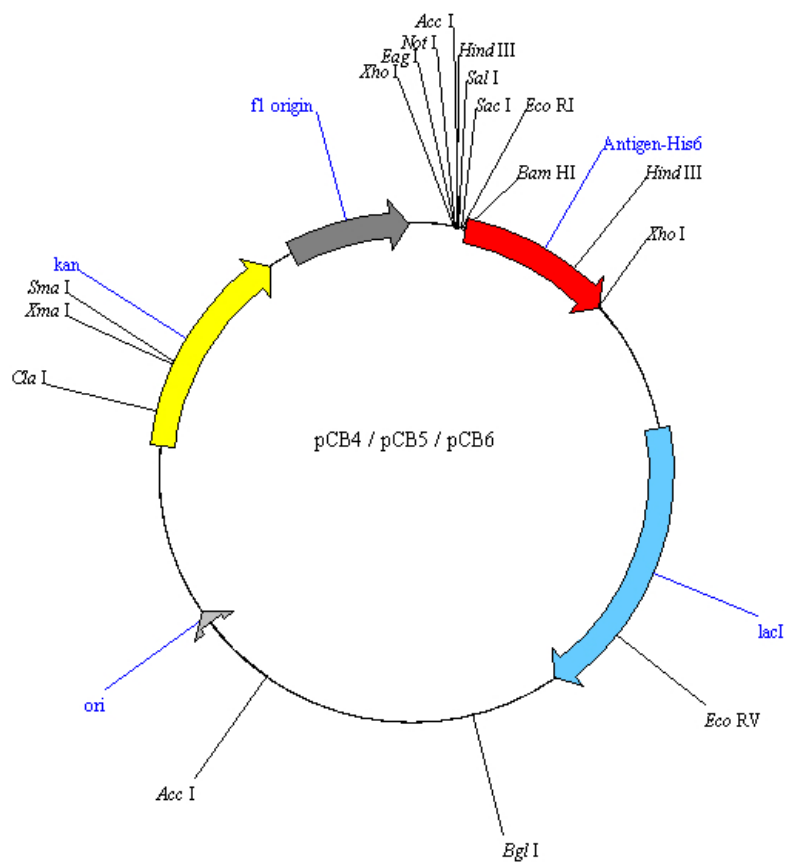
Weiterhin wurde das Wachstum der Bakterien untersucht, die mit den Plasmiden pCB9, pCB10 bzw. pCB11 transformiert wurden. Diese Plasmide basieren auf dem kryptischen Plasmid pMUT1 aus *E. coli* NISSLE 1917, welches von Natur aus in den Bakterien zu finden ist und sich durch hohe genetische Stabilität auszeichnet [BLUM-OEHLER *et al.*, 2003]. Auch hier zeigte sich kein Unterschied im Wachstum der rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13:** Grafische Darstellung der Ergebnisse zur Analyse des Wachstums von rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 und dem Wildtyp. Übernachtskulturen der Bakterien wurden mit LB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 verdünnt und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Unterschiede im Wachstum zwischen den rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 und dem Wildtyp sind nicht zu erkennen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

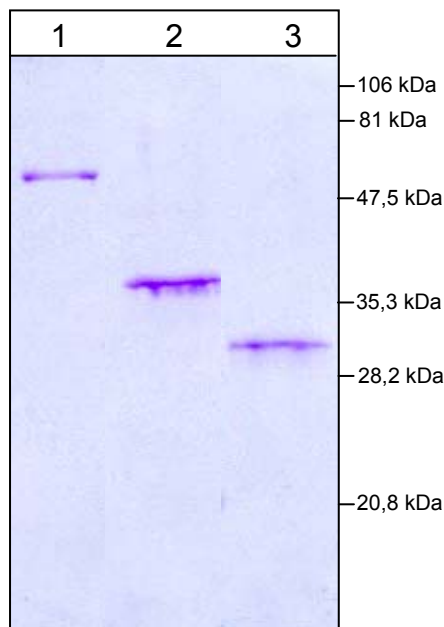
#### 4.4 Klonierung und Isolierung von Fusionsproteinen mit His<sub>6</sub>-tag

Die Analyse der spezifischen Immunantworten der Versuchstiere gegen die verwendeten Antigene erfolgte mit Hilfe eines ELISA. Um die ELISA-Platten mit den verwendeten Antigenen zu beschichten, mussten die Proteine zuvor isoliert werden. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen für die Antigene in den Vektor pET24b(+) kloniert. Die auf diese Weise entstandenen Plasmide pCB4, pCB5 und pCB6 kodieren für Fusionsproteine mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** Restriktionskarte der Plasmide pCB4, pCB5 und pCB6. Die drei Plasmide unterscheiden sich bezüglich der kodierenden Sequenz für das Antigen, welches über eine *Bam*HI-Schnittstelle und eine *Xho*I-Schnittstelle in den Vektor kloniert wurde. Bei pCB4 handelt es sich bei dem in der Karte als Antigen bezeichneten Bereich um die kodierende Sequenz für OspA. Die Größe von pCB4 beträgt 6134 bp. Im Fall von pCB5 steht „Antigen“ für das p60 Protein und das Plasmid besitzt eine Größe von 6686 bp. Bei pCB6 beinhaltet „Antigen“ die kodierende Sequenz für OspG. Die Größe von pCB6 beträgt 5903 bp.

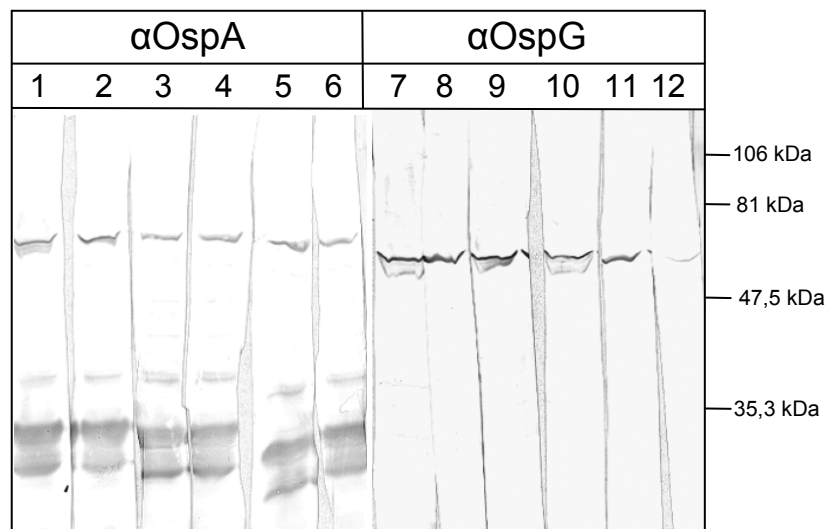
Die Vektoren pCB4, pCB5 und pCB6 wurden jeweils in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert und die Proteine mittels der Immobilisierten Metall Affinitätschromatographie (IMAC) [PORATH *et al.*, 1975], wie in 3.10.2 beschrieben, isoliert. Leider ließ sich die Synthese der Proteine in den Bakterien durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG) nur mittelmäßig induzieren. Dennoch konnte eine ausreichende Menge an rekombinanten Proteinen mit His<sub>6</sub>-tag für die Beschichtung der ELISA-Platten und der intraperitonealen Immunisierung der Versuchstiere isoliert werden. Abbildung 4.15 zeigt das Ergebnis der Isolierung der Fusionsproteine. Aufgrund des C-terminalen His<sub>6</sub>-tag erscheinen die Proteine im Polyacrylamidgel bei einer etwas größeren Molekularmasse, als für die Antigene ohne His<sub>6</sub>-tag errechnet.



**Abb. 4.15:** SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) zur Überprüfung der Isolierung der Fusionsproteine mit His<sub>6</sub>-tag. Je 0,5  $\mu$ g der gereinigten Fusionsproteine p60•His<sub>6</sub> (**Spur 1**), OspA•His<sub>6</sub> (**Spur 2**) und OspG•His<sub>6</sub> (**Spur 3**) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und die Proteine mit Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue R 250 gefärbt.

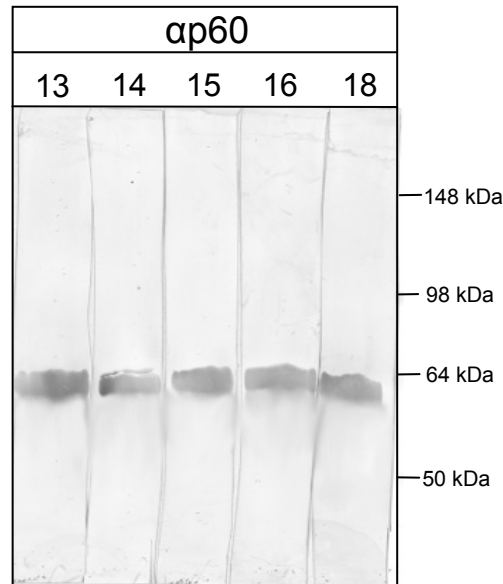
#### 4.5 Intraperitoneale Immunisierung mit rekombinanten Antigenen

Zur Überprüfung der Immunogenität der verwendeten Antigene wurden Mäuse mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen intraperitoneal immunisiert (s. 3.11.7). Bei den Proteinen handelte es sich um die rekombinanten Antigene p60, OspA und OspG mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag, die zuvor aus einem SDS-Polyacrylamidgel elektroeluiert wurden. Die Proteine wurden zusammen mit einem Adjuvant (MPL<sup>®</sup> + TDM Adjuvant System, SIGMA) appliziert. Die systemische Immunantwort der Versuchstiere gegen die verwendeten Antigene wurde mit Hilfe von *Western Blots* und Immunofluoreszenzmikroskopie analysiert. Als primäre Antikörper wurden die polyklonalen Seren der immunisierten Versuchstiere eingesetzt. Die Abbildungen 4.16 und 4.17 zeigen *Western Blots*, durchgeführt mit den einzelnen aus Mäusen genommenen Seren. Wie aus den Abbildungen ersichtlich, haben alle immunisierten Versuchstiere auf die Immunisierung mit den gereinigten Antigenen reagiert und zeigen eine deutliche systemische Immunantwort.



**Abb. 4.16:** *Western Blot* Analyse von rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 zur Kontrolle der systemischen Immunantwort von intraperitoneal immunisierten Versuchstieren. Gesamtzellproteine aus exponentiell wachsenden Kulturen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (12,5%) aufgetrennt und anschließend durch *semi dry blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Als primäre Antikörper wurden die polyklonalen Seren der Versuchstiere eingesetzt. Die Detektion der gebundenen Primärantikörper erfolgte mit einem konjugierten sekundären Antikörper GAM-AP und Substratreagenzien. Die Zahlen über dem *Western Blot* stehen für die Nummer des Versuchstieres, von dem das verwendete Serum stammt. Die Mäuse #1-6 wurden mit OspA•His<sub>6</sub> intraperitoneal immunisiert und die Mäuse #7-12 mit OspG•His<sub>6</sub>.

Auf Grund der nur schwachen Expression von p60 in *E. coli* NISSLE 1917, wurde der *Western Blot* zur Analyse der Immunantwort der immunisierten Versuchstiere mit gereinigtem p60•His<sub>6</sub> durchgeführt.



**Abb.4.17:** *Western Blot* Analyse zur Kontrolle der systemischen Immunantwort von Versuchstieren, immunisiert intraperitoneal mit gereinigtem p60•His<sub>6</sub>. Isoliertes p60•His<sub>6</sub> wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und anschließend durch *semi dry blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Als primäre Antikörper wurden die polyklonalen Seren der Versuchstiere eingesetzt. Die Detektion der gebundenen Primärantikörper erfolgte mit einem konjugierten sekundären Antikörper GAM-AP und Substratreagenzien. Die Zahlen über dem *Western Blot* stehen für die Nummer des Versuchstieres, von dem das verwendete Serum stammte. Von Maus #17 konnte keine Probe genommen werden, da das Versuchstier vorher verstarb.

Neben den *Western Blots* wurden zur Analyse der systemischen Immunantwort der Versuchstiere auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (s. 3.10.7). Dazu wurden intakte, rekombinante *E. coli* NISSLE 1917, die die Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine OspA-AIDA<sup>c</sup> oder OspG-AIDA<sup>c</sup> auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den Seren der intraperitoneal immunisierten Mäuse inkubiert. Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgte durch einen, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2 konjugierten Sekundärantikörper GAM-Cy2. Auch die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass die Versuchstiere Antikörper gegen die applizierten Antigene gebildet hatten (Abb. 4.18). Auf eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der Seren der Mäuse, die mit p60 immunisiert wurden, wurde aufgrund der schwachen Expression des AIDA<sup>c</sup>-p60-Fusionsproteins in *E. coli* NISSLE 1917 verzichtet.

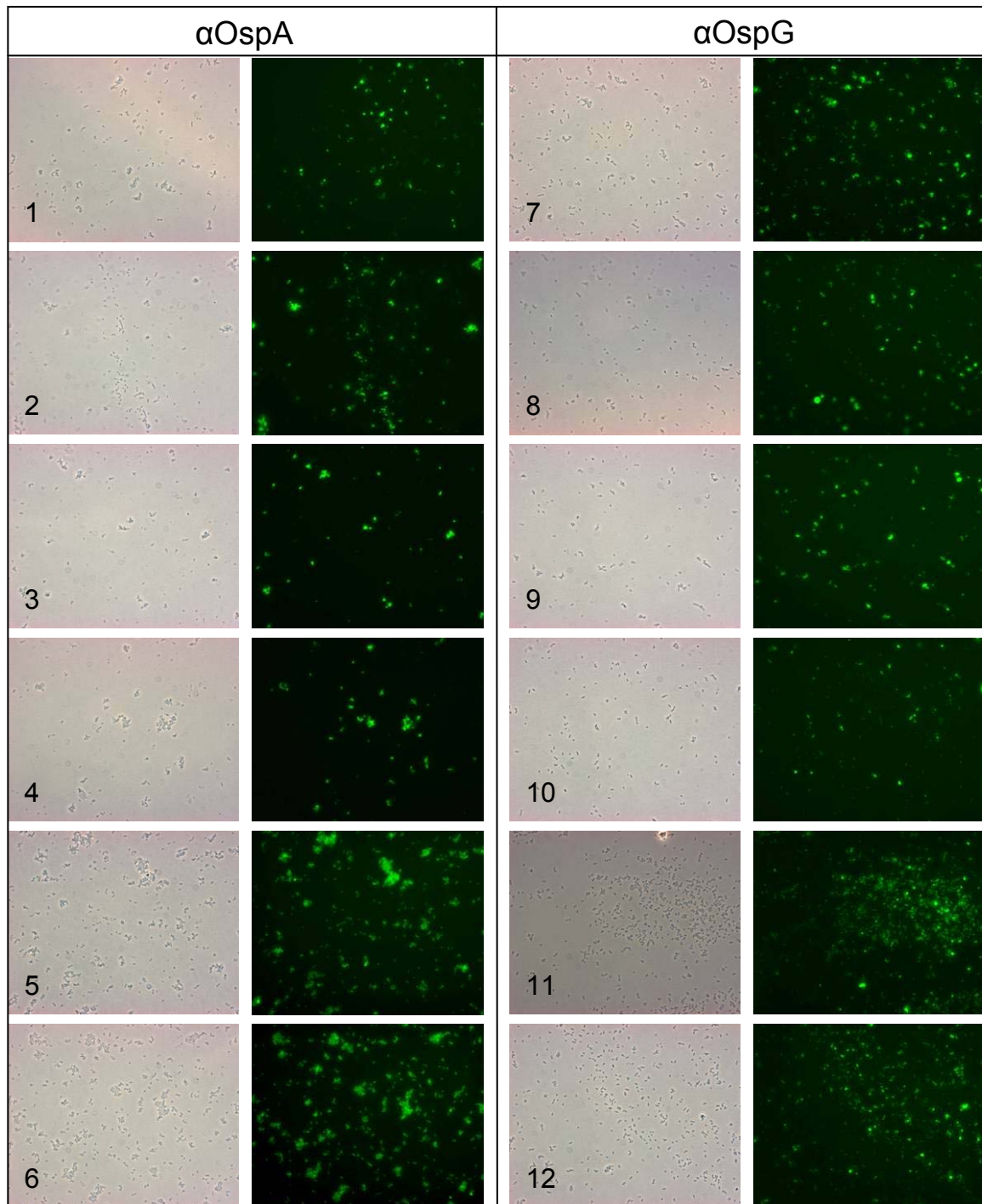


Abb. 4.18: Immunofluoreszenzmarkierung zur Kontrolle der systemischen Immunantwort der Versuchstiere, intraperitoneal immunisiert mit gereinigtem OspA•His<sub>6</sub> (1-6) und OspG•His<sub>6</sub> (7-12). Rekombinante *E. coli* NISSLE 1917, die die jeweiligen Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine exprimieren, wurden mit den Seren der immunisierten Versuchstiere inkubiert und als sekundärer Antikörper wurde GAM-Cy2 verwendet. Exzitation und Emission dieses Fluoreszenzfarbstoffes erfolgten im Wellenlängenbereich von 530 bis 585 nm. Die Zahlen in der Abbildung stehen für die Nummer des Versuchstieres, von dem das verwendete Serum stammt. Die Bakterien sind mit einer Vergrößerung von 1:640 dargestellt.



