Meinen Eltern

Nur wer nicht sucht, ist vor Irrtum sicher.
(Albert Einstein)

Institut für Mikrobiologie
Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan
Technische Universität München

Expression und Sekretion von Phagen-kodierten Zellwand-Hydrolasen in *Lactococcus* und *Penicillium*

Susanne Gäng

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. K. Guthy
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
	2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer

Die Dissertation wurde am 16.05.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.06.2001 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		VII
TABELLENVERZEICHNIS		VIII
ZUSAMMENFASSUNG		IX
SUMMARY		XII
1	**EINLEITUNG**	1
1.1	**Listerien**	1
1.1.1	Eigenschaften, Vorkommen und Taxonomie	1
1.1.2	Pathogenität und Listeriose	2
1.1.3	Listerien und Lebensmittel	2
1.2	**Bakteriophagen**	3
1.2.1	Definition, Morphologie und Taxonomie	3
1.2.2	Phagenvermehrung	4
1.2.3	*Listeria*-Phagen	5
1.3	**Phagenlysine**	6
1.3.1	Allgemein	6
1.3.2	Endolysine der *L. monocytogenes* Phagen A511 und A118	7
1.4	**Genmanipulation in *Lactococcus lactis***	8
1.4.1	*Lactococcus*: Eigenschaften und Taxonomie	8
1.4.2	Expressionssysteme in *Lactococcus lactis*	9
1.4.3	Exportmechanismen von *Lactococcus lactis*	10
1.4.3.1	Sekretion von prokaryotischen Proteinen	10
1.4.3.2	Sekretion heterologer Proteine in *L. lactis*	12
1.5	**Schutzkulturen als Mittel der Bio-Konservierung**	14
1.6	**Genmanipulation in filamentösen Pilzen**	16
1.6.1	Einführung	16
1.6.2	Produktion heterologer Proteine in filamentösen Pilzen	17
1.6.3	Transformation und Expression in filamentösen Pilzen	17

2	**MATERIAL UND METHODEN**	19
2.1	**Verwendete Lösungen und Puffer**	19
2.2	**Verwendete Medien**	24
2.3	**Verwendete Mikroorganismen und Plasmide**	26
2.4	**DNA-Präparationen**	29
2.4.1	Isolierung der genomischen Pilz-DNA	29
2.4.2	Isolierung der genomischen DNA aus *Lactococcus lactis*	29
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA	30
2.4.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
2.4.5	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren durch Photometrie	31
2.5	**Amplifizierung der Expressions- und Sekretionskassette**	31
2.5.1	Polymerase-Kettenreaktion	31
2.5.2	Klonierung und Expression der Gene *ply*118 und *ply*511 in *L. lactis*	33
2.5.3	Sekretion der Staphylokokken Nuklease in *L. lactis*	33
2.5.4	Konstruktion der Endolysin Sekretionsvektoren	34
2.5.5	Konstruktion von pELN118	34
2.6	**Gelelektrophorese**	35
2.6.1	Agarosegelelektrophorese	35
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.6.2.1	Mighty Small II System	35
2.6.2.2	Proteintrennung mit Excel-Gelen	36
2.6.2.3	Fixierung und Detektion der Proteinbanden	36
2.7	**Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**	37
2.7.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
2.7.2	Ligation	37
2.8	**Transformation**	38
2.8.1	Elektrotransformation von *Escherichia coli*	38
2.8.1.1	Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen	38
2.8.1.2	Elektrotransformationsbedingungen bei *E. coli*	38
2.8.2	Elektrotransformation von *Lactococcus lactis*	38
2.8.2.1	Herstellung kompetenter *Lactococcus lactis* Zellen	38
2.8.2.2	Elektroporationsbedingungen bei *Lactococcus lactis*	39

2.8.3	Protoplastierung und Transformation in *P. camemberti*	39
2.9	**Nachweis der chromosomalen Integration von pELN118 in *P. camemberti***	40
2.9.1	DNA-Transfer auf eine Nylonmembran durch Vakuum-Blotting	40
2.9.2	Markierung der *ply*118 Sonde mit Digoxigenin	40
2.9.3	Hybridisierungsreaktion	41
2.9.4	Detektion der DIG markierten Hybride	41
2.10	**Nachweis der Expression von *ply*118 in *P. camemberti***	42
2.10.1	Isolierung der Gesamt RNA	42
2.10.2	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	42
2.11	**Detektion der Nuklease Sekretion in *L. lactis***	43
2.11.1	Nuklease-Aktivitätstes	43
2.12	**Endolysin Translation und Sekretion in *L. lactis***	43
2.12.1	Gewinnung von Endoysin Rohextrakten durch Zellaufschluß	43
2.12.2	Anzucht des Indikatorstammes *Listeria monocytogenes* WSLC 1001	43
2.12.3	Definition der lytischen Aktivität	44
2.12.4	Messung der lytischen Aktivität	44
2.12.4.1	Photometer-Test	44
2.12.4.2	Platten-Diffusions-Test	44
2.12.5	Immunologischer Nachweis von rekombinanten Endolysinen	45
2.12.5.1	Probenvorbereitung	45
2.12.5.2	Western-Blotting	45
3	**ERGEBNISSE**	46
3.1	**Konstruktion eines Endolysin-Expressionsvektors für *Lactococcus lactis***	46
3.2	**Vergleich der Promotoren P21, P32 und P59 und Konstruktion von pLC-PL511**	48
3.3	**Produktion der Endolysine Ply118 und Ply511 in *L. lactis***	50
3.4	**Sekretionsvektoren für *L. lactis***	52
3.4.1	Sekretionsvektor pSL-PL511 ermöglicht Export von Ply511	54
3.4.2	Immunologischer Nachweis des sekretierten Ply511	57
3.5	**Endolysin Sekretion in Starterkulturen**	58

3.6 **Endolysin Expression in *Penicillium camemberti*** 59
3.6.1 Konstruktion und Transformation des Endolysin Expressionsvektors 59
3.7 **Integration des *ply*118 Gens ins Genom von *P. camemberti*** 61
3.8 **Detektion des *ply*118 Transkripts** 63
3.9 **Keine Translation des Endolysins in *P. camemberti*** 64

4 **DISKUSSION** 65

4.1 **Endolysin Expression in *Lactococcus lactis*** 65
4.1.1 Die Auswahl der Transkriptions- und Translationselemente 65
4.1.2 Stabile Expression der Endolysine Ply118 und Ply511 66
4.2 **Export in *Lactococcus*** 67
4.2.1 Nuclease - ein geeigneter Export Reporter für *L. lactis* 67
4.2.2 Export von Ply511 68
4.2.3 Transformation der Fusion $_{SP}$*slp*A-*ply*118 führt zur Letalität 69
4.2.4 Einsatzmöglichkeit in der Industrie 70
4.3 **Klonierung von *ply*118 in *P. camemberti*** 71
4.3.1 Vektor pELN118 72
4.3.2 Nicht nachweisbare Detektion des aktiven Endolysins *ply*118 73
4.4 **Endolysine als Biokonservierung - ein Ausblick** 75

5 **LITERATURVERZEICHNIS** 76

6 **ANHANG** 87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGE	Agarose-Gelelektrophorese
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
CTAB	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2' -(5' -chloro)-tricyclo-[3.3.1.1.^{3,7}]-decan}-4yl)-penylphosphat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
DEA	Diethanolamin
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
Ery	Erythromycin
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunden
kD	Kilodalton
l	Liter
L. lactis	*Lactococcus lactis*
m	milli
µ	mikr
M	Molar
MilliQ®	hochreines, pyrogenfreies Wasser nach Kationen-und Anionenaustausch, Umkehrosmose und Ultrafiltration (Millipore)
mRNA	"messenger" RNA
OD_x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	offener Leserahmen

P. camemberti	*Penicillium camemberti*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat = Natriumlaurylsulfat
SOC	Regenerationsmedium für elektroporierte *E. coli*
SSC	Standard-Saline-Citrat Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheit für enzymatische Aktivität
UV	Ultraviolettes Licht
λ	Wellenlänge des Lichts
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung		Seite
1.1	Ausschnitt aus dem Peptidoglykan von Listerien	8
1.2	Typischer struktureller Aufbau eines prokaryotischen Signalpeptids	11
3.1	Schematische Darstellung der Konstruktion der Vektoren pBPL118 und pBPL118-P32	47
3.2	Letzter Konstruktionsschritt des *Lactococcus* Expressionsvektors pLC-PL118-P32	48
3.3	Darstellung der lytischen Aktivität des Zellextrakts aus *L. lactis* (pLCPL118-P32)	49
3.4	Abnahme der optischen Dichte einer *Listeria* Suspension nach Zugabe des rekombinanten Lysins	50
3.5	Immunologische Detektion der Endolysine Ply118 und Ply511	51
3.6	Schematische Darstellung des Sekretionsfragments $_{SP}$*slp*A-*ply*511	53
3.7	Sekretionsvektoren pSL-PL511 und pSL-Δ_{SP}Nuc	54
3.8	Agarose Gelelektrophorese der Vektoren pSL-PL511 und pSL-PL511ΔC	55
3.9	C-Terminale Nukleotidsequenz der Sekretionskassette *slp*A-*ply*511	56
3.10	Nachweis der Sekretion des Endolysins Ply511ΔC	56
3.11	Immunologische Detektion der exportierten Endolysine	58
3.12	Nukleotidsequenz der Transkriptionssignale von pELN118	60
3.13	Expressionsplasmid pELN118 und Selektionsplasmid p3SR2	61
3.14	Nachweis der chromosomalen Integration des *ply*118 Gens durch PCR	62
3.15	Southern Blot Analyse von *P. camemberti* DNA	63
3.16	Analyse der RT-PCR durch Agarose Gelelektrophorese	64

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle		Seite
1.1	Lebensmittelbedingte Listeriose-Ausbrüche der letzten 10 Jahre	3
1.2	Übersicht der wichtigsten Merkmale der *Listeria* Phagen A511 und A118	6
1.3	Übersicht der wichtigsten Merkmale der Endolysin Gene *ply*118 und *ply*511	7
1.4	Überblick über den Export heterologer Proteine in *L. lactis*	14
2.1	Verwendete Mikroorganismen	27
2.2	Verwendete Plasmide	28
2.3	Sequenzen und Templates der verwendeten Amplifizierungsprimer	32
3.1	Zusammenfassung der Wachstumsversuche auf Acetamid-haltigem Minimalmedium	59

ZUSAMMENFASSUNG

Endolysine (Ply) sind zellwandhydrolysierende Enzyme, welche am Ende eines Phagenzyklus die Freisetzung der neugebildeten Phagen ermöglichen. Am FML Weihenstephan (Institut für Mikrobiologie) wurden die Endolysine-Gene *ply*118 und *ply*511 aus den *Listeria monocytogenes* Bakteriophagen A118 bzw. A115 isoliert und sequenziert. Ply118 codiert für eine L-Alanyl-D-Glutaminsäure Peptidase, wohingegen Ply511 als N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase innerhalb des Peptidoglycans die Verbindung zwischen N-Acetyl-D-Muraminsäure und der Aminosäure L-Alanin spaltet. Beide Enzyme führen zur raschen Lyse von *Listeria* Zellen. *Listeria monocytogenes* ist ein ubiquitär vorkommendes Gram-positives Stäbchen, welches als fakultativer Krankheitserreger in Rohmilchprodukten auftreten kann. Das grundlegende Ziel dieser Arbeit war eine Expression dieser Endolysine in Starter- und Reifungskulturen, um einen wirkungsvollen Schutz gegen *Listeria* Kontaminationen in gefährdeten Lebensmittel zu haben. Als Modellorganismen wurden *Lactococcus lactis* und *Penicillium camemberti* ausgewählt.