#### 4.6 Durchführung der oralen Immunisierungsstudie

Die orale Immunisierung der Versuchstiere erfolgte mit den rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917, transformiert mit den entsprechenden Immunisierungsplasmiden. Die Immunisierung wurde, wie unter 3.11.6 beschrieben, nach den in den beiden nachfolgenden Tabellen dargestellten Schemata durchgeführt.

**Tab. 4.1:** Verwendetes Immunisierungsschema für die Immunisierung mit den rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917, transformiert mit den Plasmiden pCB1, pCB2, pCB3 bzw. pUN6.

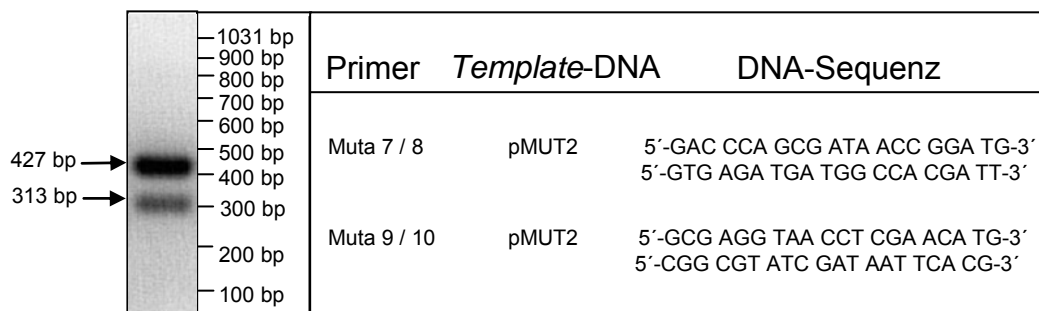
TAG	HANDLUNG
-8	Ankunft der Versuchstiere
-3-0	1. Ohrmarkierung 2. Entnahme der Präimmunproben
1-10	Orale Immunisierung mit $5 \times 10^9$ Bakterien
11	Fäcesproben für PCR-Diagnostik gesammelt
17-18	Entnahme der Postimmunproben
24	Fäcesproben für PCR-Diagnostik gesammelt
25-31	Orale Immunisierung mit $5 \times 10^9$ Bakterien ( <i>Booster</i> )
32	Fäcesproben für PCR-Diagnostik gesammelt
38	Fäcesproben für PCR-Diagnostik gesammelt
39-40	Entnahme der Postimmunproben

**Tab. 4.2:** Verwendetes Immunisierungsschema für die Immunisierung mit den rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917, transformiert mit den Plasmiden pCB9, pCB10 und pCB11.

TAG	HANDLUNG
-7	Ankunft der Versuchstiere
-1	1. Ohrmarkierung 2. Entnahme der Präimmunproben
1-14	Orale Immunisierung mit $2 \times 10^{10}$ Bakterien
21	Entnahme der Postimmunproben
22-28	Orale Immunisierung mit $2 \times 10^{10}$ Bakterien ( <i>Booster</i> )
36	Entnahme der Postimmunproben

#### 4.7 Etablierung der *E. coli* NISSLE 1917-spezifischen PCR

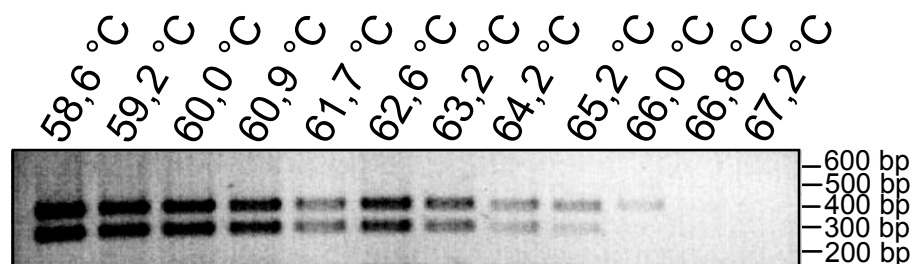
Da der *E. coli* Stamm NISSLE 1917 normalerweise in der Darmflora von Mäusen nicht vorkommt und somit kein natürlicher Besiedler dieser Tiere ist, musste im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob und über welchen Zeitraum dieser Bakterienstamm in der Lage ist, den Gastrointestinaltrakt der Mäuse zu kolonisieren. Der Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 in den Fäcesproben der Versuchstiere erfolgte, wie in 3.9.11 beschrieben, mit Hilfe einer *E. coli* NISSLE-spezifischen PCR [BLUM-OEHLER *et al.*, 2003]. Diese Methode basiert auf der Amplifikation von zwei DNA-Fragmenten, die auf einem der beiden stabilen kryptischen Plasmide lokalisiert sind. Für die PCR wurden die Primer Muta 7/8 und Muta 9/10 verwendet, die alle gegen das kryptische Plasmid pMUT2 gerichtet sind. Die amplifizierten DNA-Fragmente besitzen eine Länge von 427 bp (Muta 7/8) und 313 bp (Muta 9/10). Abbildung 4.19 zeigt das Ergebnis einer solchen PCR.



**Abb. 4.19:** PCR-Diagnostik zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917. Die Methode beruht auf dem Nachweis des kryptischen Plasmids pMUT2, welches spezifisch für *E. coli* NISSLE 1917 ist. Für die PCR wurden die Primer Muta 7/8 und Muta 9/10 verwendet, die gegen pMUT2 gerichtet sind. Die amplifizierten DNA-Fragmente besitzen eine Länge von 427 bp (Muta 7/8) und 313 bp (Muta 9/10). Zusätzlich sind noch die Sequenzen der verwendeten Primer angegeben. Dem PCR-Ansatz wurden 0,1 µl einer *E. coli* NISSLE 1917-Suspension zugesetzt. Nach Beendigung der PCR wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel (1,5%) elektrophoretisch getrennt und die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt.

#### 4.7.1 Optimierung der *E. coli* NISSLE-spezifischen PCR

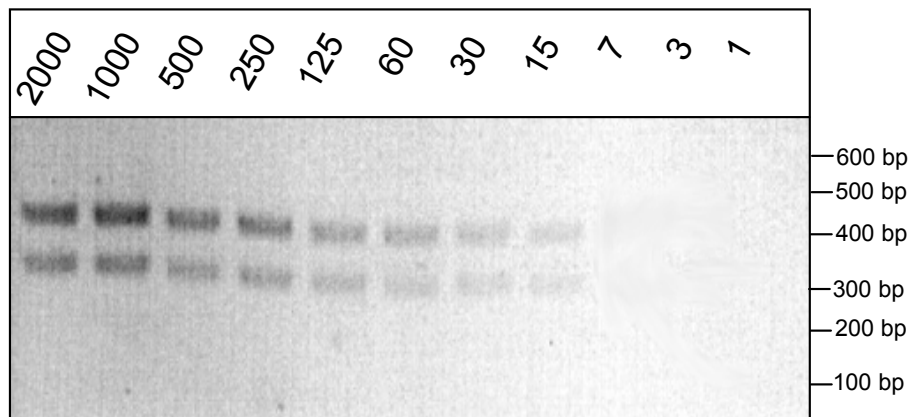
Die von BLUM-OEHLER *et al.* [2003] angegebene *Annealing*-Temperatur von 60°C zum Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 mit Hilfe der NISSLE-spezifischen PCR in den Fäcesproben von Mäusen erwies sich in dieser Studie als ungeeignet, da neben den beiden erwarteten Fragmenten von 313 bp und 427 bp auch unspezifische Fragmente unterschiedlicher Größe auftraten. Diese unspezifischen Fragmente besaßen zwar nie die Größe der erwarteten PCR-Produkte, traten jedoch interessanterweise auch in den Fäcesproben der nicht immunisierten Tiere auf. Fragmente der Größe von 313 bp oder 427 bp konnten bei der Analyse der Präimmunproben in keinem Fall beobachtet werden. Eine Möglichkeit, um die Amplifikation unspezifischer Fragmente zu verhindern oder wenigstens zu verringern, ist eine Erhöhung der *Annealing*-Temperatur. Mit Hilfe einer Gradienten-PCR, bei der verschiedene *Annealing*-Temperaturen verwendet werden, wurde die höchstmögliche Temperatur ermittelt, bei der die Primer Muta 7 / 8 und Muta 9 / 10 noch an das kryptische Plasmid pMUT2 (*Template*-DNA) binden und somit die beiden Fragmente in den erwarteten Größen von 313 bp und 427 bp amplifiziert werden. Wie aus der Abbildung 4.20 ersichtlich, werden beide Fragmente bis zu einer *Annealing*-Temperatur von 65,2°C amplifiziert. Bei 66°C ist auf dem Gel nur noch das 427 bp-Fragment zu erkennen und bei noch höheren Temperaturen sind keine Amplifikate mehr nachweisbar. Ausgehend von diesen Ergebnissen, wurde die PCR zum Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 mit einer *Annealing*-Temperatur von 64,2°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur das 313 bp-Fragment etwas besser amplifiziert wurde, als bei 65,2°C. Bei dieser Temperatur kam es nicht mehr zur Amplifikation von unspezifischen Fragmenten.



**Abb. 4.20:** Gradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen *Annealing*-Temperatur für den spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917. Die jeweils verwendeten *Annealing*-Temperaturen sind angegeben. Nach Beendigung der PCR wurde die DNA in einem Agarosegel (1,5%) elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Bis zu einer *Annealing*-Temperatur von 65,2°C werden die beiden Fragmente mit den erwarteten Größen von 313 bp und 427 bp amplifiziert.

#### 4.7.2 Sensitivität der PCR zum Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917

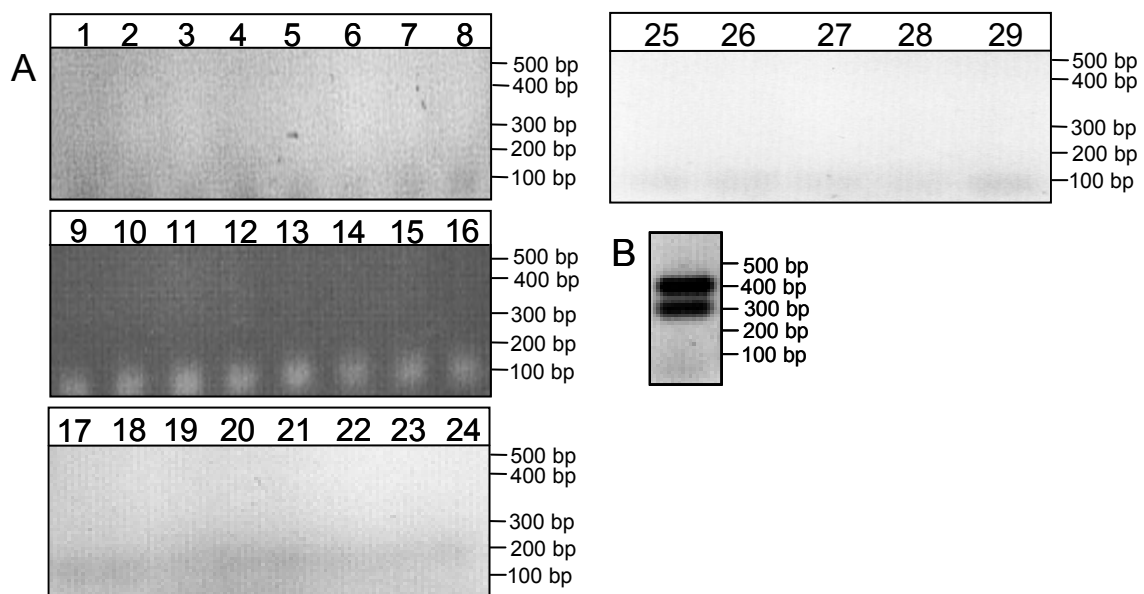
Nachdem die Bedingungen für die PCR zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 optimiert waren, musste als nächstes die Sensitivität dieses Tests ermittelt werden. Dazu wurde den PCR-Ansätzen eine unterschiedliche Anzahl an *E. coli* NISSLE 1917 als *Template* zugesetzt. Die Bakterien stammten aus einer exponentiell wachsenden Kultur und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Auf diese Weise sollte untersucht werden, wie viele Bakterien notwendig sind, um noch Amplifikate zu erhalten. Wie aus der Abbildung 4.21 ersichtlich, reicht eine Anzahl von nur 15 Bakterien aus, um *E. coli* NISSLE 1917 noch detektieren zu können. Der spezifische Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 mit Hilfe der mit ganzen Bakterien durchgeführten PCR ist damit sehr sensitiv.



**Abb. 4.21:** Sensitivität der PCR zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917. Zur Überprüfung der Sensitivität der PCR zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 wurde in die PCR-Ansätze eine unterschiedliche Anzahl von *E. coli* NISSLE 1917 als *Template* gegeben. Die Zahlen über den einzelnen Spuren geben die Anzahl der zugesetzten Bakterien pro PCR-Ansatz wieder. Nach Beendigung der PCR wurde die DNA in einem Agarosegel (2%) elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Eine Anzahl von 15 Bakterien reicht aus, um *E. coli* NISSLE 1917 zu detektieren.

### 4.7.3 Kontrolle der Besiedlung der Versuchstiere mit *E. coli* NISSLE 1917

Da, wie bereits unter 4.7 erwähnt, der *E. coli* Stamm NISSLE 1917 normalerweise in der Darmflora von Mäusen nicht vorkommt und somit kein natürlicher Besiedler dieser Tiere ist, musste im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob und über welchen Zeitraum dieser Bakterienstamm in der Lage ist, den Gastrointestinaltrakt zu kolonisieren. Weiterhin musste überprüft werden, ob die Versuchstiere nicht etwa schon vor der Immunisierung eventuell mit *E. coli* NISSLE 1917 kontaminiert waren. Zu diesem Zweck wurden Fäcesproben vor der ersten Immunisierung der Mäuse gesammelt und mit Hilfe der NISSLE 1917-spezifischen PCR auf das Vorkommen von *E. coli* NISSLE 1917 untersucht. Als *Template* für die PCR wurde aus den Fäcesproben isolierte Plasmid-DNA verwendet. In keiner der untersuchten Fäcesproben ließ sich *E. coli* NISSLE 1917 mit Hilfe der PCR nachweisen (Abb. 4.22). In Anbetracht der hohen Sensitivität des Testes ist daher davon auszugehen, dass alle Versuchstiere vor der Immunisierung frei von *E. coli* NISSLE 1917 waren.



**Abb. 4.22:** PCR-Diagnostik zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917. Untersucht wurden die Fäcesproben der Versuchstiere vor der Immunisierung mit *E. coli* NISSLE 1917. Nach Beendigung der PCR wurde die DNA in einem Agarosegel (1,5%) elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Zahlen über den einzelnen Spuren geben die Nummern der jeweiligen Versuchstiere an. In keiner der untersuchten Fäcesproben konnte *E. coli* NISSLE 1917 nachgewiesen werden (A) und es ist davon auszugehen, dass die Versuchstiere nicht mit diesem Bakterienstamm kontaminiert waren. B zeigt die Positivkontrolle.

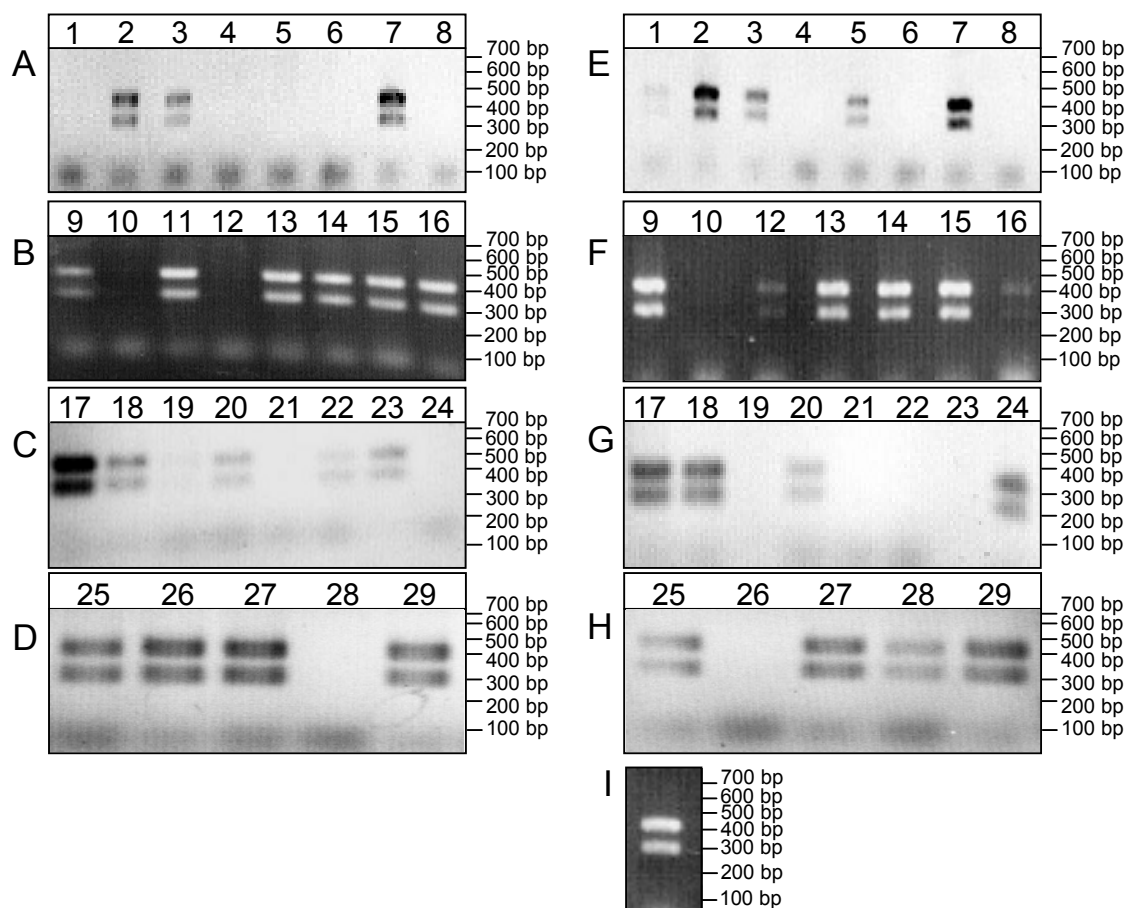
Zur besseren Übersicht zeigt Tabelle 4.3 noch einmal, welche Versuchstiere mit welchen rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 oral immunisiert wurden und welche Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine die Bakterien auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nachdem sichergestellt war, dass alle Versuchstiere vor der Immunisierung frei von *E. coli* NISSLE 1917 waren, wurden die Immunisierungen gemäß der in Tabelle 4.1 dargestellten Immunisierungsschemata durchgeführt.

**Tab. 4.3:** Zusammenstellung der für die orale Immunisierung verwendeten rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 und die von den Bakterien exprimierten Fusionsproteine, sowie die Nummern der Versuchstiere, die mit den unterschiedlichen Bakterien immunisiert wurden.

Versuchstiernummer	In <i>E. coli</i> NISSLE 1917 transformiertes Plasmid	Exprimiertes Antigen-AIDA <sup>c</sup> -Fusionsprotein
1-8	pCB1	OspA-AIDA <sup>c</sup>
9-16	pCB3	OspG-AIDA <sup>c</sup>
17-24	pCB2	p60-AIDA <sub>c</sub>
25-29	pUN6	AIDA <sup>c</sup> (Kontrolle)

Zur Kontrolle der Besiedlung mit den rekombinanten Bakterien wurden Fäcesproben unmittelbar nach der letzten oralen Immunisierung (11. Tag), am 17. Tag und 24. Tag gesammelt, sowie direkt nach der letzten *Booster*-Immunisierung (32. Tag) und sechs Tage später am 38. Tag. Eine weitere Probenentnahme erfolgt am 45. Tag. Am Tag unmittelbar nach der letzten Immunisierung waren alle Versuchstiere mit *E. coli* NISSLE 1917 besiedelt. Auch eine Woche später ließen sich in 18 von 29 Fäcesproben (62%) die Bakterien nachweisen. Nach weiteren sieben Tagen waren die Proben aller Versuchstiere jedoch negativ. Direkt nach der *Booster*-Immunisierung waren wieder alle Fäcesproben positiv in Bezug auf das Vorhandensein von *E. coli* NISSLE 1917 und eine Woche später konnten in 19 von 26 Stuhlproben (73%) die Bakterien detektiert werden. Drei Mäuse verstarben während der Studie bei der Blutentnahme (#11, #19 und #23), so dass von diesen Tieren keine Fäcesproben nach der *Booster*-Immunisierung gesammelt werden konnten und sich die Gesamtzahl der Versuchstiere von 29 auf 26 reduzierte. Eine weitere Woche später konnte wiederum in keiner Stuhlprobe *E. coli* NISSLE 1917 nachgewiesen werden. In einem Zeitraum vom 7. Tag bis zum 14. Tag nach der letzten Immunisierung scheint *E. coli* NISSLE 1917 aus der Darmflora der Mäuse zu verschwinden und diese somit nicht länger zu

besiedeln. Abbildung 4.23 zeigt das Ergebnis der *E. coli* NISSLE 1917-spezifischen PCR. Die untersuchten Fäcesproben wurden am 17. Tag und am 38. Tag gesammelt. **A**, **B**, **C** und **D** zeigen das Ergebnis für die Proben, die eine Woche nach der letzten Immunisierung gesammelt wurden (17. Tag) und **E**, **F**, **G**, **H** das Ergebnis für die Fäcesproben, die eine Woche nach Abschluss der *Booster*-Immunisierung genommen wurden. Wie aus der Abbildung ersichtlich, wurden nicht alle Versuchstiere mit gleichem Erfolg von *E. coli* NISSLE 1917 kolonisiert. Bei einigen Tieren sind bereits sieben Tage nach der letzten Applikation der Bakterien diese nicht mehr im Stuhl nachweisbar. Diese Ergebnisse belegen, dass *E. coli* NISSLE 1917 offensichtlich kein dauerhafter Kolonisierer des Mäusedarms ist und, wenn der Stamm nicht ständig neu oral appliziert wird, relativ schnell wieder verschwindet.

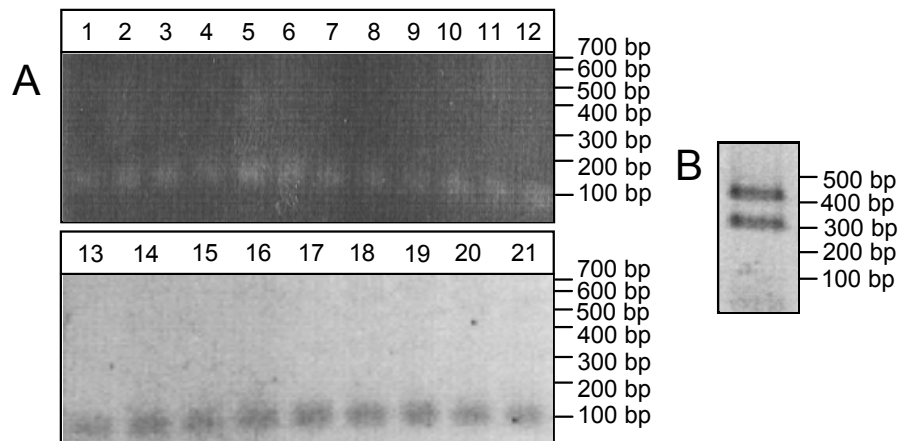


**Abb. 4.23:** PCR-Diagnostik zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917. Die Fäcesproben wurden jeweils sieben Tage nach der letzten oralen Gabe der rekombinanten Bakterien gesammelt. Die linke Spalte zeigt das Ergebnis der PCR für die Proben vom 17. Tag, die rechte Spalte das Ergebnis für die Proben, die sieben Tage nach Abschluss der *Booster*-Immunisierung (38. Tag) genommen wurden. Die Versuchstiere wurden mit *E. coli* NISSLE 1917 / pCB1 (**A & E**), *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 (**B & F**), *E. coli* NISSLE 1917 / pCB2 (**C & G**) und *E. coli* NISSLE 1917 / pUN6 (**D & H**) immunisiert. **I** zeigt die Positivkontrolle. Die Mäuse #11, #19 und #23 starben im Verlauf der Studie, so dass von diesen Tieren keine Proben nach der *Booster*-Immunisierung gesammelt werden konnten.

Nach der Immunisierung der Mäuse mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 / pCB1, *E. coli* NISSLE 1917 / pCB2, *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 und *E. coli* NISSLE 1917 / pUN6 wurde eine weitere Gruppe von Versuchstieren mit *E. coli* NISSLE 1917 immunisiert, die die Plasmide pCB9, pCB10 und pCB11 beinhalten. Diese Plasmide basieren auf dem kryptischen Plasmid pMUT1, welches von Natur aus in den Bakterien vorkommt, spezifisch für *E. coli* NISSLE 1917 ist und sich durch eine hohe genetische Stabilität auszeichnet [BLUM-OEHLER *et al.*, 2003]. Auch rekombinante Plasmide auf Basis des kryptischen Plasmids pMUT1 sind in *E. coli* NISSLE 1917 sehr stabil [OELSCHLÄGER, mündliche Mitteilung] und sollten auch ohne Selektionsdruck durch Antibiotika über einen längeren Zeitraum in den Bakterien verweilen. Somit sind Plasmide auf der Basis der kryptischen Plasmide eventuell besser als Immunisierungsplasmide geeignet als die Plasmide auf pUN6-Basis.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Gruppe von Versuchstieren mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 immunisiert, die die „kryptischen“ Plasmide pCB9, pCB10 und pCB11 tragen (Tab. 4.2). Bakterien, die mit diesen Plasmiden transformiert wurden, exprimieren entweder OspA-AIDA<sup>c</sup> (pCB9), OspG-AIDA<sup>c</sup> (pCB10) oder als Kontrolle AIDA<sup>c</sup> (pCB11). Die Präsentation der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine auf der Oberfläche der rekombinanten Bakterien wurde zuvor mit Hilfe der Immunofluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abb. 4.11). Auf eine Klonierung von p60-AIDA<sup>c</sup> in das kryptische Plasmid pMUT1 wurde aufgrund der sehr schwachen Expression dieses Proteins in *E. coli* NISSLE 1917 verzichtet. Auch die für die zweite Immunisierungsstudie vorgesehenen Versuchstiere wurden vor der Immunisierung auf eine Kontamination mit *E. coli* NISSLE 1917 untersucht und in keiner der Fäcesproben konnte *E. coli* NISSLE 1917 nachgewiesen werden (Abb. 4.24). Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 ist davon auszugehen, dass alle Versuchstiere vor der Immunisierung frei von *E. coli* NISSLE 1917 waren.





**Abb. 4.24:** PCR-Diagnostik zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917. Untersucht wurden die Fäcesproben der Versuchstiere vor der Immunisierung mit *E. coli* NISSLE 1917. Nach Beendigung der PCR wurde die DNA in einem Agarosegel (1,5%) elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Ziffern über den einzelnen Spuren geben die Nummern der jeweiligen Versuchstiere an. In keiner der untersuchten Fäcesproben konnte *E. coli* NISSLE 1917 nachgewiesen werden (**A**) und es ist davon auszugehen, dass die Versuchstiere nicht mit diesem Bakterienstamm kontaminiert waren. **B** zeigt die Positivkontrolle.

Um zu überprüfen, ob eine zusätzliche Erhöhung der Anzahl der oral applizierten Bakterien zu einer besseren Kolonisierung der Versuchstiere führt, wurde die Anzahl der Bakterien pro Maus um das 4fache erhöht ( $2 \times 10^{10}$  statt  $5 \times 10^9$ ). Zusätzlich wurde nach der letzten oralen Immunisierung das Vorkommen von *E. coli* NISSLE 1917 in den Fäcesproben der Versuchstiere täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen analysiert, um eventuell eine genauere Aussage über die Dauer und den Verlauf des Vorkommens dieser Bakterien im Mäusedarm zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden täglich pro Versuchstier 5 Fäcesproben gesammelt und über Nacht bei 37°C und 180 rpm in MacConkey-Medium inkubiert. MacConkey-Medium dient unter anderem zur Isolierung von coliformen Keimen aus Stuhlproben. Es enthält Gallensalze und Kristallviolett, die das Wachstum von grampositiven Bakterien weitgehend hemmen. Die zugesetzte Lactose dient zusammen mit dem pH-Indikator Neutralrot zum Nachweis des Lactoseabbaus, wodurch sich das Medium als Folge der Ansäuerung gelb verfärbt. Weiterhin wurde das Medium mit den beiden Antibiotika Kanamycin und Tetracyclin supplementiert. In diesem Medium können nur die rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 wachsen, da nur diese über die entsprechenden Resistenzen verfügen. Ein Aliquot der Bakteriensuspension wurde auf MacConkey-Platten vereinzelt. Mit einer zufällig ausgewählten Einzelkolonie wurde die *E. coli* NISSLE 1917-spezifische PCR durchgeführt. Um Kosten zu sparen, wurden intakte Bakterien für die PCR

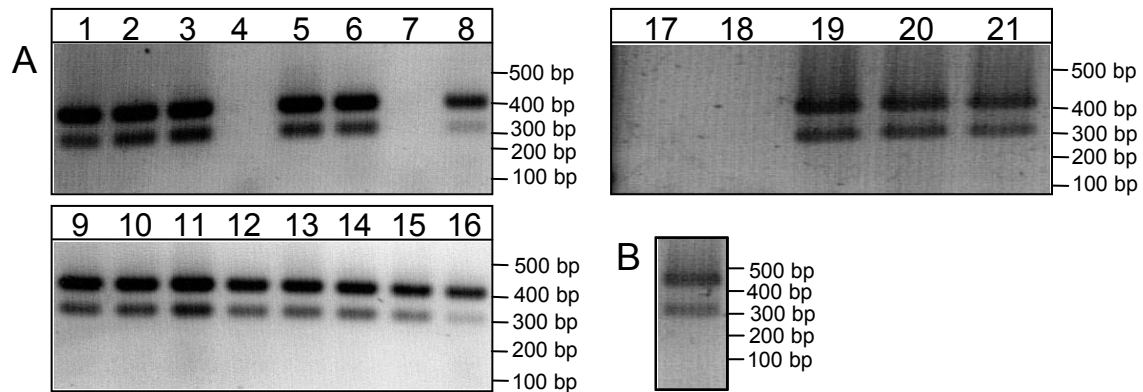
als *Template* eingesetzt und nicht isolierte Plasmid-DNA, wie in der ersten Immunisierungsstudie. Tabelle 4.4 zeigt das Ergebnis der *E. coli* NISSLE 1917-spezifischen PCR für die einzelnen Versuchstiere über einen Zeitraum von 14 Tagen.