Für die Expression der Endolysin-Gene *ply*511 und *ply*118 in *Lactococcus* wurde ein Expressionsvektor konstruiert. Für die Transkription in *Lactococcus* wurden die drei *Lactococcus* Promotoren P21, P32 und P59 ausgewählt und getestet. Zuerst wurden die Expressionskassetten P21-*ply*118, P32-*ply*118 und P59-*ply*118 im *E. coli* Vektor pBluescript II (-SK) konstruiert und anschließend in den *Lactococcus-E. coli* Shuttle Vektor pTRKH$_2$ kloniert. Die daraus resultierenden Expressionsvektoren wurden pLC-PL118-P21, pLC-PL118-P32 und pLC-PL118-P59 genannt. Promotor P32 lieferte die beste Ply118 Expression in *Lactococcus*. Daher wurde das Endolysin Ply511 ebenfalls unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt. Der Ply511 Expressionsvektor (pLC-PL511) wurde erfolgreich in *Lactococcus* transformiert. Um jedoch einen extrazellulären Export ins Medium zu erreichen wurde mit Hilfe des Signalpeptids $_{SP}$SlpA aus *Lactobacillus brevis* mit beiden Endolysinen eine Sekretionskassette konstruiert. Zur Überprüfung des Konstruktes wurde mit der *Staphylococcus aureus* Nuklease als Reporterenzym ebenfalls eine Fusion mit dem Signalpeptid durchgeführt. Die drei Sekretionskassetten wurden anschließend stromabwärts zum Promotor P32 in pTRKH2 kloniert und in *Lactococcus* transformiert. Sowohl Ply511 als auch die Nuklease konnten im Überstand nachgewiesen werden. Eine C-terminale Deletion von 80 Aminosäuren im Ply511 führte zu einer verstärkten lytischen Aktivität des sekretierten Endolysins. Es konnten keine Transformanten gefunden werden, welche Ply118 aktiv sekretierten. Eine Sekretion dieses Endolysins scheint toxisch für *Lactococcus lactis* zu sein (GAENG et al. 2000)

Für die Expression des *ply*118-Gens in *Penicillium camemberti* wurde der Shuttelvektor pELN5 ausgewählt. Dieser Vektor verfügt über einen starken Promotor aus *Aspergillus nidulans*. Durch die Klonierung des Endolysins entstand der Pilz-Expressionsvektor pELN118. Die Konstruktion dieses Vektors wurde ebenfalls in *E. coli* durchgeführt. Da keinerlei Selektionsmarker für *P. camemberti* auf diesem Expressionsvektor vorhanden ist, wurde eine Kotransformation mit den Plasmiden pELN118 und p3SR2 durchgeführt. p3SR2 enthält als dominantes Markergen *amd*S aus *Apergillus nidulans*. Dieses Gen kodiert für eine Acetamidase, welche Acetamid spaltet und als Stickstoffquelle zugänglich macht. Die Integration des Endolysin Gens in das Genom wurde über PCR und Southern Blot Analysen nachgewiesen. Zum Nachweis der Expression wurden bei den positiv getesteten Transformanten eine Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) durchgeführt. Zwar konnte die Endolysin mRNA nachgewiesen werden, jedoch war es nicht möglich das Endolysin über Western-Blotting oder Platten-Diffusions-Test nachzuweisen. Gründe dafür könnten die ungenügende Stabilität der mRNA oder die Degradierung des rekombinanten Phagenlysins durch intra- und extrazelluläre Pilzproteasen sein.

SUMMARY

Endolysins are phage-encoded cell wall lytic enzymes which are synthesized late during the virus multiplication and mediate the release of progeny phages. At the Institute of Microbiology, FML Weihenstephan two endolysin genes (*ply*118 and *ply*511) were isolated and sequenzed from the *Listeria monocytogenes* bacteriophages A118 and A511. Ply118 is a L-alanoyl-D-glutamate peptidase and Ply511 acts as N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. Both enzymes induce a rapid lysis of *Listeria* cells. *Listeria monocytogenes* is a widely distributed, gram-positive rod and causes foodborne diseases in dairy products. The expression and secretion of these lysins in starter and ripening organisms such as *Lactococcus lactis* and *Penicillium camemberti* might be a possibility for a "natural protection" against *Listeria monocytogenes* contaminations in dairy products.

For the expression of these endolysin genes *ply*118 and *ply*511 in *Lactococcus* an expression vector was constructed. The three lactococcal promoters P21, P32 and P59 were selected for transcription. First, the expression-cassettes P21-*ply*118, P32-*ply*118 and P59-*ply*118 were created into the *E. coli* vector pBluescript II (-SK) and subsequently cloned into the *Lactococcus*-*E. coli* shuttle vector pTRKH$_2$. These new constructed *Lactococcus* expression vectors were called pLC-PL118-P21, pLC-PL118-P32 and pLC-PL118-P59. The *Lactococcus lactis* strain carrying pLC-PL118-P32 reaches the highest level of Ply118 expression. On the basis of this result, the endolysin *ply*511 was cloned under the control of promoter P32. The Ply511 expression vector was named pLC-PL511. High levels of active enzymes were produced and accumulated in the cytoplasmic cell fractions but were not released from the cell at significant levels. Furthermore the endolysin-genes *ply*118 and *ply*511 were fused with the $_{SP}$*slp*A nucleotid sequence encoding the *Lactobacillus brevis* S-layer protein signal peptide. As a positive control for the construction the *Staphylococcus aureus* nuclease, truncated of its own signalsequence was also fused with $_{SP}$*slp*A. Expression of $_{SP}$*slp*A-*ply*511 and $_{SP}$*slp*A-$_{\Delta SP}$*nuc* from pSL-PL511 and pSL-ΔSPNuc, respectively, resulted in the secretion of both enzymes by *L. lactis* cells. One clone expressed an unusually strong lytic activity, which was found to be due a 115 bp deletion occured within the 3'-end coding sequence. No active *Lactococcus* transformants carrying pSL-PL118 were detectable (GAENG et al., 2000)

Plasmid pELN5 is an integrating mold expression vector, carrying a *E. coli ori* (origin of replication) and a constitutive promoter from the *Aspergillus nidulans* ATP synthase subunit 9 gene *oli*C31. *Ply*118 was inserted downstream of the promoter and the resulting plasmid pELN118 was co-transformed into *Penicillium camemberti*, along with the selectable plasmid

p3SR2 carrying the dominant *amd*S marker gene of *Aspergillus nidulans*. Selection was carried out on minimal plates with acetamid as sole N-source. Chromosomal integration of the co-transformed vector in *Penicillium* was verified by PCR amplification and Southern blot analysis. With RT-PCR the endolysin mRNA was detected. Nevertheless no possibility existed to monitor the translation of the active enzyme by western-blotting or plate diffusion tests. This may have be due to very low levels of translation, or degradation of the protein by fungal proteases.

1 EINLEITUNG

1.1 Listerien

1.1.1 Eigenschaften, Vorkommen und Taxonomie

Listerien sind kleine, Gram-positive, kokkoide, nicht sporen- und nicht kapselbildende Stäbchen (Durchmesser: 0,5 µm; Länge: 1-2 µm) (SEELIGER und JONES, 1986). Je nach Alter und Medium können Listerien jedoch eine variable Zellmorphologie annehmen. Im Schräglicht bei einem Winkel von 45° erscheinen Listerien charakteristisch bläulich irisierend (HENRY, 1933). Aufgrund ihrer peritrichen Begeißelung zeigen sie in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedliche Bewegungsmuster (CARPENTER und SEVOIAN, 1983). Ihr Wachstum erfolgt unter aeroben bis fakultativ anaeroben Bedingungen in einem Temperaturbereich von 2 °C - 45 °C bei pH-Werten von 4,4 - 9,6. Ebenso sind sie in der Lage sich bei einer Salzkonzentration bis 10 % NaCl (w/v) und einem a_w Wert kleiner als 0,93 zu vermehren.

Ihre Anspruchslosigkeit ermöglicht Listerien verschiedenste Habitate (z.B Silage, Boden, Pflanzen, Abwasser) zu besiedeln. DIJKSTRA (1971) zeigte , daß *L. monocytogenes* 4 - 6 Jahre in natürlich kontaminierter Silage überleben kann. Ebenso ist *L. monocytogenes* im tierischen wie auch menschlichen intestinal Trakt als natürlich vorkommender Bewohner nachzuweisen (KLUGE, 1990).

In den letzten drei Jahrzehnten wurden mehrere Versuche unternommen den Genus *Listeria* eindeutig einer Gruppe zuzuordnen. Anhand der Phänetik, Chemotaxonomie und verschiedenen rRNA Sequenzanalysen wurde eine Zuordnung zu den coryneformen Bakterien abgelehnt. Allgemein anerkannt ist die nahe Verwandschaft zu *Brochothrix*. Bis heute bleibt jedoch eine eindeutige Klassifikation schwierig (ROCOURT, 1999).

Mit Hilfe von DNA/DNA - Hybridisierungen, Restriktionsanalysen und 16S rRNA Katalogisierungen erfolgt derzeit eine Unterteilung in folgende sechs Spezies: *L. monocytogenes*, die nah verwandten *L. innocua*, *L. ivanovii* (ssp. *ivanovii* und ssp. *londoniensis*) sowie *L. welshimeri*, *L. seeligeri* und *L. grayi* (*L. murrayi* wurde kürzlich in diese Spezies aufgenommen) (ROCOURT und COSSART, 1997).

1.1.2 Pathogenität und Listeriose

Pathogene Listerien sind in der Lage in menschliche Körperzellen einzudringen und sich intrazellulär zu vermehren. Sie entziehen sich dem Immunsystem indem sie direkt von einer Wirtszelle in die Nachbarzelle vordringen ohne im extrazellulären Milieu erscheinen zu müssen. Die Invasion in die Wirtszelle ermöglicht ein Hämolysin, welches bei *L. monocytogenes, L. ivanovii* und *L. seeligeri* nachweisbar ist (GOUIN et al., 1994). Jedoch zählen nur *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* zu den opportunistisch humanpathogenen, wobei nur *L. monocytogenes* bei der humanen Listeriose von Bedeutung ist. Das pathogene Potential von *L. monocytogenes* ist zwar unabhängig vom Serovar (SV), jedoch wurden bei 95% der an Listeriose erkrankten Patienten die Serovare 1/2a, 1/2b und 4b nachgewiesen (ROCOURT und COSSART, 1997). Listeriose äußert sich beim Menschen mit intaktem Immunsystem meist in Form eines leichten grippalen Infekts. Ganz anders reagieren ältere und immungeschwächte Menschen auf eine Infektion mit *L. monocytogenes*, wobei Sepsis, eitrige Meningitis und Enzephalitis die häufigste Manifestation darstellen. Schwangere Frauen haben aufgrund ihrer Immunsuppression ein zwölffach höheres Risiko an Listeriose zu erkranken als die Durchschnittsbevölkerung (HOF, 1999). Da Listerien die Plazenta-Barriere überwinden, kann sich die Infektion auf das Kind übertragen. Die Folgen sind häufig Fehl-, Frühgeburten oder neonatale Sepsis (Letalität 50 %).
Die infektiöse Dosis ist unbekannt und abhängig vom Immunstatus der betroffenen Person. Eine Listerieninfektion erfolgt meist über kontaminierte Lebensmittel. Jedoch können Listerien sowohl durch direkten Kontakt (SEELIGER, 1961) als auch durch Tröpfcheninfektion (MAZULLI und SALIT, 1992) übertragen werden. Zwar ist die Zahl der Erkrankungen in Deutschland relativ gering (200 Einzelerkrankungen pro Jahr (BGVV, 1999), jedoch liegt die Mortalitätsrate bei 30 % und übertrifft damit die Salmonellosen.

1.1.3 Listerien und Lebensmittel

In den letzten 10 Jahren wurden weltweit zahlreiche Listeriose Ausbrüche (Tabelle 1.1) gemeldet, die durch den Verzehr von mit *Listeria monocytogenes* kontaminierten Lebensmitteln verursacht wurden. Insbesondere Lebensmittel tierischer Herkunft wie Rohmilch und rohes Fleisch, aber auch Salate, rohes Gemüse und nicht erhitzte Fertigprodukte können pathogene Listerien enthalten. Zwar werden durch ordnungsgemäß durchgeführtes Pasteurisieren Listerien abgetötet, jedoch ergeben sich durch mangelnde Hygiene der Produktionsanlagen und des

Personals erneute Rekontaminationsmöglichkeiten für das Produkt. Untersuchungen der Gesundheitsbehörden der einzelnen Bundesländer ergaben, daß bei Weichkäse 2,2 %, bei Schafs- und Ziegenkäse 4 %, bei Brühwürsten 6,9 % und bei geräucherten Fischerzeugnissen 5,9 % der untersuchten Proben mit Listerien belastetet waren (BGVV, 1999).

Tabelle 1.1: Lebensmittelbedingte Listeriose-Ausbrüche der letzten 10 Jahre.

Jahr/Ort	kontaminiertes Lebensmittel	Fälle	Literatur
1990 Australien	Pastete	11	KITTSON, 1992
1992 Frankreich	Schweinezunge in Aspik	279	JAQUET et al., 1995
1993 Frankreich	Schweinepastete	39	JAQUET et al., 1995
1994 USA	Schokoladenmilch	66	DALTON et al., 1997
1995 Frankreich	Brie de Meaux	33	JAQUET et al., 1995
1997 Italien	Mais	1594	RYSER, 1999
1998 USA	Hot dogs	50	BATT, 1999
2000 Frankreich	Schweinezunge in Aspik	26	DOROZYNSKI, 2000

Aufgrund ihrer Omnipräsenz und ihrer Fähigkeit bei reduziertem Sauerstoffangebot und Temperaturen unter 8 °C zu wachsen, gibt es bis heute keinen sicheren Schutz vor *Listeria* Infektionen. Daher empfiehlt das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV, 1999) Fleisch- und Fischgerichte vollständig durchzugaren, Rohmilch abzukochen und Hackfleisch nicht roh zu essen. Ebenso sollten Schwangere auf den Genuß von Rohmilchweichkäse und den Verzehr von Käserinde verzichten.