**Tab. 4.4:** Kolonisierung der Versuchstiere mit *E. coli* NISSLE 1917 über einen Zeitraum von 14 Tagen. „+“ = NISSLE-Nachweis positiv; „-“, = NISSLE-Nachweis negativ.

Maus #	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	14. Tag
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Bei der Mehrzahl der Versuchstiere lässt sich über einen Zeitraum von 14 Tagen der Bakterienstamm *E. coli* NISSLE 1917 mit Hilfe der PCR in den Fäcesproben nachweisen. Nur in den Fäcesproben von Maus #17 und Maus #18 konnte *E. coli* NISSLE 1917 schon nach sieben bzw. fünf Tagen nicht mehr detektiert werden. Auch noch nach 14 Tagen zeigte

die *E. coli* NISSLE 1917-spezifische PCR unter diesen Immunisierungsbedingungen in 17 von 21 Fäcesproben ein positives Ergebnis (81%). Abbildung 4.25 zeigt exemplarisch das Ergebnis der *E. coli* NISSLE 1917-spezifischen PCR 14 Tage nach der letzten oralen Gabe der Bakterien.



**Abb. 4.25:** PCR-Diagnostik zum spezifischen Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917. Untersucht wurden die Fäcesproben der Versuchstiere 14 Tage nach der letzten Immunisierung mit *E. coli* NISSLE 1917. Nach Beendigung der PCR wurde die DNA in einem Agarosegel (1,5%) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Zahlen über den einzelnen Spuren geben die Nummern der jeweiligen Versuchstiere an (A). 17 von 21 Versuchstieren (81%) sind 14 Tage nach der letzten oralen Gabe von *E. coli* NISSLE 1917 noch besiedelt. B zeigt die Positivkontrolle.

Eine 4fache Erhöhung der Anzahl der täglich oral applizierten rekombinanten Bakterien pro Maus von  $5 \times 10^9$  auf  $2 \times 10^{10}$  und die Verwendung der kryptischen Plasmide als Immunisierungsplasmide führte wenigstens zu einer Verdopplung der Verweildauer von *E. coli* NISSLE 1917 im Mäusedarm. Während bei der Immunisierung mit  $5 \times 10^9$  Bakterien pro Tag sich diese 14 Tage nach der letzten oralen Gabe nicht mehr in den Fäcesproben der Versuchstiere nachweisen ließen, gelang dies bei 81% der Proben, die von den Tieren stammten, welche täglich  $2 \times 10^{10}$  Bakterien erhielten. Nach weiteren 21 Tagen wurden erneut Fäcesproben von den Mäusen gesammelt und untersucht. Hier zeigte sich, dass bis auf wenige Ausnahmen fast alle Versuchstiere wieder frei von *E. coli* NISSLE 1917 waren. Eine Erhöhung der Anzahl der täglich oral applizierten Bakterien führt zwar zu einer längeren Verweildauer von *E. coli* NISSLE 1917 in den Mäusen, zu einer dauerhaften Besiedlung kommt es jedoch nicht. Auch hier zeigt sich, dass *E. coli* NISSLE 1917 kein permanenter Kolonisierer von Mäusen ist.

## 4.8 Analyse der Immunantworten

Die quantitative Analyse der spezifischen humoralen Immunantwort gegen die verwendeten Antigene erfolgte mit Hilfe eines Endpunkt-ELISA nach der Methode von FREY *et al.* [1998].

### 4.8.1 Etablierung der ELISA

Um die humorale Immunantwort der Versuchstiere gegen die verwendeten Antigene mit Hilfe eines Endpunkt-ELISA quantitativ zu analysieren, musste zunächst einmal für jedes Antigen die optimale Konzentration für die Beschichtung der ELISA-Platten ermittelt werden. Dazu wurde die 96-well-Platten mit Antigenen einer Konzentration von 15 – 0,188 µg / ml beschichtet. Um einen eventuellen Einfluss des pH-Wertes des Beschichtungspuffers zu ermitteln, wurden drei verschiedene Puffersysteme verwendet. Ein saurer 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6,0, ein neutraler, salzreicher Phosphatpuffer mit pH 7,0 und ein alkalischer 50 mM Natriumkarbonatpuffer mit pH 9,0. Bezüglich des Puffersystems erwies sich der neutrale LPBS-Puffer als am besten geeignet. Für die verwendeten Antigene wurden folgende Konzentrationsoptima für das Beschichten der Platten ermittelt: p60 → 6 µg / ml; OspA → 3 µg / ml und OspG → 6 µg / ml.

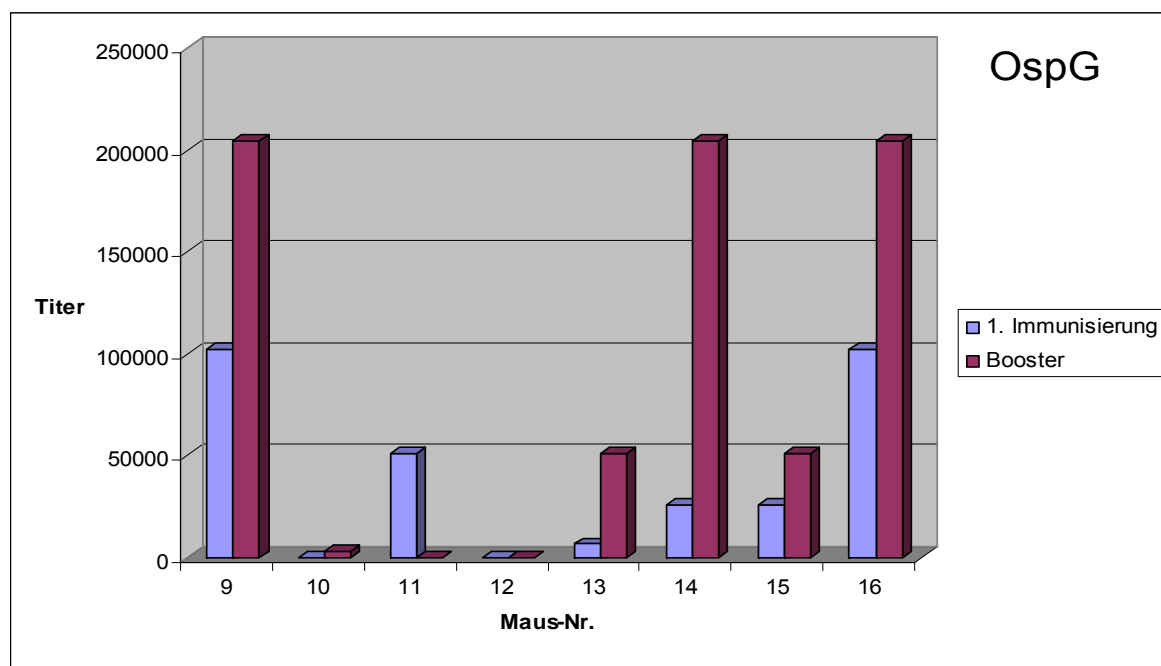
### 4.8.2 ELISA-Ergebnisse

Mit Hilfe eines Endpunkt-ELISA wurden die Seren und Speichelproben der Versuchstiere analysiert, die oral mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 immunisiert wurden. Die Bakterien präsentierten auf ihrer Oberfläche verschiedene Antigene mit Hilfe des AIDA-Autotransporters.

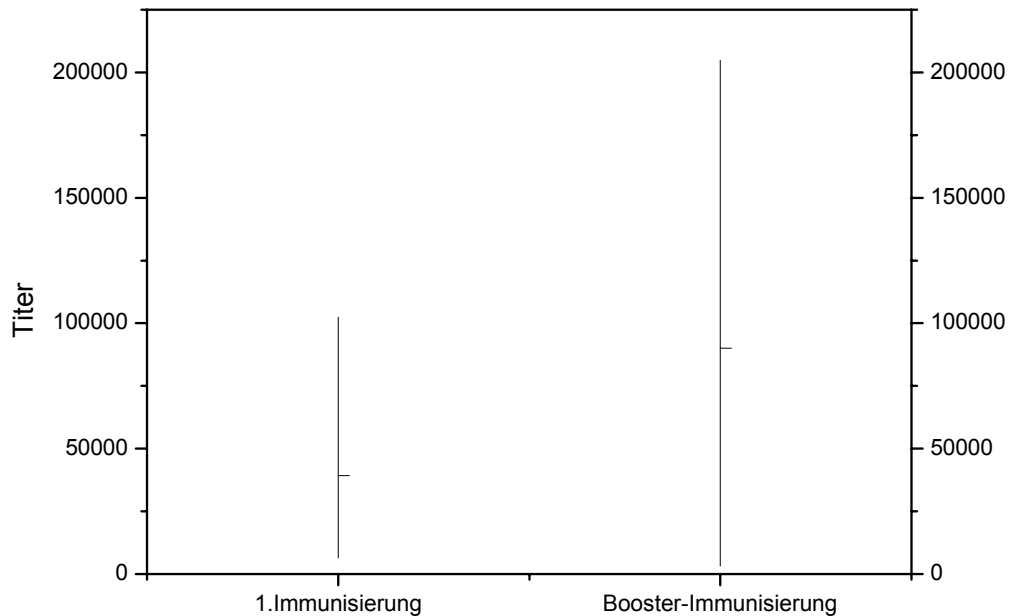
#### 4.8.2.1 Systemische Immunantwort nach oraler Immunisierung

Bei der Auswertung der Endpunkt-ELISA zur Analyse der systemischen Immunantworten der Versuchstiere, die oral mit  $5 \times 10^9$  *E. coli* NISSLE / pCB1, *E. coli* NISSLE / pCB2 bzw. *E. coli* NISSLE pCB3 immunisiert worden waren, zeigte sich, dass nur die mit *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 immunisierten Tiere eine Immunantwort gegen das auf der Oberfläche der Bakterien präsentierte OspG entwickelt hatten (Abb. 4.26). Bei den mit *E. coli* NISSLE 1917

/ pCB2 (p60-AIDA<sup>c</sup>) oder *E. coli* NISSLE 1917 / pCB1 (OspA-AIDA<sup>c</sup>) immunisierten Versuchstieren konnten keine spezifischen Antikörper gegen diese Proteine im Serum nachgewiesen werden. Weiterhin fiel auf, dass die mit OspG immunisierte Gruppe in Bezug auf die Stärke der Immunantworten sehr heterogen war. So konnten in den Seren von zwei Tieren entweder überhaupt keine spezifischen Antikörper gegen OspG nachgewiesen werden oder es konnte erst nach der *Booster*-Immunsierung ein sehr geringer Titer nachgewiesen werden. Generell schwankten die gemessenen Titer der Versuchstiere untereinander recht stark. So variieren die Titer nach der ersten Immunisierung zwischen 6400 und 100000 und nach der *Booster*-Immunsierung zwischen 3200 und 200000. Auch konnte ein deutlicher Anstieg der Titer nach der *Booster*-Immunsierung im Vergleich zur ersten Immunisierung beobachtet werden. So stieg der durchschnittliche Titer der Postimmunseren von 39200 auf 90000 nach der *Booster*-Immunsierung an (Abb. 4.27).



**Abb. 4.26:** Antikörpertiter der Seren von den Versuchstieren, oral immunisiert mit  $5 \times 10^9$  *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 (OspG-AIDA<sup>c</sup>). Die Versuchstiere reagierten sehr heterogen auf die Immunisierung mit den rekombinanten Bakterien. In sechs von acht Seren konnten mittels ELISA spezifische Antikörper gegen OspG nachgewiesen werden. Nach der *Booster*-Immunsierung konnte ein weiterer Anstieg der Antikörpertiter im Vergleich zu den Werten nach der ersten Immunisierung gemessen werden. Maus #11 starb während der Studie, so dass keine Blutentnahme nach der *Booster*-Immunsierung möglich war. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

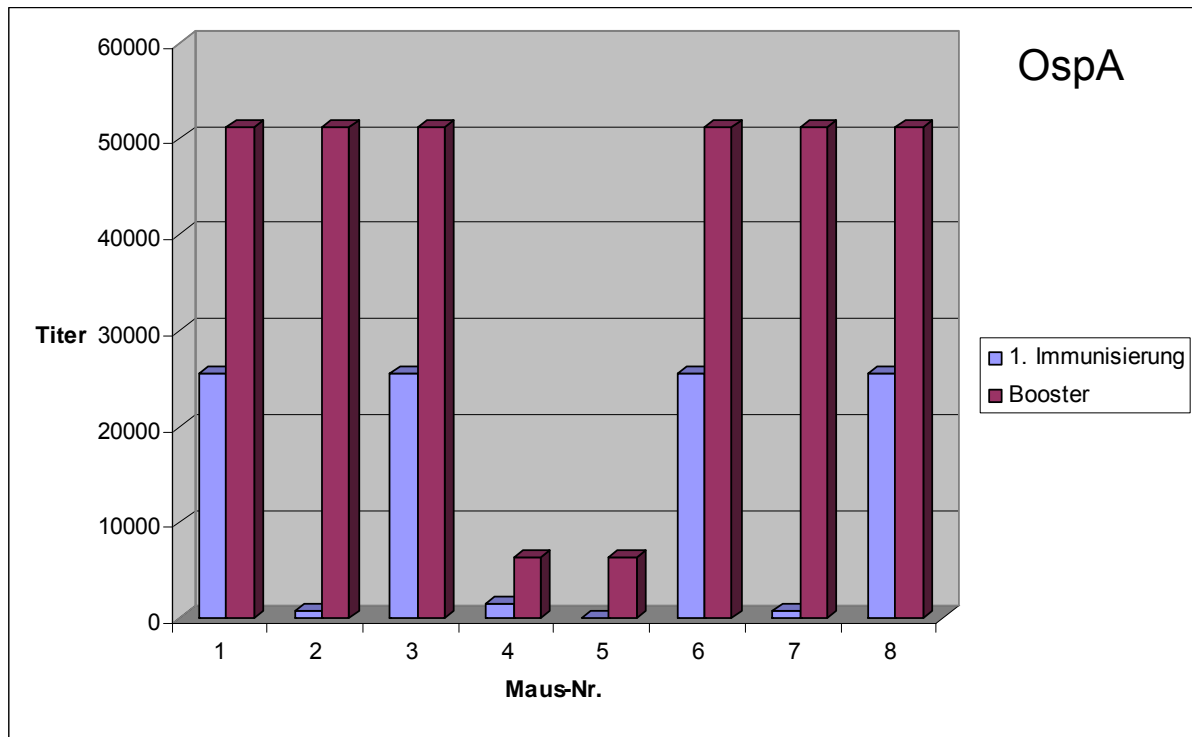


**Abb. 4.27:** Durchschnittliche Titer der mit  $5 \times 10^9$  *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 (OspG-AIDA<sup>c</sup>) immunisierten Versuchstiere nach der ersten Immunisierung und nach der *Booster*-Immunisierung. Neben dem Durchschnitt sind auch noch der niedrigste und der höchste Titer dargestellt. Es konnte ein deutlicher Anstieg der Titer nach der *Booster*-Immunisierung im Vergleich zur ersten Immunisierung beobachtet werden. So stieg der durchschnittliche Titer der Postimmunseren von 39200 auf 90000 nach der *Booster*-Immunisierung an.

Weiterhin wurden Versuchstiere mit  $2 \times 10^{10}$  *E. coli* NISSLE / pCB9 (OspA-AIDA<sup>c</sup>) und *E. coli* NISSLE / pCB10 (OspG-AIDA<sup>c</sup>) oral immunisiert. Diese Plasmide basieren auf dem kryptischen Plasmid pMUT1, welches von Natur aus in *E. coli* NISSLE 1917 vorkommt und sehr stabil ist. Es sollte untersucht werden, ob Plasmide, die auf der Basis der kryptischen Plasmide konstruiert wurden, besser für eine Immunisierung geeignet sind, als Vektoren anderer Herkunft. Auf eine Klonierung des p60 Proteins in das kryptische Plasmide wurde aufgrund der sehr schwachen Expression in *E. coli* NISSLE 1917 verzichtet.

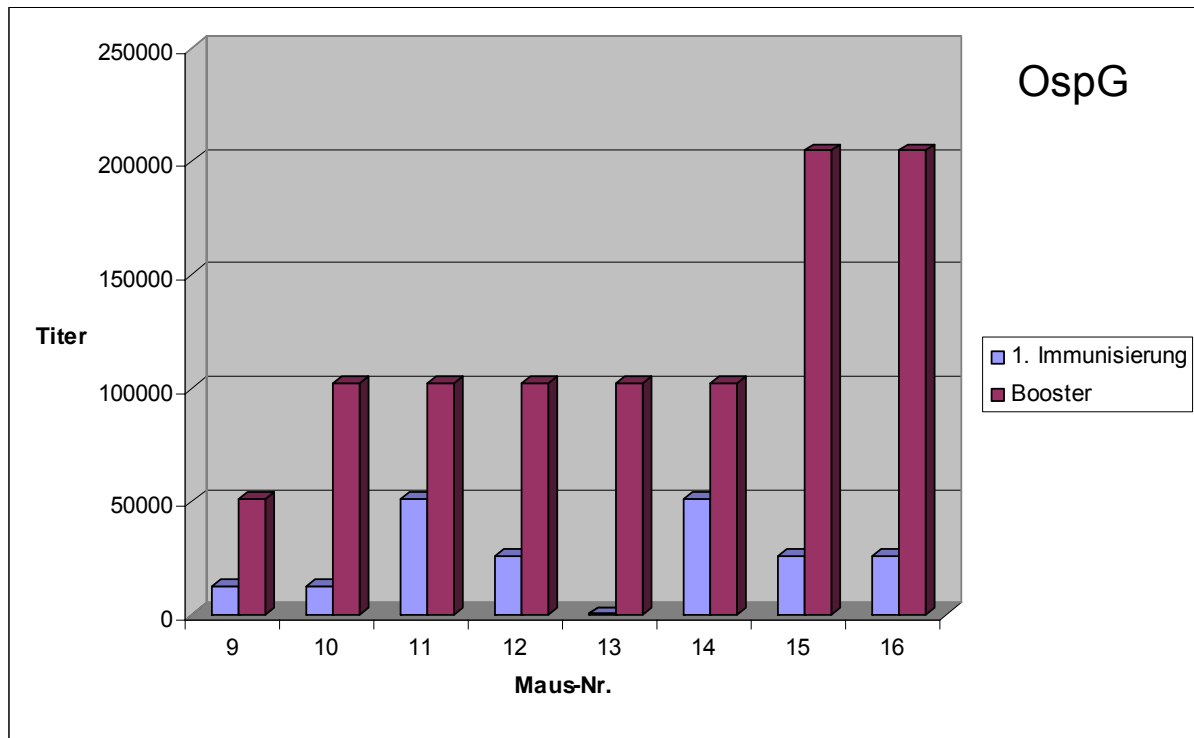
In den Seren der immunisierten Versuchstiere konnten sowohl gegen OspA, als auch gegen OspG spezifische Antikörper mittels ELISA nachgewiesen werden. Wie schon bei der zuvor erfolgten Immunisierung mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917, transformiert mit den Plasmiden pCB1, pCB2 und pCB3 (basierend auf pUN6), sind die Antikörpertiter in den Seren bei dieser Immunisierungsstudie ebenfalls recht unterschiedlich. Bei allen mit OspA immunisierten Versuchstieren konnte eine spezifische Immunantwort gegen das verwendete Antigen gemessen werden, doch schwankten die Titer nach der ersten Immunisierung

zwischen 100 und 25600. Nach der *Booster*-Immunsierung stiegen die Titer deutlich an und bewegten sich in Bereiche von 6400 bis 51200 (Abb. 4.28).



**Abb. 4.28:** Antikörpertiter der Seren von den Versuchstieren, oral immunisiert  $2 \times 10^{10}$  mit *E. coli* NISSLE 1917 / pCB9 (OspA-AIDA<sup>c</sup>). Die Versuchstiere reagierten sehr heterogen auf die Immunisierung mit den rekombinanten Bakterien. In acht von acht Seren konnten mittels ELISA spezifische Antikörper gegen OspA nachgewiesen werden. Nach der *Booster*-Immunsierung konnte ein weiterer Anstieg der Antikörpertiter im Vergleich zu den Werten nach der ersten Immunisierung gemessen werden. Der durchschnittliche Titer der Postimmunseren stieg von 13213 nach der ersten Immunisierung auf 40000 nach der *Booster*-Immunsierung an. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

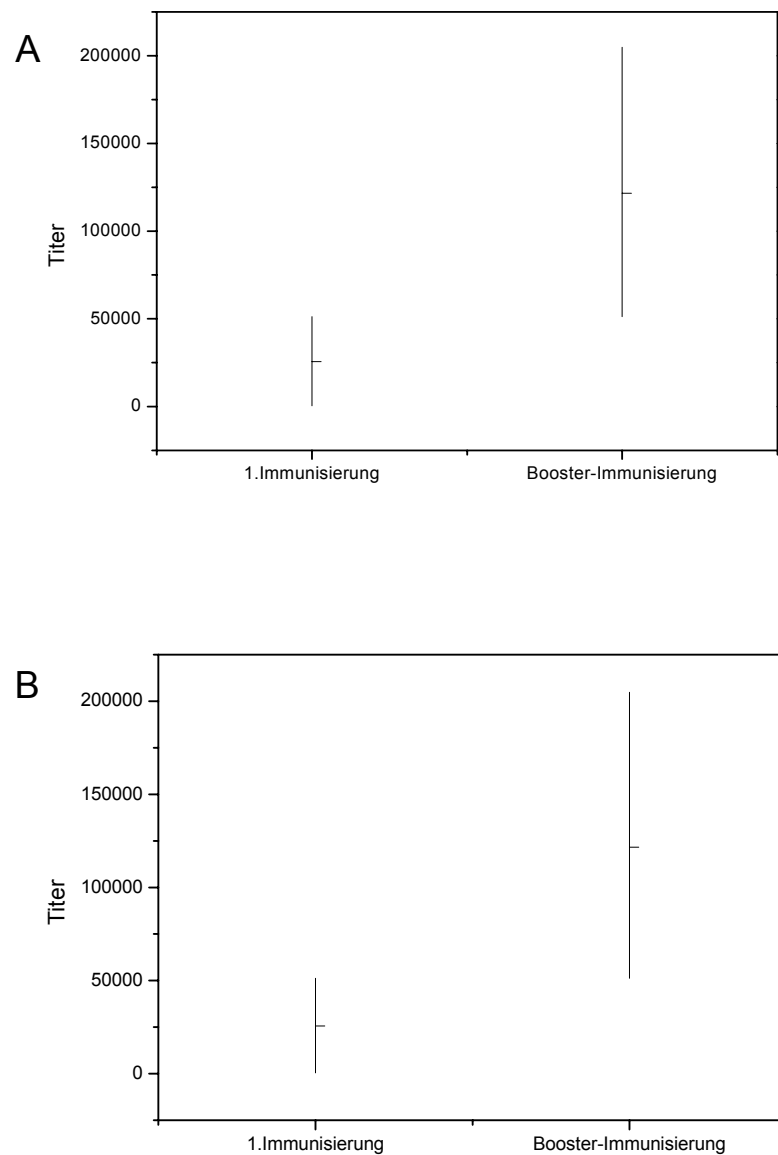
Auch die mit  $2 \times 10^{10}$  *E. coli* NISSLE 1917 / pCB10 (OspG-AIDA<sup>c</sup>) immunisierten Versuchstiere zeigten eine Immunantwort. So konnten in den Seren aller Mäuse mittels ELISA spezifische Antikörper gegen OspG nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich wieder das Phänomen, dass die Titer der einzelnen Tiere bezüglich ihrer Höhe sehr unterschiedlich waren. So besaß der Titer von der Maus, die am geringsten auf die Immunisierung reagiert hatte, einen Wert von 400, während die höchsten Titer einen Wert von 51200 aufwiesen. Nach der *Booster*-Immunsierung stiegen die Titer aller Versuchstiere deutlich an. Die Titer erreichten Werte von 51200, über 102400 bis zu Maximalwerten von 204800 (Abb. 4.29).



**Abb. 4.29:** Antikörpertiter der Seren von den Versuchstieren, oral immunisiert mit  $2 \times 10^{10}$  *E. coli* NISSLE 1917 / pCB10 (OspG-AIDA<sup>c</sup>). Die Versuchstiere reagierten sehr heterogen auf die Immunisierung mit den rekombinanten Bakterien. In allen Seren konnten mittels ELISA spezifische Antikörper gegen OspG nachgewiesen werden. Nach der *Booster*-Immunisierung konnte ein weiterer Anstieg der Antikörpertiter im Vergleich zu den Werten nach der ersten Immunisierung gemessen werden. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

Vergleicht man die Titer nach der primären Immunisierung mit den Werten nach der *Booster*-Immunisierung, ist sowohl bei den Versuchstieren, die mit *E. coli* NISSLE 1917 / pCB9 (OspA-AIDA<sup>c</sup>) immunisiert wurden, als auch bei den Tieren, immunisiert mit *E. coli* NISSLE 1917 / pCB10 (OspG-AIDA<sup>c</sup>) ein deutlicher Anstieg der Titer nach der *Booster*-Immunisierung zu beobachten (Abb. 4.30). Im Falle der mit OspA immunisierten Mäuse stieg der durchschnittliche Antikörpertiter von 13213 nach der ersten Immunisierung auf 40000 nach der *Booster*-Immunisierung und auch bei den mit OspG immunisierten Versuchstieren kam es zu einer verstärkten Immunreaktion nach der *Booster*-Immunisierung. Hier stieg der durchschnittliche Titer von 25650 nach der ersten Immunisierung auf 121600 nach der *Booster*-Vakzinierung an.



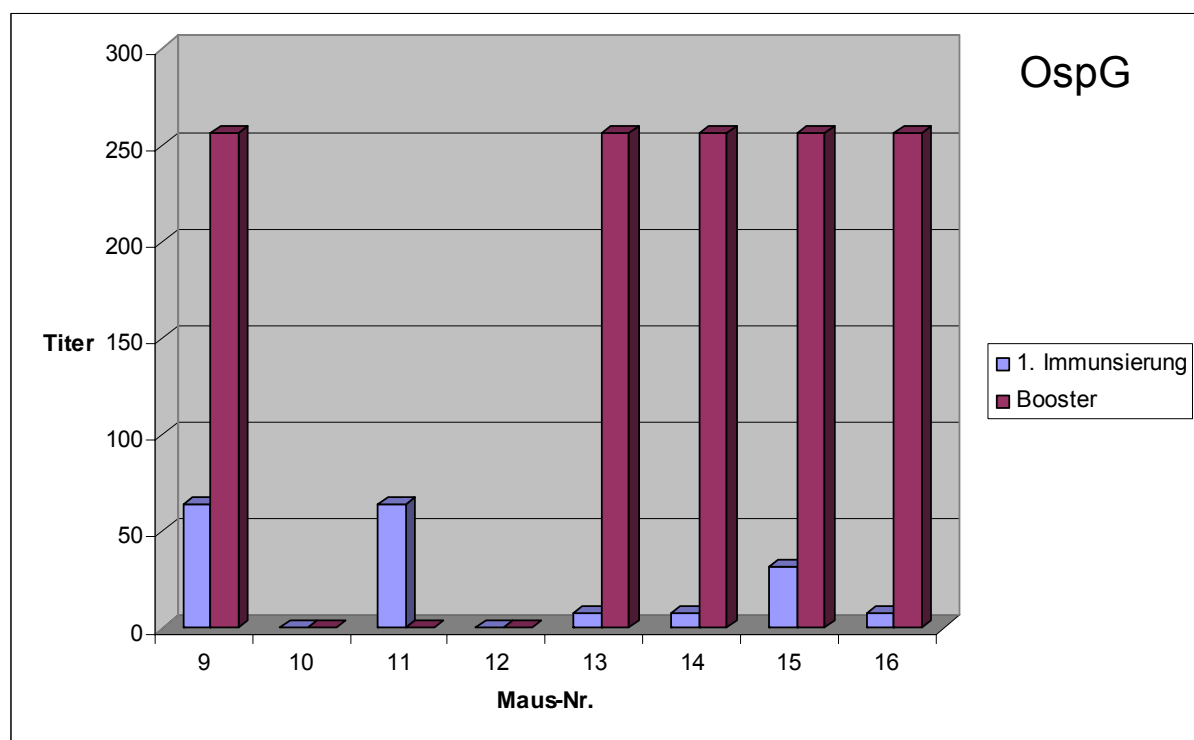


**Abb. 4.30:** Durchschnittliche Titer der mit  $2 \times 10^{10}$  *E. coli* NISSLE 1917 / pCB9 (**A**) und *E. coli* NISSLE 1917 / pCB10 (**B**) immunisierten Versuchstiere nach der Immunisierung und der *Booster*-Immunisierung. Neben dem Durchschnitt sind auch noch der niedrigste und der höchste Titer dargestellt. Es konnte ein deutlicher Anstieg der Titer nach der *Booster*-Immunisierung im Vergleich zur ersten Immunisierung beobachtet werden.

#### 4.8.2.2 Mukosale Immunantwort

Neben der systemischen Immunantwort wurde auch die mukosale Immunantwort der Versuchstiere untersucht. Dazu wurden den Tieren Speichelproben entnommen und diese auf das Vorkommen von spezifischen Antikörpern gegen die verwendeten Antigene hin

untersucht. Die Auswertung der Endpunkt-ELISA zur Analyse der mukosalen Immunantworten der Versuchstiere erbrachte ein ähnliches Ergebnis wie bei der systemischen Immunantwort. Auch hier zeigte sich, dass nur die mit  $5 \times 10^9$  *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 immunisierten Tiere (OspG-AIDA<sup>c</sup>) spezifische Antikörper gegen OspG gebildet hatten. Die mit p60 und OspA immunisierten Mäuse zeigten keine Immunantwort gegen diese beiden Antigene. Wie schon bei den systemischen Immunantworten zu beobachten war, waren die mukosalen Immunantworten der Versuchstiere ebenfalls recht heterogen (Abb. 4.31). Weiterhin konnte ein deutlicher Anstieg der Titer nach der *Booster*-Immunsierung im Vergleich zur ersten Immunsierung beobachtet werden. Durchschnittlich stieg der Titer von 23 auf 160 nach *Booster*-Vakzinierung im Vergleich zur ersten Immunsierung. Von den mit *E. coli* NISSLE 1917 / pCB9 und pCB10 immunisierten Versuchstieren wurden keine Speichelproben gesammelt und konnten aus diesem Grunde nicht analysiert werden.



**Abb. 4.31:** Antikörpertiter im Speichel der Versuchstiere, oral immunisiert mit  $5 \times 10^9$  *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 (OspG-AIDA<sup>c</sup>). Die Versuchstiere reagierten sehr heterogen auf die Immunisierung mit den rekombinanten Bakterien. Nach der *Booster*-Immunsierung konnte ein weiterer Anstieg der Antikörpertiter im Vergleich zu den Werten nach der ersten Immunsierung gemessen werden. Maus #11 starb während der Studie, so dass keine Probenentnahme nach der *Booster*-Immunsierung möglich war. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

## 5. Diskussion

Alle höheren Lebewesen verfügen über Mechanismen zur Abwehr von Pathogenen. Während die Invertebraten nur über ein angeborenes Immunsystem verfügen, besitzen die Vertebraten, mit Ausnahme der Agnatha (z.B. Neunaugen), zusätzlich zu dem angeborenen Immunsystem ein adaptives Immunsystem. Dieses adaptive Immunsystem tritt in der Evolution erstmals bei den Knorpelfischen auf. Durch die Interaktion von angeborenen und adaptiven Immunsystem sind die höheren Wirbeltiere in der Lage, die meisten Infektionen erfolgreich abzuwehren und durch das immunologische Gedächtnis einen lang andauernden Immunschutz gegen bestimmte Pathogene zu erlangen. Dabei ist das Immunsystem nicht nur in der Lage Pathogene zu bekämpfen, die sich systemisch im Körper ausbreiten, sondern auch Krankheitserreger, die die Schleimhäute besiedeln und diese als Eintrittspforte in den Körper nutzen. Die Schleimhautoberflächen des Körpers sind für Infektionen besonders anfällig, da sie aufgrund ihrer physiologischen Funktionen wie zum Beispiel Gasaustausch (Lungen), Nahrungsaufnahme (Darm), Sinneswahrnehmung (Mund, Rachen, Nase, Auge) und Reproduktion (Uterus, Vagina) relativ dünne und durchlässige Barrieren auf dem Weg ins Körperinnere sind [JANEWAY *et al.*, 2002]. Die große Mehrzahl von Pathogenen kommt zunächst mit den Oberflächen der Schleimhäute in Kontakt. So nutzen zum Beispiel enteroinvasive Bakterien der Gattungen *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* sogar die Mikrofaltenzellen oder M-Zellen im Dünndarm um das Darmepithel zu überwinden und darunter liegende Gewebe zu besiedeln [SANSONETTI *et al.*, 1999].