1.2 Bakteriophagen

1.2.1 Definition, Morphologie und Taxonomie

Bakteriophagen sind bakterienspezifische Viren. Sie verhalten sich als obligat intrazelluläre Parasiten, die entweder DNA oder RNA als genetisches Material enthalten. Um sich zu vermehren und neue, infektiöse Viruspartikel bilden zu können, sind sie von den Stoffelwechselleistungen der infizierten Zelle abhängig (KLAUS et al., 1992). Bakteriophagen besitzen eine sehr hohe Wirtsspezifität und sind sowohl in Eubakterien, Cyanobakterien, Archaebakterien, als auch in Spirochaeten und Mycoplasmen anzutreffen (ACKERMANN et al., 1978). Die Phagenforschung ist eine wichtige Disziplin innerhalb der Mikrobiologie. Ihre

Ergebnisse sind wichtige Hilfsmittel für die Molekularbiologie, Virologie und Genetik. Bis heute gibt es keine einheitlichen Richtlinien für eine Klassifikation der Bakteriophagen. Grundsätzlich unterscheidet man die Phagen anhand ihrer Morphologie und ihres Genoms. BRADLEY (1965 und 1967) schuf die Grundlage für die heutige existierende Taxonomie. Anhand morphologischer Merkmale teilte er die Bakteriophagen in 6 Hauptgruppen (Morphustypus A-F). Dieses System wurde weitgehend akzeptiert und später durch genauere Differenzierungen und durch Eingliederung neu entdeckter Phagen erweitert (ACKERMANN und DUBOW, 1987). Das Internationale Komitee für Virustaxonomie definierte 1990 taxonomische Familien für alle bekannten Bakteriophagen. Dabei wurden die Phagen in 13 Familie und 8 Gattungen aufgeteilt.

1.2.2 Phagenvermehrung

Die Phagenvermehrung gliedert sich in 4 Abschnitte:

1.) Adsorption an die Wirtszelle
2.) Injektion des genetischen Materials
3.) Replikation der viralen Gene und Synthese viraler Proteine
4.) Zusammenbau der Phagen-DNA mit den Hüllproteinen zum reifen Phagen und Freisetzung der neuen Phagengeneration

Der Vermehrungszyklus, bei dem der Phage die vollständige Kontrolle über den Bakterienstoffwechsel übernimmt und die Zelle zwingt ausschließlich neue Phagen zu produzieren, wird als "lytischer" Zyklus bezeichnet. Virulente Phagen können nur diesen lytischen Zyklus einschlagen. Die einzelnen Entwicklungsprozesse, vom Befall der Wirtszelle bis zur Freisetzung des reifen Viren, sind anhand der *E. coli* Bakteriophagen T2, T4 und T6 biochemisch, genetisch und morphologisch weitgehend geklärt. Filamentöse und pleomorphe Phagen besitzen im allgemeinen einen alternativen Entwicklungsweg. Sie infizieren ihr Wirtsbakterium, ohne dessen direkte Lyse herbeizuführen. Diese Phagen setzen eine sofortige Phagenproduktion aus und gehen mit der als "lysogen" bezeichneten Wirtszelle eine stabile Wechselwirkung ein. Das reprimierte Phagengenom wird als Prophage bezeichnet und bei jeder Zellteilung vermehrt. Prophagen integrieren entweder in das Wirtschromosom oder replizieren sich autonom als Plasmid (KLAUS et al., 1992). Eine spontane Lyse lysogener Bakterien tritt nur selten auf. Durch Einwirkung von UV-Licht (LWOFF et al., 1950) oder Mitomycin C (OTSUJI, 1959) wird der Prophage zur Bildung und Freisetzung infektiöser Phagen induziert. Eine derartige Induktion ist jedoch auch von der genetischen Konstitution der Prophagen, vom physiologischen Status der Wirtszelle sowie von den Kulturbedingungen abhängig. Der inaktive

Zustand des Prophagen beruht offenbar auf der Aktivierung von Repressormolekülen, welche für die Aufrechterhaltung der Lysogenie verantwortlich sind. Ebenso gibt es Prophagen, die durch Mutationen in essentiellen Strukturgenen oder in regulatorischen Genen die Fähigkeit verloren haben einen kompletten Infektionszyklus durchzuführen (CAMPELL, 1977). Diese sogenannten defekten Phagen können spontan oder durch Induktion freigesetzt werden. Dabei bilden sie grundsätzlich keine distinkten Phagenplaques, sondern zeigen vielmehr Inhibitionszonen.

1.2.3 Listeria-Phagen

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind über 300 *Listeria*-Phagen beschrieben worden. Die meisten aller Phagen konnten dabei aus *Listeria monocytogenes* isoliert werden. Ein wichtiges Anwendungsgebiet der *Listeria*-Phagen ist der Einsatz zur Differenzierung von *Listeria*-Stämmen. Dabei kann durch das Lyse-Verhalten der zu untersuchenden Stämme gegenüber den Phagen eine Differenzierung unterhalb der Spezies- und Serovarebene erfolgen. Die Mehrzahl der *Listeria*-Phagen gehört zum Typus der *Siphoviridae*, welche ein isometrisches Kapsid (∅ 62-66 nm) und einen langen, flexiblen Schwanz mit 170 - 300 nm Länge aufweisen. Ingesamt 4 Phagen konnten zu den *Myoviridae* zugeordnet werden. Sie verfügen über einen ikosaedrischen Kopf mit kontraktilem Schwanz.

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit sind die *Listeria*-Phagen A511 und A118. Tabelle 1.2 gibt Auskunft über die wichtigsten Merkmale dieser Phagen. Der Phage A511 nimmt jedoch eine Sonderstellung unter den *Listeria*-Phagen ein. Unter allen bisher beschriebenen *Listeria*-Phagen hebt er sich durch sein virulentes Verhalten und durch sein extrem breites Wirtsspektrum hervor. Weiterhin auffallend ist sein ungewöhnlich großes Genom (LOESSNER et al., 1994), sein überdurchschnittlich großer Kopf (ZINK und LOESSNER, 1992) und die von ihm gebildeten großen Plaques mit deutlichen, sekundären Lysehöfen (LOESSNER, 1991).

Tabelle 1.2: Übersicht der wichtigsten Merkmale der *Listeria*-Phagen A511 und A118

Phagen	**A511**	**A118**
Familie	*Myoviridae*	*Siphoviridae*
Lyseverhalten	virulent	temperent
Wirtsstamm	*L. mono.* WSLC 1003	*L. mono.* WSLC 1003
Wirtspriorität	*Listeria* genusspezifisch	*L. mono.* SV1/2
Genomgröße	~ 116 kbp	~ 37 kbp
Literatur	LOESSNER und BUSSE, 1990	LOESSNER, 1991

1.3 Phagenlysine

1.3.1 Allgemein

Die Freisetzung der Phagen-Nachkommen erfolgt durch das genaue Zusammenspiel zweier phagen-codierter Proteine. Dabei bildet ein hydrophobes Membranprotein (Holin) unspezifische Schleusen in die Zytoplasmamembran, durch welche eine hochaktive Hydrolase (Endolysin) zu ihrem Wirkungsort, dem Peptidoglycan gelangt und zur Lyse der Zelle führt (YOUNG, 1992, YOUNG und BLÄSI, 1995). Dieses Zwei-Komponenten-System besitzen sowohl Phagen mit Gram-negativen als auch Gram-positiven Wirten. In den letzten Jahren wurden mindestens 12 unterschiedliche Holin-Familien ermittelt, wobei sie zu einer der größten heterologen Gruppen der funktionellen Proteine zählen (YOUNG und BLÄSI, 1995). Endolysine können ebenfalls anhand ihrer Funktionalität in vier verschiedene Enzymklassen unterteilt werden: Glycosidasen, Amidasen, Endopeptidasen und Transglykosylasen (YOUNG und BLÄSI, 1995, LOESSNER et al., 1995).

Viele Endolysine besitzen auffallende Homologien zu Autolysinen der jeweiligen Wirtsbakterien. Autolysine sind bakterielle Mureinhydrolasen, welche bei der Teilung und Wachstum der Zelle eine bedeutende Rolle spielen. Ebenso beschrieben mehrere Autoren (SHEEHAN et al., 1997; LOESSNER et al., 1997, 1998, und 1999) den modular organisierten Aufbau lytisch aktiver Enzyme. Dabei befindet sich die enzymatische Aktivität im N-terminalen Bereich, wohingegen im C-Terminus die Substraterkennung und/oder die Bindung des Enzyms an die verschiedenen Zellwandsubstrate lokalisiert ist (LOESSNER et al., 1999 und 1998).

Anwendungen finden Phagenlysine unter anderem in der kontrollierten Expression einer Holin-Lysincassette in *Lactococcus lactis*, um eine induzierbare Lyse des Wirtsstamms zu bewirken

und so Einfluß auf die Reifung fermentierter Produkte zu nehmen (DE RUYTER et al., 1996; SANDERS et al., 1997).

1.3.2 Endolysine der *L. monocytogenes* Phagen A511 und A11

Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind die Endolysine der *L. monocytogenes* Bakteriophagen A511 und A118 (siehe Tabelle 1.2). Beide Endolysine (Ply) wurden am Institut für Mikrobiologie, FML Weihenstephan isoliert und identifiziert. Die Ergebnisse der Analyse von Nukleotid- und Aminosäurensequenz sind in Tabelle 1.3 zusammengefaßt. Der Vergleich beide Endolysin-Sequenzen ergab auf DNA Ebene nur geringe Homologie, jedoch zeigte sich in einem 113 Aminosäuren langen, C terminalen Bereich 43 % Identität und 80 % Ähnlichkeit (LOESSNER et al., 1995)

Die Substratspezifität beider Enolysine wurde von WENDLINGER (1995) mit Hilfe von Dünnschicht- und HPL Chromatographie ermittelt. Ply118 zeigte dabei L-Alanyl-D-Glutaminsäure Peptidase-Aktivität, wobei es sich bei Ply511 um eine N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase handelt (Abb.1.1). Bei exogener Zugabe eines der Endolysine zu einer Listerien-Suspension kommt es zu einer sehr raschen Abnahme der optischen Dichte. Dabei zeigte Ply511 ausschließlich bei Listerien-Stämmen lytische Aktivität. Hingegen ist Ply118 ebenso in der Lage Zellen von *Bacillus polymyxa*, *B. subtilis* und *B. megaterium* zu lysieren (LOESSNER et al., 1995). Aufgrund ihrer sehr schnellen und effektiven Hydrolyse von *Listeria*-Zellen und ihrer Spezifität sind Ply118 und Ply511 ideale Werkzeuge für die direkte Hemmung von *Listeria monocytogenes*. Biotechnologisch wurde Ply118 für die rasche Lyse von *Listeria* Zellen zur Gewinnung von Nukleinsäuren (LOESSNER et al., 1995) sowie zur Selbsttötung von intrazellulären Listerien in Makrophagen (DIETRICH et al., 1998) eingesetzt.

Tabelle 1.3: Übersicht über die wichtigsten Merkmale der Endolysin-Gene *ply*118 und *ply*511

Gen	Anzahl der Nukleotide	Anzahl der Aminosäuren	Molekulargewicht des Genprodukts	Isoelektrischer Punkt	Literatur
*ply*118	846 bp	281 aa	30,8 kDa	10,2	LOESSNER et al., 1995
*ply*511	1026 bp	341 aa	36,5 kDa	10,1	

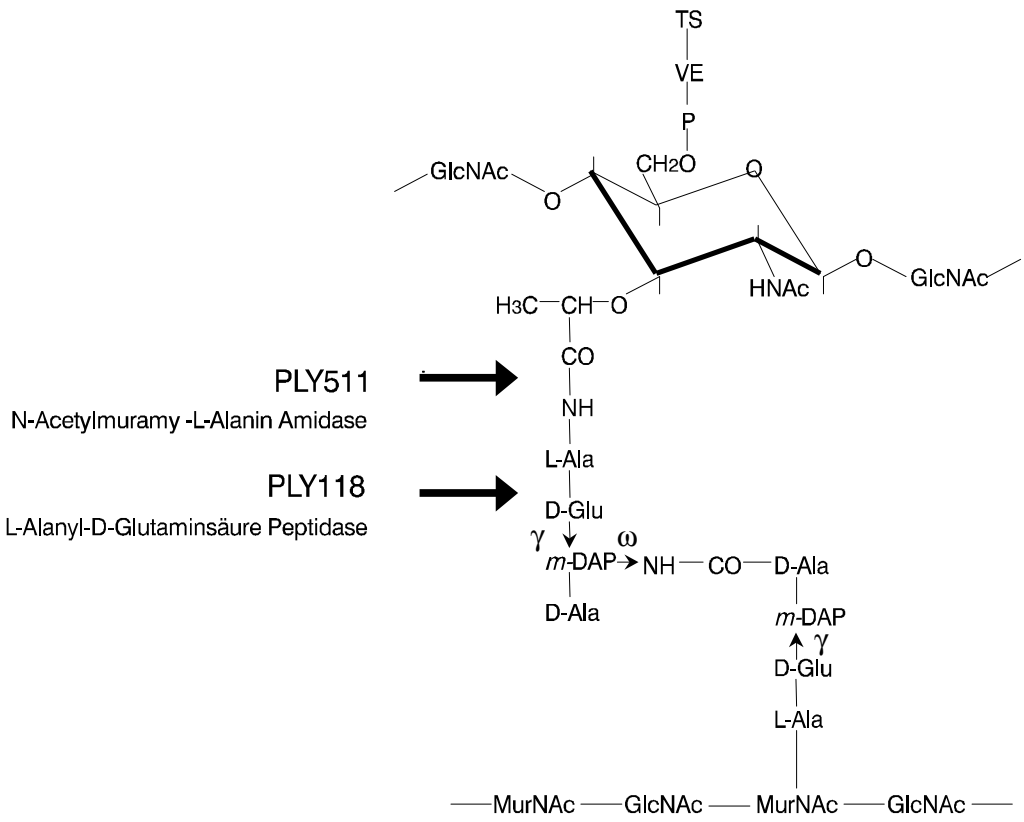

Abbildung 1.1: Ausschnitt aus dem Peptidoglycan von Listerien. Die Pfeile markieren die von Ply118 und Ply511 spezifisch gespaltenen Bindungen innerhalb der Peptidbrücken des Mureins. *GlcNAC=N-Acetyl-D-Glucosamin, MurNAc=N-Acetyl-D-Muraminsäure, L-Alanin, D-Glu=D-Glutaminsäure, mDAP=meso-Diaminopimelinsäure, TS=Teichonsäure, VE=Verbindungseinheit zum Peptidoglykan* (modifiziert nach WENDLINGER, 1995)

1.4 Genmanipulation in *Lactococcus lactis*

1.4.1 *Lactococcus*: Eigenschaften und Taxonomie

Lactococcus gehört zusammen mit 10 weiteren Gattungen (*Aerococcus*, *Alloecoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* und *Vagococcus*) zur Gruppe der Milchsäurebakterien. Milchsäurebakterien sind Gram-positive, nicht sporenbildende Bakterien, die aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale in eine Gruppe zusammengefaßt wurden. Zur Energiegewinnung sind sie ausschließlich auf Kohlenhydrate angewiesen, welche sie zum größten Teil zu Milchsäure fermentieren. Weitere Merkmale sind das Fehlen eines Elektronen-Transportsystems zur aeroben Synthese von ATP und ihr Bedarf an Supplinen. Trotz ihrer Unfähigkeit der Porphyrinsynthese

sind viele Milchsäurebakterien in der Lage in Gegenwart von Luftsauerstoff zu wachsen und sind somit aerotolerant.