Das adaptive Immunsystem lässt sich in anatomisch unterschiedliche Kompartimente unterteilen, von denen jedes einzelne eine Immunantwort gegen Pathogene auslösen kann, die sich in den entsprechenden Geweben befinden. Das Kompartiment, welches die Schleimhäute vor Infektion und Invasion durch pathogene Mikroorganismen schützt, ist das mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT).

Obwohl das Immunsystem in den meisten Fällen in der Lage ist, pathogene Organismen erfolgreich zu bekämpfen, gibt es jedoch auch Krankheitserreger, die vom Immunsystem überhaupt nicht (z.B. HIV) oder nur in seltenen Fällen erfolgreich abgewehrt werden. Auch kann es im Verlauf der Pathogenese zu schweren Schädigungen des Wirtsorganismus kommen, so dass eventuell auch bleibende Schäden zurückbleiben können, die die Lebensqualität der Betroffenen stark einschränken können. Aus diesen Gründen wäre ein bestehender Immunschutz schon vor dem ersten Kontakt mit einem Pathogen ein probates Mittel, um eine Erkrankung und die eventuell damit verbundenen Schäden zu verhindern.

Durch Vakzinierung mit abgetöteten oder attenuierten Pathogenen bzw. immunogenen Erregerbestandteilen kann ein spezifischer Immunschutz aufgebaut werden. Die überwiegende Mehrzahl der verfügbaren Impfstoffe wird heute jedoch parenteral appliziert und induziert somit eine systemische, nicht aber eine mukosale Immunantwort. Auch besteht durch das Applizieren von Impfstoffen über die „invasive Route“ die Gefahr der Verbreitung von Infektionskrankheiten durch kontaminierte Spritzen und Kanülen. Im Gegensatz dazu führt eine mukosale Vakzinierung zur Induktion einer mukosalen und systemischen Immunantwort. Da die meisten Pathogene die Schleimhäute als Eintrittspforte in den Körper nutzen, würde eine Aktivierung des Immunsystems in diesen Geweben die Krankheitserreger bereits auf dieser ersten Ebene bekämpfen und somit eine Infektion tiefer liegender Gewebe verhindert werden.

Eine mukosale Vakzinierung über die orale Route stellt dabei die einfachste und am ehesten akzeptierte Methode dar. Im Gegensatz zu Injektionen ist sie schmerzfrei, es besteht nicht die Gefahr der Verbreitung von Infektionskrankheiten durch kontaminierte Injektionsnadeln und die Kosten für die Herstellung von oralen Vakzinen sind in der Regel geringer, da sie nicht unter extrem sterilen Bedingungen hergestellt werden müssen [FASANO, 1998].

Im Falle der oralen Vakzinierung muss das verwendete Antigen partikulär vorliegen. Die Aufnahme von Antigenen, Partikeln und Mikroorganismen aus dem Darmlumen und der Transport über die Barriere des Darmepithels (Transcytose) erfolgt durch spezialisierte Epithelzellen, den M-Zellen, die sich nur im *lymphoid follicle-associated epithelium* (FAE) befinden [NEUTRA *et al.*, 1996]. Die M-Zellen nehmen aus dem Darmlumen Moleküle und Partikel endo- oder phagocytotisch auf und transportieren dieses Material in Vesikeln durch das Zellinnere zur Basalmembran, wo es in die Tasche der M-Zellen abgegeben wird. Dort befinden sich Lymphocyten und antigenpräsentierende Zellen, die diese Partikel und Moleküle aufnehmen, prozessieren und den T- / B-Zellen als Antigen präsentieren.

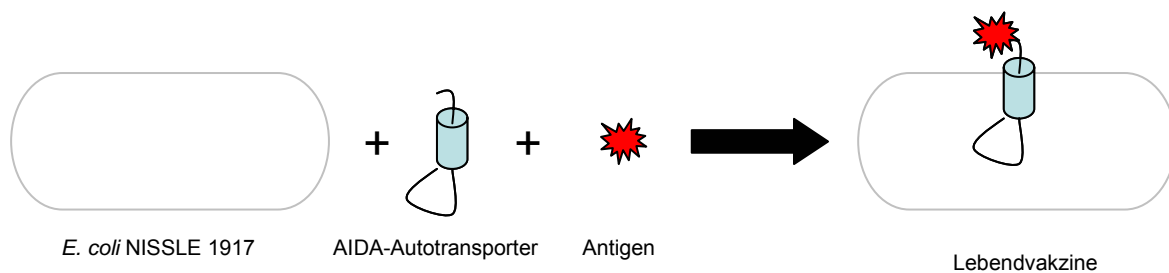
Für die Aufnahme und Transcytose von Antigenen durch M-Zellen können diese in Mikropartikel verpackt werden, da M-Zellen, im Gegensatz zu Enterocyten, in der Lage sind, Partikel mit einem Durchmesser von bis zu 300 nm aufzunehmen [ERMAK *et al.*, 1995; ELDRIDGE *et al.*, 1991; O'HAGAN *et al.*, 1989]. Aber die Verwendung von solchen Partikeln dieser Größe birgt auch einige Nachteile. So können die Partikel im Mukus eingeschlossen werden und erreichen deshalb nicht die M-Zellen und das mukosale Immunsystem. Auch sind noch Fragen bezüglich der Größe der Partikel zu klären, die eine effektive Aufnahme gewährleisten können [FREY *et al.*, 1996]. Weiterhin scheinen auch das Alter und die Spezies,

welche mit Mikropartikel oral immunisiert werden, einen Einfluss auf die Effektivität der Aufnahme solcher Partikel zu haben. So ist die Aufnahme von Makropartikeln im Darm von Kaninchen mindestens doppelt so groß wie im Mäusedarm. Interessanterweise ist die Rate der Aufnahme bei älteren Tieren höher, als bei Jungtieren [FASANO *et al.*, 1998].

Eine Alternative zum Gebrauch von Mikropartikeln ist die Verwendung von attenuierten Pathogenen zur oralen Immunisierung. Die Vorteile solcher attenuierten Bakterien sind die einfache und relativ kostengünstige Produktion, keine Notwendigkeit einer Kühlkette (Bakterien können als gefriergetrocknete Präparate gelagert werden), die attenuierten Pathogene verfügen in der Regel über gute Eigenschaften als Adjuvant (z.B. LPS und Flagellen), sind selbstreplizierend und können, falls erforderlich, mit Antibiotika wieder entfernt werden [KOTTON & HOHMANN, 2004; HANTMAN *et al.*, 1999]. Der Gebrauch von attenuierten Pathogenen birgt aber auch Risiken. So könnten die Bakterien zum Beispiel von gerade immunisierten Patienten auf andere Personen übertragen werden, wobei dieser Punkt eventuell als Vorteil in Bezug auf eine flächendeckende Immunisierung angesehen werden kann. Auch gelangen die Erreger unkontrolliert über den Stuhl in die Umwelt, was besonders bei gentechnisch modifizierten Organismen nicht immer unproblematisch ist. Ebenso wäre eine Wiedererlangung der Pathogenität durch Mutation oder horizontalen Gentransfer denkbar. Weiterhin ist der Grad der Attenuierung von entscheidender Bedeutung für die Frage, ob ein Bakterienstamm erfolgreich für eine Immunisierung eingesetzt werden kann. Auf der einen Seite verlieren zu stark attenuierte Bakterien oft ihre Immunogenität, auf der anderen Seite führen zu wenig attenuierte Pathogene zur Ausbildung von Krankheitssymptomen. Entscheidend ist die Balance zwischen Attenuierung und Immunogenität [HOHMANN *et al.*, 1996]. Weiterhin muss ein im Tiermodell erfolgreich getesteter attenuierter Bakterienstamm nicht zwangsläufig auch für den Menschen apathogen sein. So berichten HONE *et al.* [1988] von einer *galE*-Mutante des Stammes *Salmonella enterica* Serovar Typhi Ty2, die im Mausmodell vollständig attenuiert war, bei zwei von vier Freiwilligen jedoch Krankheitssymptome hervorrief. Zu Zeit sind international nur drei bakterielle Lebendvakzine kommerziell erhältlich und im klinischen Gebrauch: *Salmonella enterica* Serovar Typhi Ty21a, *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR und *Mycobacterium bovis* BCG [KOTTON & HOHMANN, 2004].

Eine Möglichkeit die Vorteile einer bakteriellen Lebendvakzine zu nutzen, ohne jedoch den Risiken bei der Verwendung von attenuierten Pathogenen ausgesetzt zu sein, besteht darin, apathogene, kommensale Bakterien für eine mukosale Immunisierung zu gebrauchen. So wurden zum Beispiel rekombinante *Streptococcus gordonii*, *Lactococcus*

*lactis* und *Lactobacillus* spp. erfolgreich als Vektoren für eine mukosale Immunisierung bei Mäusen eingesetzt [BOLKEN *et al.*, 2002; MERCENIER *et al.*, 2000; MEDAGLINI *et al.*, 1997]. Hierbei handelt es sich ausschließlich um grampositive Bakterien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Lebendvektor der gramnegative, apathogene und probiotische *E. coli* Stamm NISSLE 1917 verwendet. Es sollte untersucht werden, ob dieser Bakterienstamm als Vektor für eine mukosale Immunisierung geeignet ist. Die verwendeten Modellantigene p60 aus *Listeria monocytogenes*, OspA und OspG aus *Borrelia burgdorferi* sollten mit Hilfe des AIDA-Autotransportersystems auf der Oberfläche der rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 präsentiert werden und wurden dazu N-terminal mit der Transporterdomäne (AIDA<sup>c</sup>) des AIDA-Autotransporters fusioniert (Abb. 5.1). Auf diese Weise konnte auch die Eignung des AIDA-Autotransporters als Präsentationsmodul für heterologe Antigene in einem Lebendvakzinmodell untersucht werden. Die Analyse der humoralen Immunantwort erfolgte mittels ELISA.



**Abb. 5.1:** Schematische Darstellung des Aufbaus der verwendeten Lebendvaccine. Auf der Oberfläche des bakteriellen Trägersystems *E. coli* NISSLE 1917 wird mit Hilfe eines Präsentationsmodul (AIDA-Autotransporter) ein Antigen präsentiert.

## 5.1 Konstruktion der oralen Lebendvektoren

Die kodierenden Sequenzen für die verwendeten Antigene p60, OspA und OspG wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert und in die Plasmide pUN6 bzw. pMUT1-tet kloniert. Die daraus resultierenden Plasmide wurden zunächst in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  transformiert und mit Hilfe von Restriktionsanalysen überprüft und die Expression der Proteine im *Western Blot* untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle verwendeten Antigene von *E. coli* DH5 $\alpha$  als Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine gut exprimiert wurden. Die Plasmide wurden anschließend aus den Bakterien isoliert, erneut durch Restriktionsanalysen überprüft und in den probiotischen *E. coli* Stamm NISSLE 1917 transformiert. Die Expression der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine

wurde mit Hilfe von *Western Blots* und Immunofluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Fusionsproteine OspA-AIDA<sup>c</sup> und OspG-AIDA<sup>c</sup> wurden auch von *E. coli* NISSLE 1917 gut exprimiert und die Oberflächenpräsentation dieser Proteine konnte durch Immunofluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Dabei war kein Unterschied in der Stärke der Expression dieser Proteine zu erkennen, unabhängig davon, ob die Immunisierungsplasmide aus dem Plasmid pUN6 oder dem kryptischen Plasmid pMUT1-tet hervorgingen. Im Gegensatz dazu wurde p60-AIDA<sup>c</sup> von *E. coli* NISSLE 1917 nur sehr schwach exprimiert und eine Präsentation dieses Proteins auf der Oberfläche der Bakterien konnte durch Immunofluoreszenzmikroskopie nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass p60-AIDA<sup>c</sup> von dem *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  gut exprimiert wird, von *E. coli* NISSLE 1917 jedoch nur sehr schwach, muss es Unterschiede geben zwischen den beiden Stämmen bezüglich der Transkription / Translation oder in der Proteaseausstattung der Bakterien, wodurch einige Proteine schneller abgebaut werden als andere. Da sich das Plasmid pCB2, welches unter anderem für das Fusionsprotein p60-AIDA<sup>c</sup> kodiert, von den Plasmiden pCB1 (OspA-AIDA<sup>c</sup>) und pCB3 (OspG-AIDA<sup>c</sup>) nur in der Sequenz für das Antigen unterscheidet, muss die Ursache für die schwache Expression mit dem verwendeten *Passenger*-Antigen zu tun haben. Eine vergleichbare Beobachtung konnte TAPADAR [2004] machen. Das N-Protein aus dem Masernvirus konnte mit Hilfe des AIDA-Autotransporters auf der Oberfläche von *E. coli* C600 präsentiert werden, in *E. coli* NISSLE 1917 wurde das Fusionsprotein jedoch nicht exprimiert. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine, die in Laborstämmen wie DH5 $\alpha$  und C600 exprimiert werden, nicht zwangsläufig auch in *E. coli* NISSLE 1917 in den entsprechenden Mengen produziert werden müssen. Nicht jedes Protein ist offensichtlich in jedem bakteriellen Trägerstamm geeignet durch den AIDA-Autotransporter auf der Oberfläche präsentiert zu werden. Die Eignung jedes einzelnen als Antigen vorgesehenen Proteins muss daher im verwendeten Trägersystem experimentell überprüft werden.

## 5.2 Analyse des Wachstums der Lebendvektoren

Nach der Analyse der Expression der Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine wurde untersucht, ob die Expression dieser Proteine einen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* NISSLE 1917 ausübt. Da sowohl der AIDA-Autotransporter, als auch die verwendeten Antigene für die Bakterien ein artifizielles System darstellen und von Natur aus in diesen nicht vorkommen, war nicht auszuschließen, dass die Expression dieser Proteine eine hemmende Wirkung auf

das Wachstum von *E. coli* NISSLE 1917 hat. Eine mögliche Erklärung für eine negative Beeinflussung des Wachstums könnte in der zusätzlich zu erbringenden Stoffwechsellistung für die Synthese der Fusionsproteine liegen. Dies würde mit Sicherheit einen negativen Effekt auf die Kolonisierungseigenschaften dieser Bakterien ausüben, da diese einen Nachteil gegenüber den anderen, im Mäusedarm lebende Bakterienarten hätten. Aus diesen Gründen wurde das Wachstum der rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 und des Wildtyps anhand der optischen Dichte bei 600 nm analysiert. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 und dem Wildtyp konnte allerdings nicht beobachtet werden. Die Expression der verwendeten Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine schien keinen Effekt auf das Wachstum der Bakterien in Kultur zu haben. Dies deutet darauf hin, dass die geringe Expression von p60-AIDA<sup>c</sup> in *E. coli* NISSLE 1917 nicht auf eine eventuelle Toxizität des Fusionsproteins zurückzuführen ist, sondern vermutlich auf einen vermehrten Abbau des Proteins. Dieser Abbau könnte auf einen gestörten Transport des Fusionsproteins über die innere Membran zurückzuführen sein, oder auf eine partielle Faltung im Periplasma, welches die Translokation des *Passengers* durch AIDA<sup>c</sup> über die äußere Membran verhindert.

Ob die Ergebnisse der Analyse des Wachstums der Bakterien in Kultur auch auf die Situation im Mäusedarm zutrifft ist unklar, da im Gegensatz zur Kultur die rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 im Darm mit den bereits dort vorkommenden Bakterien konkurrieren müssen.