Lactococcus spec. fermentieren Kohlenhydrate homofermentativ und wachsen bei 10 °C, jedoch nicht bei 45 °C. Zur Zeit umfaßt die Gattung 5 Spezies: *L. lactis, L. garviae, L. plantarium, L. piscium* und *L. raffinolactis* (SCHLEIFER, 1985, WILLIAMS et al., 1990). Zur Differenzierung innerhalb der Gattung werden das Peptidoglycangerüst, die 16S rRNA, die Lipoteichonsäuren der Zellwand sowie die Fähigkeit zur Argininverwertung und die maximale Wachstumstemperatur herangezogen (SCHLEIFER et al., 1985; SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ, 1987). Die Mehrheit der Laktokokken sind unbeweglich und überwiegend nicht-hämolytisch. Ausnahmen sind einige *L. lactis* Stämme, welche allerdings nur eine schwache α-hämolytische Reaktion aufweisen. In der milchverarbeitenden Industrie spielt nur *Lactococcus lactis* eine Rolle, welcher in drei Subspezien *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis* und *L. lactis* ssp. *hordniae* eingeteilt wird. *L. lactis* ssp. *cremoris* ist die einzigste Laktokokkus Spezies, die nicht bei 4 % (w/v) NaCl wachsen kann und nur einen Salzgehalt von maximal 2 % (w/v) NaCl toleriert. Eine weitere wichtige phänotypische Eigenschaft einiger Laktokokken ist die Verwertung von Citrat zu Kohlendioxid und Aromastoffen. Dabei sind der Citrattransport ausschließlich Plasmid codiert (DAVID et al., 1990) und die Hydrolyse von Citrat zu Oxalacetat und Acetat durch eine Citrat-Lyase chromosomal kodiert.

1.4.2 Expressionssysteme in *Lactococcus lactis*

Laktokokken besitzen eine lange Tradition bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel. Ihre Aufgabe ist dabei die Produktion von Milchsäure und Aromastoffen sowie die Konservierung des Produkts. Aufgrund des ansteigenden Bedarfs an fermentierten Lebensmittel und die zunehmende Technisierung der Produktion sind die Anforderungen an eine moderne Starterkultur enorm. Diese wirtschaftliche Bedeutung war der Ausgangspunkt für das zunehmende Interesse an der Genetik und Physiologie von Laktokokken. Große Anstrengungen wurden unternommen um Stämme zu entwickeln, welche durch ihre Stabilität, Produktivität und Phagenresistenz den Fermentierungsprozeß beschleunigen und kontrollierbar machen. Zusätzlich gehören Laktokokken zu den GRAS (generally recognized as safe) Organismen, so daß sie ohne Bedenken wirtschaftlich genutzt werden können. Die ersten *Lactococcus lactis* Protoplasten wurden 1982 erfolgreich mit Plasmid DNA transformiert (KONDO et al., 1982). Seitdem wurden zahlreiche Arbeiten über erfolgreiche Transformationstechniken beschrieben (GASSON und FITZGERALD, 1994; O'SULLIVAN und FITZGERALD, 1999). Ein weiterer Fortschritt war die

Entwicklung plasmid-freier Stämme, wie *L. lactis subsp. lactis* MG1363 (GASSON et al.,1983) und IL1403 (CHOPIN et al., 1984), welche die Analyse von Transformations- und Klonierungsexperimenten signifikant erleichterten.

Klonierungsvektoren der ersten Gruppe leiteten sich vom Plasmid pAMβ1von *Enterococcus faecalis* ab. Dieses Plasmid zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum und durch den "Theta"-Replikationsmechanismus aus. Plasmide replizieren sich durch zwei unterschiedliche Mechanismen, welche einen Einfluss auf die Stabilität der Plasmide nehmen. Beim sogenannten "rolling circle" entstehen während der Replikation einzelsträngige DNA Zwischenprodukte und hochmolekulare Plasmidmultimere, welche sich negativ auf die Struktur als auch die Segregation der Plasmide äußern. Beim Theta-Replicationsmechanismus entstehen keine einzelsträngige DNA Zwischenprodukte bzw. hochmolekulare Plasmidmultimere. Daher besitzen Plasmide, welche sich mit diesem Mechanismus replizieren eine höhere Stabilität. Die zweite Gruppe der Plasmide entwickelten sich aus kryptischen Laktokokken Plasmide (z.B. pWV01) ab. Sie zeichnen sich ebenfalls durch ein breites Wirtsspektrum aus. Jedoch liegen sie nur in einer niedrigen Kopienzahl in *L. lactis* vor und ihre Replikation nach dem "rolling circle" Mechanismus verleiht ihnen eine stärkere Instabilität.

Diese Klonierungsvektoren waren die Basis für die Entwicklung spezieller Vektoren, die zur Isolierung von Promotoren (ISRAELSEN et al., 1995; WATERFIELD et al., 1995; PLATTEEUW et al., 1994), Terminatoren (VAN DER VOSSEN et al., 1985) und Exportsignalen (POQUET et al., 1998; LE LOIR et al., 1994; PEREZ-MARTINEZ et al., 1992;) dienten. Anhand dieser Daten über Transkriptions- und Translationssysteme wurde die Expression von homologen und heterologen Genen in *L. lactis* erst ermöglicht.

DE VOS und SIMONS (1988) fusionierten das *lac*Z Gen von *E. coli* mit den Expressionssignalen einer Laktokokken-Protease und ermöglichten dem Laktose-negativen Laborstamm *L. lactis* MG1363 das Wachstum auf Laktose. Weitere Proteine wie Rinder-Prochymosin (DE VOS et al., 1989), Neutral-Protease aus *Bacillus subtilis* (VAN DE GUCHTE et al., 1990) sowie eukaryotisches als auch prokaryotischen Lysozym wurden erfolgreich in *L. lactis* (VAN DE GUCHTE et al., 1992) produziert.

1.4.3 Exportmechanismen in *Lactococcus lactis*

1.4.3.1 Sekretion von prokaryotischen Proteinen

Proteine, Peptide, Polysaccharide und viele andere Moleküle werden im Zytoplasma produziert. Um jedoch an ihren Wirkungsort gelangen zu können, müssen viele dieser Metabolite durch die

Cytoplasmamembran transportiert werden. Dabei verwenden sie hauptsächlich zwei unterschiedliche Exportmechanismen: den sogenannten Sec-abhängigen und den Sec-unabhängigen Transportmechanismus.

Sec-abhängiger Export: Die Mehrzahl der exportierten Proteine besitzen N-Terminal ein sogenanntes Signalpeptid mit dessen Hilfe sie durch die Membran geschleust werden. Signalpeptide besitzen zwar auf DNA Ebene kaum Homologien zueinander, jedoch findet sich bei allen typische strukturelle Merkmale. Sie kennzeichnen sich durch einen positiv geladenen N-Terminus (N-Domaine, 5-6 Aminosäuren), einen hydrophoben Kern (H-Domaine, 8-15 Aminosäuren) und einen mehr polaren C-Terminus (C-Domaine) aus (HEIJNE, 1986). Die C-Region enthält außerdem die Erkennungsstelle für die Signalpeptidase I, welche das Signalpeptid nach erfolgreicher Translokation vom eigentlichen Protein abspaltet. Abbildung 1.2 zeigt den strukturellen Aufbau eines typischen Signalpeptides. Kürzungen oder der Einbau von positiv geladenen oder stark polaren Aminosäuren in die H-Domaine oder das Eliminieren von basischen Aminosäuren im N-Bereich, führen zur einer verminderten Sekretionseffizienz.

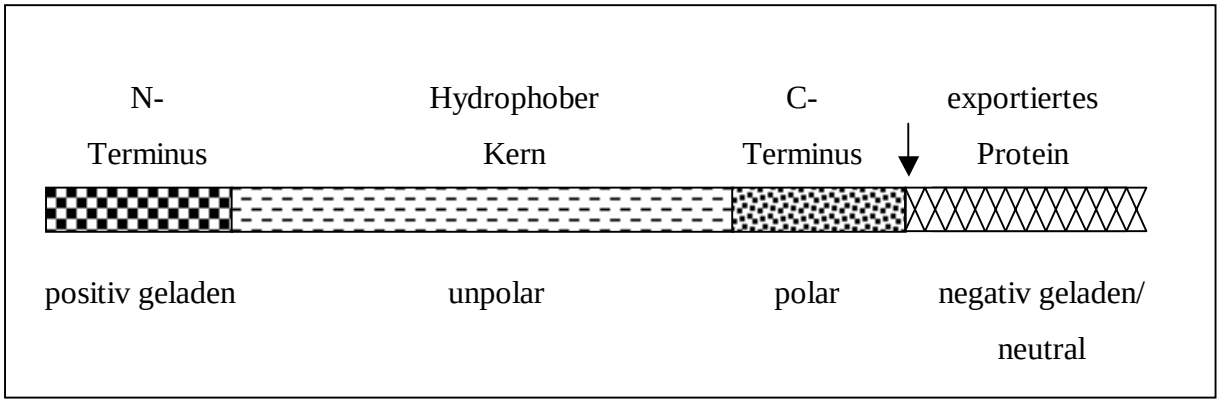

Abbildung 1.2: Typischer struktureller Aufbau eines prokaryotischen Signalpeptids. Der Pfeil markiert die Stelle, wo die Abspaltung des Signalpeptids erfolgt. Ebenso ist der N-terminale Bereich des zu exportierenden Proteins zu sehen (modifiziert nach IZARD und KENDALL, 1994).

Beim Transport eines Proteins muß ein genaues Zusammenspiel unterschiedlichster Schritte wie Synthese, Membraninsertion, Translokation und die Abspaltung des Signalpeptides vom reifen Protein erfolgen. Eine wichtige Rolle übernehmen dabei die sogenannten Sec-Proteine, deren Funktion im Sekretionsmechanismus in *Eschericha coli* aufgeklärt wurde (PUGSLEY, 1993). Arbeiten an *Lactococcus* und *Bacillus* haben ergeben, daß dieses System ebenfalls auf Gram-positive Bakterien übertragen werden kann (SIMONEN und PALVA, 1993; KOIVULA et al., 1991).

Sec-unabhängiger Export: Proteine, welche mit dem Sec-unabhängigen-Mechanimus exportiert werden, fehlt ein typisches Signalpeptid. Zwar besitzen einige von ihnen ein sogenanntes Leaderpeptid, jedoch ohne den von HEIJNE (1986) beschriebenen Aufbau. Die Leaderpeptide der zur Gruppe II gehörenden Bakteriozine zeichnen sich durch signifikante Homologien auf Aminosäureebene aus. Ebenso auffallend sind zwei konservierte Glycinereste an Position -1 und -2, welche die proteolytische Schnittstelle vom "reifen" Bakteriozin markieren (FREMAUX et al., 1993; HAVARSTEIN et al., 1994). Beim Transport sind mindestens vier Proteine beteiligt, welche meist sehr spezifisch auf das zu exportierende Protein abgestimmt sind. Zwei dieser Proteine sind sogenannte transmembrane Translokatoren, welche zur Familie der ABC Proteine (ATP binding cassette) gehören. Diese Proteine zeichnen sich durch eine transmembrane und eine zytoplasmatische, ATP-bindende Domaine aus (FATH und KOLTER, 1993). So werden zum Beispiel NisT (Nisin), LcnA (Lactococcin A) und PedD (Pediocin PA-1) mit Hilfe von ABC Transportern exportiert (ENGELKE et al., 1992; MARUGG et al., 1992; STODDARD et al., 1992).