### 5.3 Intraperitoneale Immunisierung mit rekombinanten Antigenen

Zur Überprüfung der Immunogenität der verwendeten Antigene wurden die Versuchstiere auch intraperitoneal mit diesen Proteinen immunisiert. Dazu mussten die Antigene in sehr reiner Form vorliegen und durften nicht mit anderen Proteinen kontaminiert sein. Hierzu wurden die Antigene mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag versehen, mit Hilfe Immobilisierter Metall Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt und anschließend aus einem SDS-Polyacrylamidgel elektroeluiert. Jeder Maus wurden 15 µg Protein appliziert. Mit Hilfe von *Western Blots* und Immunofluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass alle Versuchstiere mit einer spezifischen Immunantwort auf die applizierten Proteine reagierten. Die Antikörper in den Seren der immunisierten Mäuse erkannten die entsprechenden Antigene sowohl in denaturierter Form (*Western Blot*), als auch nativ auf der Oberfläche von intakten rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917, die diese Antigene als AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine exprimierten (Immunofluoreszenzmikroskopie). Hätten die Versuchstiere nicht auf die



intraperitoneale Immunisierung mit der Bildung von Antikörpern gegen die verwendeten Antigene reagiert, so wären diese Proteine wahrscheinlich auch als Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine nicht immunogen gewesen und somit für die Durchführung der Immunisierungsstudie nicht geeignet. Da die Versuchstiere auf die Immunisierung mit den Antigenen eine Immunantwort zeigten, bestand die Möglichkeit, dass diese Antigene auch als AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteine eine Immunreaktion hervorrufen könnten und wurden deshalb im weiteren Verlauf dieser Untersuchungen eingesetzt.

#### **5.4 Besiedlung der Versuchstiere mit *E. coli* NISSLE 1917**

Da *E. coli* NISSLE 1917 kein natürlicher Kolonisierer von Mäusen ist, musste im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht werden, ob und über welchen Zeitraum dieser Bakterienstamm in der Lage ist, den Mäusedarm zu kolonisieren. Zu diesem Zweck wurden Fäcesproben von den Versuchstieren gesammelt und mit Hilfe einer *E. coli* NISSLE 1917-spezifischen PCR untersucht. Diese spezifische PCR zum Nachweis von *E. coli* NISSLE 1917 basiert auf der Amplifikation von zwei DNA-Fragmenten, die auf dem kryptischen Plasmid pMUT2 liegen. Das Verfahren zur Detektion von *E. coli* NISSLE 1917 in Fäcesproben wurde in Anlehnung an die Methode von BLUM-OEHLER *et al.* [2003] optimiert. Alle naiven Versuchstiere vor der Immunisierung mit den Vakzinekandidaten, waren frei von *E. coli* NISSLE 1917. In keiner der untersuchten Proben konnte der Bakterienstamm mit Hilfe der NISSLE 1917-spezifischen PCR nachgewiesen werden und angesichts der hohen Sensitivität des Testes ist das Vorhandensein von falsch negativen Proben unwahrscheinlich. Das Fehlen von *E. coli* NISSLE 1917 in der Darmflora der untersuchten Versuchstiere entsprach damit den Erwartungen.

In der ersten Immunisierungsstudie wurden die Mäuse täglich über einen Zeitraum von zehn Tagen mit  $5 \times 10^9$  Bakterien oral immunisiert. Als Immunisierungsplasmide wurden die Vektoren pCB1, pCB2 und pCB3 verwendet (pUN6 als Kontrolle). Die Ergebnisse der *E. coli* NISSLE 1917-spezifischen PCR zeigten, dass bereits eine Woche nach der letzten oralen Gabe der Bakterien nur noch 62% der Versuchstiere besiedelt waren und eine weitere Woche später konnte in keiner der Fäcesproben *E. coli* NISSLE 1917 nachgewiesen werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach der *Booster*-Immunisierung. Eine Woche nach der letzten Gabe von *E. coli* NISSLE 1917 konnten in 73% der Stuhlproben die Bakterien detektiert werden und nach Ablauf einer weiteren Woche waren alle untersuchten Fäcesproben negativ. In einem Zeitraum vom 7. Tag bis zum 14. Tag nach der letzten

Immunisierung mit den Bakterien verschwinden diese aus der Darmflora der Versuchstiere und es kommt nicht zu einer dauerhaften Kolonisierung.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in einer weiteren Immunisierungsstudie die Anzahl der oral applizierten Bakterien von  $5 \times 10^9$  auf  $2 \times 10^{10}$  erhöht und auch die Dauer der täglichen Immunisierung von 10 auf 14 Tage ausgedehnt. Als Immunisierungsplasmide wurden die Vektoren pCB9, pCB10 und pCB11 (Kontrolle) verwendet, die alle auf das kryptische Plasmid pMUT1 zurückzuführen sind. Das Vorkommen von *E. coli* NISSLE 1917 in den Fäcesproben wurde täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der letzten oralen Gabe der Bakterien untersucht. Dabei zeigte sich, dass nach 14 Tagen noch 81% der Versuchstiere besiedelt waren. Weitere 21 Tage später waren, bis auf wenige Ausnahmen, fast alle Mäuse wieder frei von *E. coli* NISSLE 1917. Dieses Ergebnis zeigt im Vergleich zur Immunisierungsstudie, durchgeführt mit  $5 \times 10^9$  Bakterien pro Tag, dass eine Erhöhung der Anzahl der verabreichten Bakterien, die Dauer der oralen Immunisierung und die Verwendung der kryptischen Plasmide als Immunisierungsplasmide zu einer mindestens doppelt so langen Verweildauer der Bakterien in den Versuchstieren führte. Da die Versuchstiere vor der Immunisierung nicht mit Antibiotika behandelt wurden, war der Darm mit einer Vielzahl von Bakterienarten besiedelt, die die normale Darmflora bilden. Diese Bakterien besetzen die ökologische Nische Darm und erschweren es neu hinzukommenden Bakterien sich dort anzusiedeln. Eine Erhöhung der Anzahl der verabreichten Bakterien und die Dauer der oralen Immunisierung erleichtern es wahrscheinlich *E. coli* NISSLE 1917 zumindest eine Zeitlang einen Platz im Ökosystem Mäusedarm zu finden. Zu einer dauerhaften Kolonisierung kommt es jedoch nicht. Die Bedingungen im Mäusedarm scheinen für *E. coli* NISSLE 1917 nicht optimal zu sein, wodurch die Bakterien einen Nachteil gegenüber den anderen Bakterienarten besitzen, die von Natur aus den Darm besiedeln. Die murine Darmflora hat sich im Verlauf der Evolution entwickelt und an die Bedingungen im Mäusedarm optimal angepasst. *E. coli* NISSLE 1917 durchlief, als nicht natürlicher Besiedler von Mäusen, diesen evolutionären Prozess nicht und ist im Konkurrenzkampf mit den anderen Bakterien im Mäusedarm wahrscheinlich benachteiligt und wird schließlich von diesen verdrängt. Eine nur temporäre Besiedlung der Mäuse mit *E. coli* NISSLE 1917 könnte für eine Vakzinierung von Vorteil sein, da dies einer Toleranzentwicklung gegen die präsentierten Antigene entgegenwirken könnte. Allerdings dürfen die rekombinanten Bakterien nicht zu schnell wieder aus dem Mäusedarm verschwinden, da die Antigene über einen ausreichenden Zeitraum dem mukosalen Immunsystem präsentiert werden müssen, um eine Immunantwort zu induzieren.

## 5.5 Analyse der Immunantworten

Zur Analyse der Immunantworten der Versuchstiere nach oraler Immunisierung mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 wurden die spezifischen Antikörper gegen die verwendeten Antigene mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die Angabe der Antikörperkonzentration erfolgte in relativen Einheiten durch Bestimmung der Endpunkttiter der Proben.

Bei der Auswertung der Endpunkt-ELISA zur Analyse der systemischen Immunantworten der Versuchstiere, immunisiert mit  $5 \times 10^9$  *E. coli* NISSLE 1917 / pCB1, *E. coli* NISSLE 1917 / pCB2 und *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3, zeigte sich, dass nur die mit *E. coli* NISSLE 1917 / pCB3 immunisierten Tiere eine Immunantwort gegen das auf der Oberfläche der Bakterien präsentierte OspG entwickelt hatten. Bei den mit *E. coli* NISSLE 1917 / pCB2 (p60-AIDA<sup>c</sup>) oder *E. coli* NISSLE 1917 / pCB1 (OspA-AIDA<sup>c</sup>) immunisierten Versuchstieren konnten keine spezifischen Antikörper gegen diese Proteine im Serum nachgewiesen werden. Der Grund für das Ausbleiben einer Immunantwort gegen OspA und p60 liegt wahrscheinlich in der nur schlechten und eventuell zu kurzen Besiedlung der Versuchstiere mit *E. coli* NISSLE 1917. Auffällig ist, dass nur die Gruppe von Mäusen, die mit OspG immunisiert wurden, am besten besiedelt waren und eine Immunantwort gegen dieses Antigen zeigten. Möglicherweise führte die bessere Besiedlung zu einer längeren Verweildauer dieser Bakterien im Darm und somit zu einer Auslösung einer Immunreaktion. Dass die Besiedlung und deren Dauer eine Rolle in der Auslösung einer Immunantwort spielen, zeigt das Ergebnis der Immunisierungsstudie, durchgeführt mit  $2 \times 10^{10}$  *E. coli* NISSLE 1917. Hier sind fast alle Versuchstiere noch 14 Tage nach der letzten oralen Gabe von *E. coli* NISSLE 1917 mit diesen Bakterien besiedelt und beide Gruppen von Mäusen haben Antikörper gegen die verwendeten Antigene OspA bzw. OspG gebildet. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Ausbleiben einer Immunantwort gegen OspA in der ersten Immunisierungsstudie nicht auf eine mangelnde Immunogenität des OspA-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsproteins zurückzuführen ist, da in der zweiten Immunisierung die Versuchstiere mit der Bildung von spezifischen Antikörpern reagierten. Dieses Ergebnis zeigt weiterhin, dass die konstitutive Promotoraktivität der *aida*-Promotorregion ausreicht, um genügend Antigene auf der Oberfläche der Bakterien zu präsentieren, damit eine Immunreaktion ausgelöst wird. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass *E. coli* NISSLE 1917 in der Lage ist, das entsprechende Antigen-AIDA<sup>c</sup>-Fusionsprotein zu exprimieren. Dies muss für jedes Antigen experimentell überprüft werden. Der Vorteil der Verwendung eines Promotors mit geringer

bis mittlerer Aktivität, wie es der *aida*-Promotor ist, liegt darin, dass der Stoffwechsel der Bakterien nicht zu stark belastet wird und sie somit keinen zusätzlichen Nachteil im Konkurrenzkampf mit anderen Darmbakterien haben [GLICK, 1995].

Da angenommen wird, dass das AIDA-Protein nach der Synthese im Cytoplasma mit Hilfe des Sec-Mechanismus über die innere Membran der Bakterien in das Periplasma transportiert wird, besteht die Möglichkeit, dass einige Antigen-AIDAc-Fusionsproteine nicht „kompatibel“ mit diesem Transportsystem sind und deshalb im Cytoplasma verbleiben und anschließend abgebaut werden.

Die Tatsache, dass die *Boostervakzinierung* zu einem deutlichen Anstieg der Antikörpertiter geführt hat, deutet darauf hin, dass die erste Immunisierung zu einer Induktion einer zellulären Immunantwort führte und zur Bildung von Gedächtniszellen. In diesem Fall reagiert das Immunsystem auf eine erneute Konfrontation mit einem bereits „bekannten“ Antigen mit einer schnelleren und deutlich stärkeren Immunantwort, als auf eine Immunisierung mit einem Antigen, welches dem Immunsystem zuvor noch nicht präsentiert worden war.

Bezüglich der Stärke der Immunreaktionen fiel auf, dass die Versuchstiere innerhalb einer Gruppe sehr heterogen auf die Vakzinierung reagierten. Einige reagierten gar nicht oder nur sehr schwach und andere reagierten dagegen sehr deutlich. Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um weibliche Balb/c-Mäuse, die aus einer Inzuchtlinie stammten. Aus diesem Grunde sollten die Tiere genetisch sehr ähnlich sein und deswegen auch homogen auf eine Immunisierung reagieren. Dies war jedoch nicht der Fall. Eine mögliche Ursache könnte auf die zwar geringen, jedoch mit Sicherheit zu findenden genetischen Unterschieden der Tiere zurückzuführen sein. Da es sich bei den Mäusen nicht um Klone handelte, waren sich die Tiere genetisch zwar sehr ähnlich, jedoch nicht identisch. Eine weitere Ursache könnte auch in möglichen Unterschieden in der residenten Mikroflora der einzelnen Versuchstiere liegen, die sich eventuell unterschiedlich auf die Besiedlung des Darms mit *E. coli* NISSLE 1917 auswirken.

Neben der systemischen Immunantwort konnte im Fall der mit OspG immunisierten Gruppe eine Immunantwort auch im Speichel nachgewiesen werden. Neben der systemischen Immunantwort führte eine orale Immunisierung mit rekombinanten *E. coli* NISSLE 1917 zu einer Reaktion des mukosalen Immunsystems. Die ist besonders interessant, es sich bei OspG um ein Oberflächenprotein eines hämatogenen Pathogens handelt, dass mit der Mukosa während einer Infektion nicht in Kontakt kommt. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine orale Immunisierung mit Proteinen, die von einem Pathogen stammen, welches nicht über die

mukosale Route in den Körper eindringt, durchaus zu einer systemischen Immunantwort führen kann und somit eventuell einen Schutz gegen diesen Krankheitserreger bietet. Die Antikörpertiter der einzelnen Tiere untereinander fielen auch hier recht unterschiedlich aus und decken sich mit den Ergebnissen der Serumproben. Auch konnte in den Speichelproben eine deutliche Erhöhung der Titer nach der *Booster*-Immunsierung gemessen werden, was auf eine Induktion der zellulären Immunantwort und der Bildung von Gedächtniszellen hindeutet.

## 5.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *E. coli* NISSLE 1917, zusammen mit dem AIDA-Autotransporter, als Vakzinierungssystem für eine orale Immunsierung eingesetzt werden kann. Ebenfalls wurde gezeigt, dass eine orale Immunsierung mit diesem Stamm zu einer mukosalen und systemischen Immunantwort führt. Dieses System hat aber auch seine Grenzen. So ist der AIDA-Autotransporter offenbar nicht als universelles Präsentationsmodul für alle Proteine in *E. coli* NISSLE 1917 geeignet. Das Beispiel p60 zeigt, dass nicht jedes Protein zusammen mit dem „System“ *E. coli* NISSLE 1917 / AIDA-Autotransporter einsetzbar ist. Jedes Protein muss zuvor auf seine Eignung hin experimentell getestet werden.

Bisher wurden zur mukosalen Immunsierung nur attenuierte Pathogene als Lebendvektoren eingesetzt. Der Einsatz dieser Bakterien ist jedoch nicht frei von Risiken, da einige Patienten nach einer Immunsierung mit diesen Stämmen Krankheitssymptome entwickeln können. Dies ist bei der Verwendung von Kommensalen als Vakzinierungsstämmen ausgeschlossen und der Einsatz von *E. coli* NISSLE 1917 als Vakzineträger sollte, aufgrund seiner probiotischen Eigenschaften, zusätzlich noch einen positiven Effekt auf das Wohlbefinden haben. Da sich *E. coli* NISSLE 1917 zusammen mit dem AIDA-Autotransporter gut für eine mukosale Immunsierung eignet, sollten noch mehr Proteine auf ihre Verwendung für dieses System getestet und weitere Einsatzmöglichkeiten untersucht werden. Weiterhin sollte analysiert werden, ob eine orale Immunsierung nicht nur Schutz gegen Pathogene bietet, die über die Darmmukosa in den Körper eindringen, sondern auch eine Infektion mit hämatogenen Krankheitserregern verhindern kann. Dazu müssten zuvor oral immunisierte Versuchstiere mit hämatogenen Pathogenen, wie zum Beispiel Borrelien, infiziert werden und die Pathogenese mit einer nicht immunisierten Kontrollgruppe, ebenfalls mit Borrelien infiziert, verglichen werden.