1.4.3.2 Sekretion heterologer Proteine in *L. lactis*

In den letzten zehn Jahren wurden enorme Anstrengungen unternommen die Sekretionsmechanismen in *Lactococcus lactis* zu verstehen. Mit Hilfe von Reportergenen (z.B. Alkaline Phosphatase (PhoA) (HOFFMANN und WRIGHT, 1985), TEM β-Lactamase (BlaM) (BROOME-SMITH et al., 1990), α-Amylase (AmyL) (HOLS et al., 1992) und Nuclease (Nuc) (POQUET et al., 1998)) wurden Signalsequenzen aus *Lactococcus* isoliert. Jedoch sind bis heute nur wenige Exportproteine und ihre Funktion in *L. lactis* bekannt. Sie alle besitzen klassische Signalpeptide und werden wahrscheinlich durch den Sec-abhängigen Sekretionsmechanismus transportiert. Das größte davon ist eine Serin-Protease (200 kDa, PrtP), welche aus mehreren *L. lactis* Stämmen isoliert wurde. Sie ist das Schlüsselenzym in der Kaskade des proteolytischen Systems, welches Laktokokken ermöglicht in Milch zu wachsen. Eine weitere Serin-Protease (NisP), welche in die Abspaltung des Leaderpeptides von Nisin involviert ist, wurde aus *L. lactis* Tn5726 isoliert. Die Protease Usp45 ist ein Exportprotein unbekannter Funktion und wird von allen Laktokokken sekretiert. Ihr Signalpeptid ($_{SP}$Usp45) besteht aus 27 Aminosäuren. Das besondere an $_{SP}$Usp45 ist eine zusätzliche Schnittstelle für die Signalpeptidase I (ASSELDONK et al., 1990). Mit Hilfe der Signalpeptide von PrtP und Usp45 wurden viele heterologe Proteine in *Lactococcus lactis* exportiert. Tabelle 1.4 gibt einen Überblick über den Export heterologer Proteine in *Lactococcus lactis* durch homologe und heterologe Signalpeptide.

Dabei wurden jedoch nur Signalpeptide verwendet, welche den Sec-abhängigen Sekretionsmechanismus verwenden. VAN BELKUM et al. (1998) zeigte in seiner Arbeit den Export von heterologen Proteinen durch den Sec-unabhängigen Mechanismus. Dabei fusionierte er das Bakteriozin Divergicin aus *Carnobacterium divergens,* welches normalerweise durch den "Allgemeinen Sekretionsweg" (Sec-abhängigen Mechanismus) exportiert wird (WOROBO et al., 1995), mit dem Leaderpeptid von Lactococcin A aus *Lactococcus lactis*. Dabei zeigte sich, daß das Leaderpeptid zusammen mit dem spezifischen Lactococcin A Sekretionsapparat den Export von Divergicin ermöglichte. Ebenfalls konnte das Bakteriozin Pediocin PA-1 aus *Pedicoccus acidilactici* mit dem Leaderpeptid und dem spezifischen Translokationsapparat von Lactococcin A in *Lactococcus lactis* erfolgreich sekretiert werden (HORN et al.,1998). Van Belkum und Horn konnten somit in ihren Arbeiten aufzeigen, daß das konservierte Glycin Doppel-Motiv der Leaderpeptide als Erkennungssignal für die ABC Transporter dienten.

Das S-Layer Protein SlpA mit seinem Signalpeptid aus *Lactobacillus brevis* (VIDGRÉN et al., 1992) spielt in dieser Arbeit eine besondere Rolle und soll daher näher beschrieben werden. S-Layer Proteine bilden einheitliche kristalline Strukturen auf der Zelloberfläche von prokaryotischen Organismen. Ihre eigentliche Funktion ist noch nicht eindeutig geklärt. Doch es wird angenommen, daß sie die Zellen vor Umwelteinflüssen schützen, den Nährstoff- und Metabolitentransport kontrollieren, die Zellform erhalten und für die Adhesion und Erkennung der Zellen untereinander verantwortlich sein können. Bisher sind S-Layer von verschiedensten Spezies isoliert worden. Alle S-Layer Gene zeichnen sich durch starke Expressions- und Sekretionsignale aus, so daß sie von großer Interesse für eine biotechnologische Anwendung sind. Das S-Layer Protein SlpA aus *Lactobacillus brevis* besitzt zwei konstitutive Promotoren und ein klassisches Signalpeptid (30 AS). Diese Signalpeptid ($_{SP}$SlpA) wurde erfolgreich für die heterologe Sekretion der β-Lactamase aus *E. coli* in *Lactococcus* eingesetzt. Dabei wurden 80 mg/l β-Lactamase im Überstand nachgewiesen. Der höchste Ertrag, der bis jetzt bei der heterologen Sekretion in *Lactococcus* erreicht wurde (SAVIJOKI et al., 1997).

Tabelle 1.4: Überblick über den Export heterologer Proteine und die dabei verwendeten Signalpeptide in *L. lactis.*

EXPORTIERTES PROTEIN (URSPRUNG)	VERWENDETES SIGNALPEPTID	URSPRUNG DES SIGNALPEPTIDE	LITERATUR
Tetanus Toxin Fragment C (*Clostridium tetani*)	Serin-Protease (PrtP)	*Lactococcus lactis*	WELLS et al., 1993
Bovines Prochymosin (Rind)			SIMONS et al, 1992
α-Amylase (*Bacillus subtilis*)	Usp45 (Protein unbekannter Funktion)		ASSELDONK et al.,1993
Protein A-Anker (*Staphylococcus aureus*)			STEIDLER et al.,1998
Interleukin-2 (T-Zellen)			STEIDLER et al.,1995
Nuclease (*Staphyolcoccus aureus*)			POQUET et al., 1998
Neutral Protease (*Bacillus cereus*)	Neutral Protease	*Bacillus subtilis*	VAN DE GUCHTE et al., 1990
α-Amylase (*Staphylococcus aureus*)	α-Amylase	*Streptococcus bovis*	SATOH et AL., 1997
S-Layer Protein SlpH (*Lactobacillus helveticus*)	S-Layer Protein SlpH	*Lactobacillus helveticus*	CALLEGARI et al., 1998
Colicin V (*Escherichia coli*)	Divergicin A	*Carnobacterium divergens*	MCCORMICK et al, 1999
β-Lactamase (*Escherichia coli*)	S-Layer Protein SlpA	*Lactobacillus brevis*	SAVIJOKI et al., 1997

1.5 Schutzkulturen als Mittel der Bio-Konservierung

Seit Jahrtausenden ist der Mensch bestrebt die Qualität und Haltbarkeit seiner Lebensmittel kontinuierlich zu verbessern. Schon die alten Ägypter verwendeten natürliche Konservierungsmethoden wie Trocknung und Fermentierung. Bis heute werden diese Techniken erfolgreich in der Lebensmittelindustrie angewandt. Doch trotz modernster Herstellungs- und Kühltechniken sind Lebensmittelhygiene und durch Lebensmittel verursachte Erkrankungen ein

aktuelles Problem. Auf der anderen Seite wünscht sich der Verbraucher "natürliche" Lebensmittel, die technisch und chemisch kaum verändert wurden. Um jedoch den Ansprüchen des Konsumenten gerecht zu werden und gleichzeitig den Qualitätsstandard zu sichern, müssen zusätzliche Wege der Konservierung gesucht werden. Eine Möglichkeit ist dabei der Einsatz von sogenannten "Schutzkulturen" oder ihrer Metabolite. Diese Schutzkulturen sollen als Nahrungskonkurrenten und/oder durch die Produktion antimikrobieller Substanzen eine Reduzierung des Hygienerisikos in Lebensmittel bewirken (HOLZAPFEL et al., 1995; SCHILLINGER et al., 1996). Dabei dürfen sie jedoch die organoleptischen Eigenschaften des Produkts nicht verändern.

Reifungs- und Starterkulturen bieten die besten Voraussetzungen für den Einsatz als Schutzkulturen. Sie besitzen eine lange Tradition in der Fermentierung und haben sich aus toxikologischer Sicht als unbedenklich erwiesen und gelten als sogenannte GRAS-Organismen (generally recognized as safe). Starterkulturen wie Milchsäurebakterien produzieren zahlreiche antagonistische Metabolite wie zum Beispiel Bakterozine, organische Säuren und Wasserstoffperoxid und hemmen so auf natürliche Weise Verderbnis- und Krankheitserreger. Ebenso werden sie vom Konsumenten als gesundheitsfördernd akzeptiert. Die Expression von Lysozym und Lysostaphin in *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus* spec. war ein erster Schritt antimikrobielle Substanzen in Starterkulturen zu klonieren (CAVADINI et al., 1996; GAIER et al, 1992; VAN DE GUCHTE, 1992).

Ebenso besitzen Bakteriozine ein großes Potential für den Einsatz als "biologisches Konservierungsmittel". Bakteriozine sind kleine Proteine oder Peptidantibiotika, welche ribosomal synthetisiert und in vier unterschiedliche Klassen (KLAENHAMMER, 1993) eingeteilt werden. Ihr antimikrobiologische Aktivität bezieht sich meist auf nah verwandte Spezies. Jedoch gibt es eine Anzahl von Bakteriozinen wie Nisin (DELVES-BROUGHTON, 1990), Carnobacteriocin (WOROBO et al., 1994) und Pediocin PA-1 (MARUGG et al., 1992), welche sehr wirksam gegen *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* und *Clostridium botulinum* sind. Nisin gehört zu den bestcharakterisiertesten Bakteriozinen und wurde von der FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organization) als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen.

1.6 Genmanipulation in filamentösen Pilzen

1.6.1 Einführung

Filamentöse Pilze gehören zur Gruppe der niederen eukaryotischen Mikroorganismen. Seit Jahrzehnten werden sie für die Produktion fermentierter Lebensmittel sowie zur Herstellung primärer (organische Säuren, Vitamine (BODIE et al., 1994)) und sekundärer (Antibiotika, Alkaloide (LUENGO und PEÑALVA, 1994; MARTIN und GUTIERREZ, 1992)) Metabolite eingesetzt. Ebenso werden sie für die Produktion industrieller Enzyme wie zum Beispiel Amylasen, Proteasen, Pektinasen, Katalasen, Lipasen und Phosphatasen verwendet. Mit Hilfe klassischer Methoden wie Mutagenese und genetischer Rekombination wurden Stämme mit verbesserten Eigenschaften entwickelt. Ihre Expressionssysteme zeichnen sich durch eine enorme Produktivität aus. So können *Aspergillus* und *Trichoderma* im Fermenter bis zu 30 g/l homologes Protein produzieren. Seit den 80iger Jahren besteht die Möglichkeit filamentöse Pilze genetisch zu verändern. Seitdem wurden viele Transformations- (BALLANCE, 1991) und Expressionssysteme beschrieben. Als Modellorganismen dienten dabei *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa*. Dabei zeigen ihre Expressionssysteme gegenüber anderen Mikroorganismen enorme Vorteile.

1.) Sie sind in der Lage außergewöhnliche Mengen von Proteinen zu produzieren und zu sekretieren.
2.) Expressionssysteme von Bakterien sind im Gegensatz zu Pilzen nicht in der Lage eukaryotische Proteine, die erst durch post-translationale Modifikation ihre korrekte Faltung und Funktion erhalten, zu produzieren.
3.) Ebenso werden viele filamentöse Pilze und ihre Enzyme in der Lebensmittelindustrie eingesetzt und weisen einen sogenannten GRAS (generally recognized as safe, U.S. Food and Drug Administration) Status auf.
4.) Ein weiterer Vorteil der filamentösen Pilzgenetik ist die gegenseitige Erkennung transkriptionaler und translationaler Kontrollelemente auf Speziesebene (MCKENZIE et al., 1993)

1.6.2 Produktion heterologer Proteine in filamentösen Pilzen

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften sind filamentöse Pilze ideale Kandidaten für eine Produktion heterologer Proteine. Viele Arbeiten beschreiben die erfolgreiche Expression und Sekretion rekombinanter Proteine (FOWLER und BERKA, 1991, VAN DEN HONDEL et al., 1991). Jedoch wurden bei der Produktion heterologer Proteine nur Erträge von wenigen Milligramm pro Liter Kulturmedium erreicht (VAN GORCOM et al., 1994, GOUKA et al., 1996). Zur Erhöhung der Ausbeute heterologer Proteine wurden fünf Strategien entwickelt:

1.) Integration einer hohen Kopienzahl des heterologen Gens ins Chromosom (VERDOES et al., 1995).
2.) Einsatz starker Promotoren und effizienter Signalpeptide (VERDOES et al., 1995).
3.) Fusion des heterologen Gens an den C-Terminus eines Pilzgens (WARD et al., 1995; NYYSÖNEN und KERÄNEN, 1995).
4.) Konstruktion und Verwendung von Proteasemangel-Mutanten (BROEKHUIJSEN et al., 1993).
5.) Optimierung der Produktionsmedien (ARCHER et al., 1992) und Fermentationsbedingungen (GREASHAM, 1991; DUNN-COLEMAN, 1992).

Obwohl durch den Einsatz der aufgezählten Strategien die Proteinausbeute auf 5-250 mg/l , bei Rinderchymosin (DUNN-COLEMAN et al., 1991) und Laktoferrin (WARD et al., 1995) sogar auf 1-2 g/l gesteigert werden konnten, sind die Erträge im Verhältnis zur Produktion von homologen Pilzproteinen gering. GOUKA et al. (1997) erkannte, daß weitere Faktoren wie Stabilität der mRNA sowie inkorrektes Prozessieren des Transkriptes ebenso Einfluß auf die Gesamt-Proteinausbeute haben.

1.6.3 Transformation und Expression in filamentösen Pilzen

Bei der Transformation filamentöser Pilze muß zuerst der Abbau der Zellwand erfolgen, um eine Aufnahme der DNA zu ermöglichen. Mit Hilfe von Lithium-Acetat oder Enzym Kombinationen (Chintinase und Glucanase (YABUKI et al., 1984), Verdauungsenzyme aus Schnecken (FURUYA et al., 1983) sowie ein Enzymgemisch aus *Trichoderma harzianum* (HAMLYN et al., 1981)) wird die Zellwand degradiert und es kommt zur Bildung von zellwandfreien Protoplasten. Die Vektor-DNA wird bei filamentösen Pilzen stabil durch Rekombination ins Wirtsgenom integriert. Dabei können alle drei Integrationstypen vorkommen. **Typ I**: Homologe Einfachintegration des gesamten Vektors durch einfaches Crossing-over; **Typ II**: Heterologe Einfachintegration des

gesamten Vektors durch Crossing-over; **Typ III**: "Gene replacement" durch doppeltes Crossing-over zwischen Vektor- und Wirts-DNA. Welche Art der Rekombination stattfindet ist grundsätzlich abhängig vom Stamm und vom verwendeten Marker. Ist eine Sequenzhomologie zwischen Vektor-DNA und Pilz-Genom vorhanden, findet zu 30-50 % eine homologe Integration statt (YELTON et al., 1984). Befinden sich zwischen Vektor-DNA und Pilz-Genom keine identische Bereiche von mindestens 500 bp, findet eine heterologe Integration statt. Dabei integriert die Vektor-DNA an einer beliebigen, unbekannten Stelle des Genoms, an denen homologe Sequenzbereiche von 8-10 bp vorherrschen. Neben diesen drei Grundtypen der Integration kommt es bei der Transformation von filamentösen Pilzen häufig zu Mehrfachintegrationen der Vektor-DNA ins Genom (KELLY und HYNES, 1985; BUXTON et al., 1985). Dabei wird unterschieden ob eine Mehrfachintegration an verschiedenen Genorten oder am gleichen Genort stattgefunden hat. Letztere Möglichkeit führt zu einer Akkumulation gleicher Gene am gleichen Genort. Dieses Phänomen wird deshalb auch als "Tandemintegration" bezeichnet. Im allgemeinen führt eine Mehrfachintegration zu einer gesteigerten Proteinproduktion (VERDOES et al., 1993), obwohl keine strenge Korrelation zwischen beiden Faktoren vorhanden ist (VERDOES et al., 1995).

Die Identifizierung transformierter und nichttransformierter Kolonien erfolgt mit Hilfe sogenannter Selektionsmarker. Häufig werden dabei Gene verwendet, die eine Mutation im Aminosäurestoffwechsel oder in der Pyrimidinsynthese ausgleichen. Diese Methode setzt jedoch eine entsprechende auxotrophe Mutante des Wirtsorganismus voraus. Weitere Selektionssysteme verwenden Resistenzgene gegenüber Antibiotika wie z.B. Kanamycin (PENALVA et al. 1985) oder Hygromycin B (PUNT et al., 1987). Eine weitere Möglichkeit stellt die Nutzung neuer Nährstoffe durch bestimmte Gene dar. *Amd*S, isoliert aus *Aspergillus nidulans,* codiert für eine Acetamidase, welche das Wachstum auf Acetamid als einzige Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle ermöglicht (KELLY und HYNES, 1985).
Befindet sich der Selektionsmarker und das zu expremierende Gen auf zwei getrennten Plasmiden wird eine Ko-Transformation durchgeführt. Zwar findet die auftretende Selektion nur auf eines der beiden Plasmide statt, jedoch besteht eine 50%-80 % Wahrscheinlichkeit, daß beide Plasmide ins Genom integrieren (VAN DEN HONDEL et al., 1991)

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Lösungen und Puffer

NaCl+Tween: 0,9 % NaCl; 0,2 % Tween 80

0,9 g	NaCl
0,2 ml	Tween 80
100 ml	Mill-Q
	autoklavieren (121 °C, 20 min)

Tris HCl Stammlösung:1 M

121,1 g	Tris
800 ml	Milli-Q
	pH 7,5 mit HCL einstellen
	ad 1000 ml Milli-Q, autoklavieren (121 °C, 20 min)

Tris HCl Puffer: 10 mM

2 ml	Tris HCl Stammlösung
	ad 200 ml Milli-Q

SM-Puffer: 50mM, pH 7,5

50,0 ml	Tris HCl Stammlösung
5,8 g	NaCl
2,0 g	$MgSO_4 \times H_2O$
	ad 1000 ml Milli-Q, autoklavieren (121 °C, 20 min)

Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	**Stammlösung**	**gelöst in**
Erythromycin	20 mg/ml	40 % Ethanol
Ampicillin	100 mg/ml	Milli-Q

Lösungen sterilfiltrieren (0,22 µm, GelmannSciences)

Genomische DNA Isolierung

Lysis Puffer: 0,2 % SDS; 50 mM EDTA

4 ml	SDS (20%)
7,6 g	EDTA
	ad 400 ml Milli-Q

NaAcetat: 4 M

108,8 g	$CH_3COOH \times 3\ H_2O$
	ad 200 ml Milli-Q
	pH 5

NaAcetat: 3 M

40,82 g	$CH_3COOH \times 3\ H_2O$
	ad 100 ml Milli-Q
	pH 7

Agarose-Gelelektorphorese

TAE - Stammlösung: (50×)

242 g	Tris
100 ml	0,5 M EDTA
600 ml	Milli-Q
	pH 8 mit Eisessig einstellen
	ad 1000 ml Milli-Q, autoklavieren

TAE-Puffer: (1×)

20 ml	TAE-Stammlösung (50×)
	ad 1000 ml Milli-Q, autoklavieren

Gel-Ladepuffer: (GLP 6×)

0,02 g	Xylen-Cyano FF
0,05 g	Bromphenolblau
8,0 g	Saccharose
0,2 ml	SDS-Stammlösung (20%)
0,2 ml	0,5 M EDTA
	ad 20 ml Milli-Q,
	sterilfiltrieren

EtBr-Färbelösung

15 µl	EtBr-Stammlösung (1%)
	ad 300 ml Milli-Q

SDS Polyacrylamid-Gelelekrophorese

Acrylamid-Stammlösung: (30%)

gebrauchsfertige Lösung der Firma Biolab

Trennpuffer: 1,88 M

56,8 g	Tris
150,0 ml	Milli-Q
	pH 8,8 mit 25% HCl einstellen
	ad 250 ml Milli-Q, autoklavieren

Sammelpuffer: 1,25 M

37,8 g	Tris
150,0 ml	Milli-Q
	pH 6,8 mit 25% HCl einstellen
	ad 250 ml Milli-Q, autoklavieren

Tris/Glycin Elektrodenpuffer: (10×)

30,3 g	Tris
144,2 g	Glycin
10,0 g	SDS
	pH 8,3; ad 1000 ml Milli-Q

Probenpuffer: (2×)

2,5 ml	1 M Tris HCl Stammlösung (pH 6,8)
2,0 g	SDS
6,0 mg	EDTA
20,0 mg	Bromphenolblau
	ad 100 ml Milli-Q
1,0 ml	DTT (5 M)

Coomassie-Färbung

Färbe-Lösung:

2,0 g	Coomassie R-350 (Pharmacia LKB) in Ethanol/Milli-Q/ 20 % Essigsäure (1+1+2)

Entfärben:

250 ml	Methanol
100 ml	Milli-Q
650 ml	Essigsäure

Konservieren:

100 ml	Glycerin (87%)
	ad 900 ml Milli-Q

Transformation

Waschlösung für *E. coli*:

100 ml	Glycerin
	ad 1000 ml Milli-Q

Waschlösung für *Lactococcus*:

171,15 g	Saccharose
100 ml	Glycerin
	ad 1000 ml Milli-Q, autoklavieren

Protoplastierung von Penicillium camemberti

KCl Lösung: 0,6 M

4,47 g	KCl
	ad 100 ml Milli-Q; autoklavieren

STC Lösung: 1,2 M Sorbit; 10 mM Tris; 10 mM CaCl

43,8 g	D (-) Sorbit
0,24 g	Tris
0,29 g	$CaCl_2 \times 2H_20$
	ad 200 ml Milli-Q
	pH 7,5

PEG Lösung: 10 mM

60 g	PEG 8000
0,147 g	$CaCl_2$
1 ml	Tris HCl Stammlösung
	ad 100 ml Milli-Q

Southern-Blotting

Depurinierung: 0,2 N HCl

15 ml	HCl (25%)
485 ml	Milli-Q

Denaturierung: 0,5 M NaOH, 1,5 NaCl

20 g	NaOH
87 g	NaCl
	ad 1000 ml Milli-Q

Neutralisierung: 1 M Tris; 2 M NaCl

121,1 g	Tris
117,0 g	NaCl
	pH 7 mit HCl (25%) einstellen
	ad 1000 ml Milli-Q

Transfer: 20 × SSC

175,3 g	NaCl
88,2 g	Na_3Citrat × 2 H_2O
	pH 7 mit HCl (25%) einstellen
	ad 1000 ml Milli-Q

DNA/DNA Hybridisierungs-Lösungen

Hybridisierungspuffer: 5× SSC; 2 % Blockingreagenz; 0,1 % Laurylsarkosin; 0,02 % SDS

124 ml	SSC (20×)
100 ml	Blockingreagenz-Stammlösung (10%)
5 ml	Laurylsarkosin (10%)
0,5 ml	SDS (20%)
	ad 500 ml Milli-Q

Blockingreagenz Stammlösung:

50 mg	Blocking Pulver (Boehringer Mannheim)
	ad 500 ml Puffer 1

Puffer 1: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl

100 mM	Maleinsäure
150 mM	NaCl
	pH 7,5 mit HCl (25%) einstellen

Puffer 2: 1% Blockingreagenz

100 ml	Blockingreagenz-Stammlösung (10%)
900 ml	Puffer 1

Puffer 3: 0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; 0,02 M $MgCl_2$

0,05 g	Tris
2,93 g	NaCl
2,00 g	$MgCl_2$
	pH 9,5 mit HCl (25%) einstellen
	ad 500 ml Milli-Q

Waschpuffer: 0,3% Tween 20

3 ml	Tween 20
	ad 1000 ml Puffer 1

DEA Buffer: 0,1 M Diethanolamin; 2 mM $MgCl_2$

5,2 g	Diethanolamin
0,2 g	$MgCl_2$
	pH 10 mit HCl (25%) einstellen
	ad 500 ml Milli-Q

Western-Blotting

TBS-Puffer: 50 mM Tris; 150 mM NaCl

6,05 g	Tris
8,76 g	NaCl
	pH 7,5 mit HCl einstellen
	ad 1000 ml Milli-Q

TBST-Puffer:

1 ml	Tween 20
	ad 1000 ml TBS Puffer

Blocking-Lösung 1%:

10 ml	Blockingreagenz-Stammlösung 10% (Boehringer Ingelheim)
90 ml	TBS Puffer

Blocking-Lösung 0,5 %:

5 ml	Blockingreagenz-Stammlösung 10% (Boehringer Ingelheim)
95 ml	TBS Puffer

2.2 Verwendete Medien

Luria Bertani (LB):

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
	ad 1000 ml Milli-Q; autoklavieren (121°C, 20 min)

Tryptose Bouillon (TB):

20 g	Tryptose
5 g	NaCl
5 mg	Thiamindichlorid
	ad 1000 ml Milli-Q; autoklavieren (121°C, 20 min)

Brain-Heart-Infusion (BHI):

27,5 g	Komplexmedium aus Hirn- und Herzextrakten (Oxoid)
	ad 1000 ml Milli-Q; autoklavieren (121°C, 20 min)

GM17:

M17-Medium (Merck) plus 0,5 % Glukose

LM17:

M17-Medium (Merck) plus 0,5 % Lactose

Malz-Glukose Bouillon:

17 g	Malzextrakt
5 g	Glukose
	ad 1000 ml Milli-Q; autoklavieren (121°C, 15 min)

SOC-Medium:

2 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	$MgCl_2$
10 mM	$MgS0_4$
20 mM	Glukose
	sterilfiltrieren (0,22 µm)

Minimalmedium:

218,60 g	Sorbitol
5,00 g	Glukose
3,75 g	KH_2PO_4
2,10 g	CsCl
0,75 g	KOH
0,56 g	Acetamid
0,5 g	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
0,1 g	NaCl
0,1 g	$CaCl_2$
	ad 1000 ml Milli-Q; autoklavieren (121°C, 20 min)

Regenerationsagar:

200 g	Saccharose
25 g	Gelatine
10 g	Trypton
10 g	Glukose
5 g	Hefeextrakt
2,5 ml	$MgCl_2$ (1 M)
2,5 ml	$CaCl_2$ (1 M)
15 g	Agar
	ad 1000 ml Milli-Q; autoklavieren (121°C, 20 min)

Resuspensionsmedium (SGM17MC):

2 ml	M17 Bouillon (2,5×)
2 ml	Saccharose (1 M)
100 µl	$MgCl_2$ (1 M)
75 µl	Glukose (40 %)
10 µl	$CaCl_2$ (1 M)
	ad 5 ml Milli-Q

2.3 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Die Anzucht aller *Escherichia coli* Stämme erfolgte in LB bzw. BHI- Medium bei 37 °C unter Schütteln (200 Upm). Alle *Lactococcus* Stämme wurden entweder in GM17 bzw. BHI-Medium bei 30 °C für 18 h inkubiert. Zur Selektion rekombinanter Stämme wurden den einzelnen Medien folgende Antibiotika-Konzentrationen zugesetzt: *E. coli*: 100 µg/ml Ampicillin bzw. 150 µg/ml Erythromycin; *Lactococcus lactis*: 5 µg/ml Erythromycin. Die Lagerung der Stämme erfolgte bei -70 °C nach Zugabe von 10 % (w/v) Glycerin. *Penicillium camemberti* wurde bei 25 °C unter Schütteln (160 Upm) in Malz-Glukose-Medium bebrütet. Die Stämme wurden während der ganzen Versuchsperiode auf Malz-Glukose-Schrägagarröhrchen bei 4 °C aufbewahrt und alle 6 Monate frisch überimpft.