## 6. Literatur

**Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, Oelschläger TA.**

The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens.

*FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40: 223-229 (2004)

**Appleyard RK.**

Segregation of lambda lysogenicity during bacterial recombination in *Escherichia coli* K-12.

*Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 18: 95-97 (1953)

**Ausubel, F M, Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)

**Ayabe, T, Satchell, D P, Wilson, C L, Parks, W C, Selsted, M E und Ouellette, A J.**

Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria.

*Nat Immunol* 1(2): 113-8 (2000)

**Barbour AG, Heiland RA, Howe TR.**

Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and Europe isolates.

*J Infect Dis*, 152(3): 478-484 (1985)

**Benach JL, Bosler EM, Hanahan JP, Coleman JL, Habicht GS, Bast IF, Cameron DJ, Ziegler JL, Barbour AG, Burgdorfer W, Edelman R, Kaslow RA.**

Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease.

*N Engl J Med*, 308(13): 740-742 (1983)

**Benz I und Schmidt MA.**

Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*.

*Infect-Immun* 57(5): 1506-11. (1989)

**Benz I und Schmidt MA.**

AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule.

*Mol-Microbiol* 6(11): 1539-46 (1992)

**Benz I und Schmidt MA.**

Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27).

*Infect-Immun* 60(1): 13-8 (1992)

**Benz I und Schmidt MA.**

Glycosylation with heptose residues mediated by the aah gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin.

*Mol Microbiol* 40(6): 1403-13 (2001)

**Berg RD.**

The indigenous gastrointestinal microflora.

*Trends in Microbiol*, 4: 430-435 (1996)

**Bille J et al.**

Anatomy of a listeriosis outbreak.

*Foodborne listeriosis. Proceedings of a symposium*, 29-36, Hamburg, B. Behr's GmbH & Co (1989)

**Blum G, Marre, R, Hacker, J.**

Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6.

*Infection* 23(4): 234-6 (1995)

**Blum-Oehler G, Oswald S, Eiteljorge K, Sonnenborn U, Schulze J, Kruis W, Hacker J**

Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples.

*Res Microbiol* 154(1): 59-66 (2003)

**Bolken TC, Franke CA, Jones KF, Bell RH, Swanson RM, King DS, Fischetti VA, Hruby DE.**

Analysis of Factors Affecting Surface Expression and Immunogenicity of Recombinant Proteins Expressed by Gram-Positive Commensal Vectors.

*Infection & Immunity*, 2487-2491 (2002)

**Bradford MM.**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

*Anal Biochem*, 7;72:248-54 (1976)

**Bubert A, Kuhn M, Goebel W.**

Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species.

*J Bacteriol*, 174(24): 8166-8171 (1992)

**Bünning J, Schmitz M, Repenning B, Ludwig D, Schmidt MA, Strobel S, Zimmer KP.**

Interferon- $\gamma$  mediates antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes.

*Eur J Immunol*, 35(3): 831-842 (2005)

**Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP.**

Lyme disease – a tick-borne spirochetosis?

*Science*, 216: 1317-1319 (1982)

**Burnette WN.**

“Western Blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

*Anal Biochem*, 112(2): 195-203 (1981)

**Christ AD, Blumberg RS.**

The intestinal epithelial cell: immunological aspects.

*Springer Sem Immunopathol*, 18: 449-461 (1997)



**De Silva AM, Telford SR, Brunet LR, Barthold SW, Fikrig E.**

*Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine.

*J Exp Med*, 183(1): 271-275 (1996)

**Didierlaurent A, Sirard J C, Kraehenbuhl J P und Neutra M R.**

How the gut senses its content.

*Cell Microbiol* 4(2): 61-72 (2002)

**Dillon JR, Nasim A, Nestmann ER.**

Recombinant DNA-Methodology.

*John Wiley & Sons. New York* (1985)

**Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.**

High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.

*Nucleic Acids Res*, 16(13):6127-45 (1988)

**Eldrige JH, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR, Tice TR, Gilley RM.**

Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system.

*Mol Immunol*, 28: 287-294 (1991)

**Ermak TH, Dougherty EP, Bhagast HR, Kabok Z, Pappo J.**

Uptake and transport of copolymer biodegradable microspheres by rabbit Peyer's patch M cells.

*Cell Tissue Res*, 279: 433-436 (1995)

**Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL.**

Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis.

*N Engl J Med*, 312: 404-407 (1985)

**Frey A, Di Canzio J und Zurakowski D.**

A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays.

*J Immunol Methods*, 221(1-2): 35-41 (1998)

**Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, Giannasca PJ, Reggio H, Lencer WI, Neutra, MR.**

Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting.

*J Exp Med* 184(3): 1045-59 (1996)

**Frey A, Meckelein B, Externest D und Schmidt MA.**

A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays.

*J Immunol Methods* 233(1-2): 47-56 (2000)

**Faulde M, Hoffmann G.**

Vorkommen und Verhütung vektorassoziierter Erkrankungen des Menschen in Deutschland unter Berücksichtigung zoonotischer Aspekte.

*Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz*, 44: 116-136 (2001)

**Giannasca PJ, Giannasca KT, Falk P, Gordon JI, Neutra MR.**

Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines.

*Am J Physiol*, 267: 1108-1121 (1994)

**Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D.**

Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.

*Proc Natl Acad Sci USA*, 87(12): 4645-4649 (1990)

**Hanahan D, Jessee J, Bloom FR.**

Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria.

*Methods Enzymol*, 204: 63-113 (1991)

**Hantmann MJ, Hohmann EL, Murphy CG, Knipe DM, Miller SI.**

Antigen delivery systems: development of recombinant live vaccines using viral or bacterial vectors.

*Mucosal Immunology*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y. (1999)

**Harder J, Schröder J-M**

Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *Journal of Leukocyte Biology* (2005)

**Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, AlaÁldeen D.**

Type V Protein Secretion Pathway: The Autotransporter Story.  
*Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 692-744 (2004)

**Hershberg RM, Framson PE, Cho DH, Lee LY, Kovats S, Beitz J.**

Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing.  
*J Clin Invest*, 100: 204-215 (1997)

**Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, MacPherson GG.**

A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes.  
*J Exp Med*, 191: 435-443 (2000)

**Janeway C A, Travers P, Walport M, Shlomchik M.**

*Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin (2002).

**Kagnoff MF.**

Mucosal Immunology: new frontiers.  
*Imunol Today*, 17(2): 57-59 (1996)

**KamerU, Rizos K, Apfel H, Autenrieth, IB, Lattemann CT.**

Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in Salmonella vaccine strains.  
*Infect Immun*, 71(4): 1944-52

**Kaiserlian D.**

Antigen sampling and presentation by epithelial cells in mucosal tissues.  
*Curr Top Microbiol Immunol*, 236: 55-78 (1999)

**Konieczny M.**

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des AIDA Autotransporter Translokators.  
Dissertation. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (1999)

**Konieczny M, Benz I, Hollinderbäumer B., Beinke C., Niederweis M., Schmidt MA.**

Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: The N-terminal  $\beta$ 1-domain is surface exposed and stabilizes the transmembrane  $\beta$ 2-domain.

*Antonie Van Leeuwenhoek* 80: 19-34 (2001)

**Konieczny M P, Suhr M, Noll A, Autenrieth I B, Schmidt, MA.**

Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system.

*FEMS Immunol Med Microbiol* 27(4): 321-32 (2000)

**Kotton CN, Hohmann EL.**

Enteric Pathogens as Vaccine Vectors for Foreign Antigen Delivery.

*Infection & Immunity*, 5535-5547 (2004)

**Kuhn M, Goebel W.**

Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells.

*Infect Immun*, 57(1): 55-61 (1989)

**Lu L, Walker WA.**

Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium.

*Am J Clin Nutr* (2001)

**Laemmli UK.**

Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.

*Nature* 227: 680-685

**Linnan MJ, Mascola L, Lou XD.**

Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese.

*N Engl J Med*, 319: 823-828 (1988)

**Low JC, Donache W.**

A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis.

*The Vetr J*, 153: 9-29 (1997)

**Mercenier A, Müller-Alouf H, Grangette C.**

Lactic Acid Bacteria As Live Vaccines.

*Curr Issues Mol Biol*, 2(1): 17-25 (2000)

**Medaglini D, Rush CM, Sestini P, Pozzi G.**

Commensal bacteria as vectors for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases: vaginal colonization with recombinant streptococci induces local and systemic antibodies in mice.

*Vaccine*, 15: 1330-1337 (1997)

**Mullis KB, Facona FA.**

Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.

*Methods Enzymol*, 155: 335-350

**Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP.**

Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization.

*Cell*, 86(3): 345-8 (1996)

**Neutra MR, Phillips TL, Mayer EL, Fishkind DJ.**

Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch.

*Cell Tissue Res*, 247(3): 537-46 (1987)

**Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP.**

Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses.

*Annu Rev Immunol*, 14: 275-300 (1996)

**Niewerth U.**

Charakterisierung des AIDA-Systems humaner und porciner *E. coli*-Isolate und die praktische Anwendung des AIDA-Translokators AIDA<sup>c</sup>.

Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2000)

**Nissle A.**

Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien.

*Med Klin*, 2: 29-30 (1918)

**Nissle A.**

Weiteres über die Mutaflorbehandlung unter besonderer Berücksichtigung der chronischen Ruhr.

*Münch Med Wschr*, 25: 678-681 (1919)

**Nissle A.**

Weiteres über die Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung.

*Dtsch Med Wochenschr*, 44: 1809-1813 (1925)

**O'Hagan DT, Palin K, Davis SS, Artursson P, Sjöholm I.**

Microparticles as a potentially orally active immunological adjuvants.

*Vaccine*, 7: 421-424 (1989)

**O'Neil D A, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L,  
Ganz T und Kagnoff MF.**

Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.

*J Immunol*, 163(12): 6718-24 (1999)

**Owen RL, Bhalla DK.**

Cytochemical analysis of alkaline phosphatase and esterase activities and of lectin-binding and anionic sites in rat and mouse Peyer's patch M cells.

*Am J Anat*, 168: 199-212 (1983)

**Pappo J, Owen RL.**

Absence of secretory component expression by epithelial cells overlying rabbit gut-associated lymphoid tissue.

*Gastroenterology*, 95: 1173-1177 (1988)

**Patzer SI, Baquero MR, Bravo D, Moreno F, Hantke K.**

The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catechololate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN.

*Microbiology*, 149(Pt 9): 2557-70 (2003)

**Poland GA, Jacobson RM.**

The prevention of Lyme disease with vaccine.

*Vaccine*, 19: 2303-2308 (2001)

**Pal U, de Silva AM, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF, Lobet Y, Fikrig E.**

Attachment of *Borelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A.

*J Clin Invest*, 106(4): 561-569

**Pilgrim S, Kolb-Maurer A, Gentschev I, Goebel W, Kuhn M.**

Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility.

*Infect Immun*, 71(6): 3473-3484 (2003)

**Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G.**

Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.

*Nature*, 258(5536): 598-599 (1975)

**Rescigno M, Urbano M, Valzasinam B, Francolini M, Bonasio R, Kraehenbuhl JP.**

Dendritic cells express occludin and claudin, open the tight junctions and sample bacteria preserving epithelial barrier integrity.

*Nature Immunol*, 2: 361-367 (2001)

**Rocourt J, Bille J.**

Foodborne listeriosis.

*Wld Hlth Statist Quart*, 50: 67-78 (1997)

**Sambrook J, Frisch E.F, Maniatis T.**

Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)

**Sansonetti JP, Phalipon A.**

M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: Mechanisms of interaction, consequences for the disease process.

*Immunology*, 11: 193-203 (1999)

**Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA.**

Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food.

*N Engl J Med*, 308: 203-206 (1983)

**Schwan TG, Piesman J.**

Temporal changes in outer surface protein A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice.

*J Clin Microbiol*, 38(1): 382-388 (2000)

**Shao L, Serrano D, Mayer L.**

The role of epithelial cells in immune regulation in the gut.

*Sem Immunol*, 13: 163-175 (2001)

**Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR.**

Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities.

*Arthritis Rheum*, 20: 7-17 (1977)

**Steere AC.**

Lyme disease.

*N Engl J Med*, 345(2): 115-125 (???)



**Studier FW, Moffert BA.**

Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.

*J Mol Biol*, 189(1): 113-130 (1986)

**Tapadar, D.**

Neu Vakzinierungsstrategien: Orale Immunisierung mit rekombinanten kommensalen Lebendvektoren unter Einsatz des AIDA-Autotransportersystems.

Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster (2004)

**Wehkamp**

NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium.

*Infect Immun*, 72(10):5750-8 (2004)

**Wallich R, Brenner C, Kramer MD, Simon MM.**

Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* expressed only *in vivo*.

*Infect Immun*, 63(9): 3327-3335 (1995)

**Wallich R, Simon MM.**

The recombinant outer surface protein A (lip OspA) of *Borrelia burgdorferi*: a Lyme disease vaccine.

*Infection*, 24(5): 396-397 (1996)

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
A. dest.	Destilliertes Wasser
AEBSF	(4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
AIDA	<i>adhesin involved in diffuse adherence</i>
AIDA <sup>c</sup>	AIDA <sup>core</sup> , Translokator-domäne des AIDA
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-triphosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DPBS-PIB	Protein-Inhibitor-Cocktail mit Bestatin-Hydrochlorid in DPBS
DPBS-T	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> mit 0,05% (v/v) Tween-20
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FAE	<i>follicle-associated epithelium</i>
g	Gramm

g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GAM	<i>goat anti mouse</i>
GAR	<i>goat anti rabbit</i>
h	Stunde
His	Histidin
IEL	Intraepitheliale Lymphocyten
IMAC	Immobilisierte Metall Affinitätschromatographie
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
IVC	<i>individually ventilated cages</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPBS	<i>light PBS</i>
M	Molar
MAMP	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μF	Mikrofarrad
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
OspA	<i>outer surface protein A</i>
OspG	<i>outer surface protein G</i>
p.A.	<i>pro analysis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol

---

PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PIC	Proteinaseinhibitorcocktail
PO	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidinfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil pro Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel
ZMBE	Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. M.A. Schmidt für die Überlassung dieses überaus spannenden und abwechslungsreichen Themas, für die Freiheiten bei der Bearbeitung, sowie für seine ständige Bereitschaft zur Hilfestellung und Diskussion.

Herrn Prof. Dr. V. Gerke danke ich für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Inga Benz für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Infektiologie für die sehr gute Zusammenarbeit und die tolle Atmosphäre. Besonders unsere Teerunden und die dabei geführten tiefgreifenden Gespräche werde ich vermissen.

Besonderer Dank gilt meiner Freundin Anja, die es jetzt schon seit mehreren Jahren mit mir aushält. Danke, dass es dich gibt!

Danken möchte ich auch im besonderen Maße meinen Eltern, die mir dieses Studium durch ihre ständige Unterstützung erst ermöglicht haben. Vielen Dank!

## Lebenslauf

Christian Buddenborg  
Diplom Biologe

\* 26.01.1973

ledig, keine Kinder

### Schulbildung

1979-1983 Besuch der kath. Grundschule Josefschule in Münster

1983-1993 Besuch des Gymnasium Paulinum in Münster

### Wehrdienst

Ausbildung zum Transportsoldaten bei der Nachschub-  
ausbildungskompanie 18/I in Wesel bzw. beim Transportbataillon  
4./120 in Werlte

### Studium

1994-2000 Studium der Biologie mit Hauptfach Botanik und Mikrobiologie  
im Nebenfach an der WWU Münster.

1999-2000 Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie der  
Pflanzen mit dem Thema: „Untersuchungen zur Chitin-Deacetylase-  
Aktivität bei der Bildung von Infektionsstrukturen des Weizen-  
pathogens *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*“

2001-2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Infektiologie am Zentrum  
für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE) in Münster

seit 2005 Referendar am Gymnasium Maria-Veen

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

Münster, den 10.03.2005