Tabelle 2.1: Verwendete Mikroorganismen

SPEZIES	STAMM	GENETISCHE MERKMALE	HERKUNFT
E. coli K12	XL1-Blue MRF'	Klonierungsstamm: Δ(*mcr*A)183, Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173, *end*A1, *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, *lac*, [F' *pro*AB, *lac*I^{q}ZΔM15, Tn10 (*tet*^{r})]	Stratagene
	DH5αMCR™	Klonierungsstamm. F^{-}*mcr*A, Δ*mrr*-*hsd*RMS-*mcr*BC, ϕ80*lac*ZΔM15, Δ(*lac*ZYA-a*rg*F)U169, *deo*R, *rec*A1, *end*A1, *sup*E44, λ^{-}, *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1	GIBCO BRL
	Top10	Klonierungsstamm: F' *mcr*A Δ(*mrr*-*hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara*-*leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 nupG	Invitrogen
Lactococcus lactis	MG 1363	Plasmidfreier Stamm, abgeleitet von SH4109, Lac^{-}, Prt^{-}	GASSON, 1983
	Bu2-129	Lac^{+}, Cit^{-}	NEVE et al, 1987
	Wg2	Industrie-Stamm	OTTO et al, 1982
Lactobacillus brevis	DSM 20556	ATCC 8287	DSM, Berlin
Penicillium camemberti	BFE 229	Reifungskultur	BFE, Karlsruhe
Listeria monocytogenes	WSLC 1001	Serovar 1/2c, ATCC 19112, Wildtyp	Weihenstephan *Listeria* Sammlung

Tabelle 2.2: Plasmide

PLASMID	MERKMALE	HERKUNFT
pBluescript II (SK-)	Klonierungs- und Expressionsvektor; Amp^R, *lac*Z	Stratagene
pTRKH2	Shuttle-Klonierungsvektor; Er^R, *lac*Z, G(-)ori.P15A, G(+)ori-pAMβ1, hohe Kopienzahl in *Lactococcus* spp.	O'SULLIVAN und KLAENHAMMER, 1993
pBPL118	*ply*118 kloniert in *Eco*RI/*Sal*I Schnittstelle von pBluescript II (SK-)	diese Arbeit
pBPL118-P21	Promotor P21 kloniert in *Xba*I/*Bam*HI Schnittstelle von pBPL118	diese Arbeit
pBPL118-P32	Promotor P32 kloniert in *Xba*I/*Bam*HI Schnittstelle von pBPL118	diese Arbeit
pBPL118-P59	Promotor P59 kloniert in *Xba*I/*Bam*HI Schnittstelle von pBPL118	diese Arbeit
pLC-PL118-P21	Expressionskassette P21-*ply*118 isoliert aus pBPL118-P21 kloniert in *Xba*I/*Sal*I Schnittstelle von pTRKH2	diese Arbeit
pLC-PL118-P32	Expressionskassette P32-*ply*118 isoliert aus pBPL118-P32 kloniert in *Xba*I/*Sal*I Schnittstelle von pTRKH2	diese Arbeit
pLC-PL118-P59	Expressionskassette P59-*ply*118 isoliert aus pBPL118-P59 kloniert in *Xba*I/*Sal*I Schnittstelle von pTRKH2	diese Arbeit
pLC-PL511	*ply*511 kloniert in *Pst*I/*Sal*I Schnittstelle von pLC-PL118-P32 ohne *ply*118	diese Arbeit
pSL-Δ_{SP}Nuc	*slp*A-Δ_{SP}*nuc* kloniert in *Pst*I/*Sal*I Schnittstelle von pLC-PL118-P32 ohne *ply*118	diese Arbeit
pSL-PL511	*slp*A-*ply*511 kloniert in *Pst*I/*Sal*I Schnittstelle von pLC-PL118-P32 ohne *ply*118	diese Arbeit
pSL-PL511ΔC	pSL-PL511 mit einer C-terminalen Deletion in *ply*511	diese Arbeit
pELN5	*E. coli*/*Penicillium* Shuttlevektor, Amp^R	GEISEN, 1996
p3SR2	Selektionsplasmid für *Penicillium* spp. mit Acetamidase-Markergen *amd*S aus *Aspergillus*	HYNES et al, 1983
pELN118	*ply*118 kloniert in *Bam*HI/*Eco*RI Schnittstelle von pELN5, Amp^R	diese Arbeit

2.4 DNA - Präparationen

2.4.1 Isolierung genomischer Pilz-DNA

Penicillium camemberti wurde in einer Malz-Glukose Bouillon (250 ml) 4-5 Tage bei 25 °C unter Schütteln bebrütet. Das Myzel wurde über einen Faltenfilter (Schleicher und Schüll, ∅185 mm) geerntet und in einen Mörser überführt. Die Zellen wurden mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem Pistill zu einem feinem Pulver zerrieben. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation des Zellaufschlusses bei 65 °C in 7 ml Lysepuffer. Nach einem Zentrifugationsschritt (5000 x g; 15 min; 4 °C) wurde der Überstand mit 0,88 ml 4 M NaAcetat (pH 5) versetzt. Die Suspension wurde 1 h auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (5000 x g; 20 min; 4 °C). Der Überstand wurde für eine Ethanolfällung (0,1 Vol. 3 M NaAcetat (pH 7) plus 2,5 Vol. 100 % Ethanol (-20 °C), 2 h bei –20 °C) verwendet. Die durch Zentrifugation gewonnene DNA wurde in 2 ml Tris HCl Puffer (10 mM, pH 7,5) resuspendiert. Für den Erhalt reinster DNA erfolgte anschließend ein RNA-Verdau (10 µl Ribonuklease A, 1 h, 20 °C). Proteinreste und RNase wurden durch mehrmalige Extraktion der wässrigen Phase mit gleichem Volumen Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol und abschließender Chlorophormextraktion entfernt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (5000 x g; 10 min; 20 °C). Mit der wässrigen Phase wurde eine erneute Ethanolfällung (siehe oben) durchgeführt. Nach Waschung des DNA-Pellets mit 70 % Ethanol (20 °C) und erneuter Zentrifugation (5000 x g; 15 min; 4 °C) wurde die DNA bei 20 °C getrocknet und in 400 µl Tris HCl Puffer (10 mM, pH 7,5) resuspendiert. Konzentration und Reinheit der DNA wurden über Photometrie und AGE (0,8 %) bestimmt.

2.4.2 Isolierung der genomischen DNA aus *Lactococcus lactis*

Für die Präparation genomischer DNA wurden 5 ml GM17-Bouillon mit dem entsprechendem Laktokokken Stamm angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die weiteren Isolierungsschritte erfolgten aus 2 ml Bakterienkultur mit Hilfe von CTAB nach WILSON (1997). Abweichend vom Protokoll wurde zum Resuspensionspuffer 30 mg/ml Lysozym (aus Hühnereiweiß, Fluka BioChemika) hinzugegeben und die Zellsuspension 30 min bei 37 °C inkubiert. Konzentration und Reinheit der DNA wurden über Photometrie und AGE (0,8 %) bestimmt.

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung reiner Plasmid DNA wurde je nach Mengenbedarf die QIAprep-Spin-Säulen oder QIAgen Tip-100 Säulen der Firma QIAGEN verwendet. Da die alkalische Lyse bei Gram-positiven Organismen zu keinem ausreichenden Zellaufschluß führt, wurde abweichend zum Protokoll des Herstellers zur Plasmidisolierung aus *Lactococcus lactis* 30 mg/ml Lysozym (aus Hühnereiweiß, Fluka BioChemika) zum Resuspensionspuffer (P1) hinzugeben und die resuspendierten Zellen 30 min bei 37 °C inkubiert. Die weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Überprüfung der Plasmid-Isolierung wurde eine AGE durchgeführt.

2.4.4 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden je nach Größe der Fragmente verschiedene Methoden der Isolierung angewandt. Nach elektrophoretischer Auftrennung und EtBr-Färbung wurden die gewünschten Banden unter langwelligem UV-Licht (366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten. Fragmente, welche größer als 150 bp waren, wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers isoliert. Kleinere Fragmente (< 150 bp) wurden durch Agarase-Verdau aus dem Gel präpariert. Dabei wurde das Gewicht der ausgeschnittenen Gelblöcke bestimmt und entsprechend 0,04 Volumen Agarase-Puffer (25×) (Boehringer Mannhein) hinzugefügt. Nach 15 min Inkubation bei 65 °C und weiteren 5 min bei 45 °C wurde pro 100 mg Agarose 1 U Agarase (Boehringer Mannheim) zugegeben. Entsprach die Gelkonzentration mehr als 1% wurde entsprechend mehr Agarase eingesetzt. Der Ansatz wurde weitere 2-3 h bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurde das Volumen der Präparation mit 200 µl TrisHCl Puffer (10 mM, pH 7,5) und zusätzlichen 300 µl Isopropanol (20 %) erhöht. Der Verdau wurde in Mikrokonzentrationseinheiten (Fugisep®, Ausschlußgrenze 100 kDa, Sevatec) überführt und zentrifugiert (500 x g; 30 min; 20 °C). Nach einem Waschschritt mit Tris HCl Puffer (pH 7,5) und einem weiteren Zentrifugationsschritt (500 x g; 30 min; 20 °C) enthielt die Filtereinheit ca. 30 µl Ausbeute. Zur Überprüfung der DNA-Isolierung wurde eine AGE durchgeführt.

2.4.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren durch Photometrie

Die Nukleinsäure Konzentration einer wässrigen Lösung wurde mittels eines UV-Spektrometers (Ultraspec III, Pharmacia, Quarzküvetten) bestimmt. Die Extinktion (E) einer Lössung von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht dabei 50 µg/ml an dsDNA bzw. 40 µg/ml an ssRNA. Ebenfalls wurde der Extinktionswert E_{280} und der Quotient (Q) aus E_{260}/E_{280} ermittelt. Der Quotient gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung. Bei reiner DNA sollte der Wert Q über 1,8 und bei RNA- Bestimmungen über 2,0 betragen. Werte die unter 1,6 liegen, deuten auf eine Proteinkontamination hin. Alle Proben wurden vor der Messung 1:30 mit TrisHCl-Puffer (10 mM, pH 7,5) verdünnt.

2.5 Amplifizierung der Expressions- und Sekretionskassetten

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird für die spezifische Amplifizierung von Genen angewandt. Mit Hilfe der Primer können an die 5' bzw. 3' Enden der Gene Sequenzen mit bestimmten Eigenschaften (z.B. ribosomale Bindestelle Sequenzen oder Restriktionsschnitt-stellen) angefügt werden. Für alle PCR-Ansätze wurde der "Taq PCR Core Kit" der Firma QIAGEN verwendet. Alle Primer und Templates sind in der Tabellen 2.3 aufgeführt. Zur Kontrolle des Reinheitsgrades und der Größe wurde eine AGE durchgeführt. Die Amplifizierung erfolgte im Thermocycler Progene, Thermo-Dux, Wertheim/Main

PCR Ansatz:	Reagentien	Endkonzentration
	10× PCR Puffer	1×
	dNTP Mischung	200 µM
	Primer	1 µM
	Primer (Gegenstrang)	1 µM
	Template	10 ng
	Milli-Q	variabel
	Taq DNA Polymerase	5 U

Tabelle 2.3: Sequenzen und Templates der verwendeten Amplifikationsprimer. **A**: Primer der Endolysine-Gene *ply*511 und *ply*118 für die Expression in *L. lactis*. **B**: Primer der Lactococcen Promotoren. **C**: Primer für die Sekretionsexperimente in *L. lactis*. **D**: Primer für die Expression von *ply*118 in *P. camemberti*. Restriktionsschnittstellen: **fett**, RBS: *kursiv*, Startcodons unterstrichen.

GEN	PRIMER	SEQUENZ 5'→3'	TEMPLATE
A			
*ply*118	P1	ATATG**AATTC**T*GGAGG*ATTTAAAATGACAAGTTATTATTATAGTA	DNA des Bakteriophagen
	P2	AAGT**GTCGAC**CTAAATCTTTTTAACA	A118
*ply*511	P3	ATAT**CTGCAG**T*GGAGG*ATTTAAAATGGTAAAATATACCGTAGAGAAC	DNA des Bakteriophagen
	P4	AAGT**GTCGAC**TTATTTTTTGATAACTG	A511
B			
P21	P5	ATAT**TCTAGA**CAAATCCCACACTCTATCGTCAAACAA	
	P6	AAGTGG**ATCC**CTTAATCCTGCGCGTCTGCCAATTCCG	
P32	P7	ATAT**TCTAGA**ATAGTTTAGCTATTAATCTTTTTTTA	chromosomale DNA aus *Lactococcus lactis* Wg2
	P8	AAGTGG**ATCC**CCCGAATATT**TTTTTTACCTACCTAGTAT**	
P59	P9	ATAT**TCTAGA**AGAAAATACACTAACCAAAGAAGCGCG	
	P10	AAGTGG**ATCC**CTTTATTCAGTTTTCAATGGTCTAGCT	
C			
$_{SP}$*slp*A	P11	ATAT**CTGCAG**T*GGAGG*ATTTAAAATGCAATCAAGTTTAAAGAAATCTCTTTA	chromosomale DNA aus *Lb brevis* DSM 20556
	P12	AAGT**GACGTC**TTAGCTGAAGCAGTCGTTGAAAC	
*ply*118	P13	ATAT**GACGTC**TTATTATTATAGTAGAAGTTTAGCGAATGTA	DNA des Bakteriophagen
	P14	AAGT**GTCGAC**CTAAATCTTTTTAACA	A118
*ply*511	P15	ATAT**GACGTC**TGTAAAATATACCGTAGAGAACAAAATTATTGCAGGA	DNA des Bakteriophagen
	P16	AAGT**GTCGAC**TTATTTTTTGATAACTG	A511
$_{\Delta SP}$*nuc*A	P17	ATAT**GACGTC**TGATCCAACAGTATATAGTGCAACTTCAACTAAA	Plasmid pFUN
	P18	AAGT**GTCGAC**TTATTGACCTGAATCAGCGTTGTCTTC	
D			
*ply*118	P19	TCTA**GGATCC**C*ATG*ACAAGTTATTATTATAGTGGA	DNA des Bakteriophagen
	P20	TAGA**CGAATT**CTTAAATCTTTTTAACAAACTTCGT	A118

2.5.2 Klonierung und Expression der Gene *ply*118 und *ply*511 in *L.lactis*

Für die PCR-Amplifizierung des Gens *ply*118 diente die gereinigte DNA des *L. monocytogenes* Bakteriophagen A118 und die Primer P1 und P2 (siehe Tabelle 2.3). Primer P1 wurde mit einer Laktokokken spezifischen Ribosomenbindestelle (5'-*GGAGGA*-3') konstruiert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Sal*I inkubiert und in die *Eco*RI/*Sal*I Schnittstelle des Klonierungsvekors pBluescript II SK(-) eingefügt. Der neu konstruierte Vektor pBPL118 wurde in *E. coli* XL1-Blue MRF' als Zwischenwirt kloniert. In den weiteren Schritten wurden die drei Laktokokken Promotoren P21, P32 und P54 durch PCR amplifiziert. Als Template diente die chromosomale DNA von *Lactococcus lactis* WG2. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Die amplifizierten Promotoren wurden mit *Xba*I und *Bam*HI geschnitten und jeweils in die entsprechenden Schnittstellen von pBPL118 kloniert. Die dabei entstandenen Konstruktionen wurden als pBPL118-P21, pBPL118-P32 und pBPL118-P54 bezeichnet. Für die Endolysin Expression in *Lactococcus lactis* wurden die drei verschiedenen Promotoren-*ply*118-Fragmente aus den oben genannten Vektoren durch einen *Xba*I/*Sal*I Restriktionsverdau isoliert und in den *E. coli-Lactococcus* Shuttle Vektor pTRKH2, ebenfalls *Xba*I/*Sal*I verdaut, ligiert. Die Expressionsvektoren pLC-PL118-P21, pLC-PL118-P32 und pLC-PL118-P54 wurden zuerst in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert, vermehrt und analysiert. Nach der Isolierung der Vektoren aus *E. coli* erfolgte die Transformation in *Lactococcus lactis* MG1363. Der zweite Expressionsvektor pLC-PL511 wurde folgendermaßen konstruiert. Das Primerpaar P3/P4 sowie die DNA des *Listeria monocytogenes* Bakteriophagen A511 wurden für die Amplifizierung des Endolysingens *ply*511 verwendet. Nach einem Restriktionsverdau mit *Pst*I/*Sal*I des Vektor pLC-PL118-P32 und des PCR-Produkt *ply*511 wurde *ply*118 aus pLC-PL118-P32 durch *ply*511 ersetzt. Auch hier erfolgte zuerst eine Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF' und anschließend in *Lactococcus lactis* MG1363.

2.5.3 Sekretion der Staphylokokken Nuklease in *L. lactis*

Die Konstruktion eines Sekretion-Test-Vektors sollte die Eignung des Signalpeptids $_{SP}$SlpA für *Lactococcus lactis* überprüfen. Dabei wurde das *nuc* Gen aus *Staphylococcus aureus* durch PCR amplifiziert. Als Template diente der Vektor pFUN. Die Primer P17 und P18 (Tabelle 2.3) wurden so gewählt, daß *nuc* ohne Signalsequenz konstruiert wurde. Die Amplifizierung von $_{SP}$*slp*A erfolgte mit Hilfe der Primer P11 und P12 (Tabelle 2.3) sowie der chromosomalen DNA von *Lactobacillus brevis.* Die beiden PCR-Produkte wurden zuerst mit *Aat*II inkubiert und

anschließend mit T4 DNA Ligase ligiert. Das daraus resultierende Fragment $_{SP}$*slp*A-Δ_{SP}*nuc* diente als Template einer weiteren PCR mit den Primerpaaren P11/P18 (Tabelle 2.3). Die reamplifizierte Sekretionskassette wurde, wie auch der Expressionsvektor pLC-PL118-P32, mit *Pst*I bzw. *Sal*I inkubiert. Im letzten Konstruktionsschritt wurde *ply*118 aus pLC-PL118-P32 durch $_{SP}$*slp*A-Δ_{SP}*nuc* ersetzt. Der daraus entstandene Sekretion-Test-Vektor pSL-Δ_{SP}Nuc wurde zuerst in *E. coli* DH5α vermehrt und anschließend in *Lactococcus lactis* MG1363 transformiert.

2.5.4 Konstruktion der Endolysin Sekretionsvektoren

Für die Konstruktion der Endolysin-Sekretionsvektoren pSL-PL118 und pSL-PL511 wurde der Expressionsvektor pLC-PL118-P32 als Grundgerüst herangezogen. Zuerst wurden die Endolysin-Gene *ply*118 und *ply*511 durch PCR amplifiziert. Die 5'-Primer der Endolysine (P13 bzw. P15) wurden mit einer *Aat*II-Schnittstelle ausgestattet, damit nach der Fusion mit der Signalsequenz $_{SP}$*slp*A der Leserahmen erhalten bleibt. Die Amplifikation des $_{SP}$*slp*A Gens erfolgte wie in 2.5.3 beschrieben. Die nach der Ligation entstandenen Sekretionsfragmente $_{SP}$*slp*A-*ply*118 und $_{SP}$*slp*A-*ply*511 dienten als Template für eine weitere PCR. Die dabei verwendeten Primer P11 und P14 bzw. P16 sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Für den letzten Klonierungsschritt wurden die Fragmente sowie der Expressionsvektor pLC-PL118-P32 mit den Restriktionsenzymen *Pst*I/*Sal*I geschnitten. Die Sekretionskassetten wurden anschließend mit Hilfe der T4-DNA Ligase in den Expressionsvektor ligiert. Die neu geschaffenen Sekretionsvektoren pSL-PL118 und pSL-PL511 wurden durch Elektorporation in *Lactococcus lactis* MG1363 und *Lactococcus lactis* Bu2-129 transformiert.

2.5.5 Konstruktion von pELN118

Für die Expression des *ply*118-Gens in *Penicillium cambemberti* wurde der *E. coli-Penicillium*-Shuttlevektor pELN5 (Tabelle 2.2) ausgewählt. Die Amplifikation des *ply*118 Gens erfolgte mit den Primern P19 und P20 (Tabelle 2.3). Der Primer P19 wurde dabei so konstruiert, daß der Leserahmen des Endolysin-Gens nicht unterbrochen wird. Der Vektor pELN5 enthält das *E. coli* Dihydofolatreduktase-Gen, welches durch den Restriktionsverdau mit den Enzymen *BamH*I bzw. *EcoR*I und einer anschließenden präparativen Agarosegelelektrophorese vom Vektor getrennt wurde. Der lineare Vektor wurde aus dem Agarosegel isoliert und mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Das PCR-Produkt *ply*118 wurde ebenfalls mit

*BamH*I bzw. *Eco*RI inkubiert. Die anschließende Ligation mit dem linearen Vektor pELN5 und *ply*118 führte zu dem Expressionsvektor pELN118. Die Vorkonstruktion und Vermehrung des Vektors erfolgte in *E. coli* XL1Blue MRF'. Anschließend wurde pELN118 durch Protoplastierung in das Genom von *P. camemberti* integriert.

2.6 Gelelektrophorese

2.6.1 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA Fragementen erfolgte je nach Größe des Fragments in 0,8-2,5 % Agarosegelen in 1 × TAE-Puffer. Für die präparative Trennung und anschließende Isolierung der Fragmente nach Agaraseverdau wurde niedrigschmelzende Agarose (Seaplaque GTG Agarose, Smp. 65°C, FMC Bioproduct) verwendet. Die Gelherstellung und Probenaufbereitung erfolgte nach SAMBROOK et al. (1989). Der Gellauf fand je nach Anzahl der Proben und Größe des Gels in horizontalen Elektrophoresekammern (GNA-100 bzw. GNA-200, Pharmacia) bei einer Spannung von 60 - 110 V (MultidriveXL; Pharmacia) statt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer EtBr-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt. Anschließend wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator (302 nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroid 667; ISO 3000 bzw. Image Master^{R} VDS (Pharmacia Biotech) fotografiert.

2.6.2 SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

2.6.2.1 Mighty Small II System

Zur Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamid-Gele (SDS-PAGE) verwendet. Zur Optimierung der Probenaufbereitung und Elektrophoresebedingungen wurde das vertikale Midget-Twincast-Elektrophoresesystem (LKB) verwendet. Zwei diskontinuierliche Polyacrylamidgele (Dicke: 0,75 mm) wurden wie folgt hergestellt (mod. nach LAEMMLI, 1970):

	Trenngel (15%)	Sammelgel (4,8%)
♦ Acrylamid-Stammlösung (30 %)	4,5 ml	0,40 ml
♦ Trennpuffer	1,8 ml	—
♦ Sammelpuffer	—	0,25 ml
♦ Milli-Q	2,6 ml	1,80 ml
♦ SDS-Lösung (10 %)	90 µl	25 µl
♦ TEMED	4,5 µl	2,5 µl
♦ APS (10 %)	30 µl	8,5 µl

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 100°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte 15 min bei 15 V und wurde danach auf 30 V (45 min) erhöht. Während des ganzen Gellaufs wurden die Gele auf 12 °C gekühlt.

2.6.2.2 Proteintrennung mit Excel-Gelen (nach SCHICKLE et al., 1989)

Für die Auftrennung einer größeren Anzahl von Proben und für eine bessere Trennleistung wurden die Proteine in kommerziell verfügbaren, diskontinuierlichen SDS-Gradientengelen (ExcelGel SDS, Pharmacia: Geldicke 0,5 mm, Gradient 8-18 %) nach Angaben des Herstellers horizontal aufgetrennt. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer (ohne Glycerin) versetzt und 5 min auf 100 °C erhitzt. Als Elektrophoreseeinheit wurde die 2303 Multidrive-XL (Elektrofoccusing Unit; LKB) verwendet. Die Proben wanderten zuerst bei 200 V ins Gel ein und wurden dann bei 600 V aufgetrennt. Während des ganzen Gellaufs wurde das Gel auf 12 °C gekühlt.

2.6.2.3 Fixierung und Detektion der Proteinbanden

Nach dem Lauf wurden die Gele mit Coomassie R-350 gefärbt (außer jene Gele, welche für das sogenannte "Western Blotting" verwendet wurden). Dabei wurden die Gele 15 min in der Färberlösung (60 °C) , 2 × 20 min im Entfärber und weitere 45 min in der Konservierungslösung geschwenkt und anschließend getrocknet.

2.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden zur Linearisierung von Plasmiden, Charakterisierung von DNA-Fragmenten und für Ligationsvorbereitungen von PCR-Fragmenten verwendet. Der Einsatz der Restriktionsenzyme (Boehringer Mannheim bzw. MBI) erfolgte weitgehend nach Angaben der Hersteller. Bei gleichzeitiger Inkubation mehrerer Enzyme wurde derjenige Puffer ausgewählt, bei dem alle Enzyme die höchst mögliche Aktivität aufweisen. Je nach Verwendungszweck wurden die Restriktionsansätze in einem Gesamtvolumen von 10 µl - 50 µl durchgeführt und für 1 - 3 h bei 37 °C inkubiert. Für die Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden linearisierte Plasmide und Enzym-behandelte PCR-Fragmente, welche für Ligationsansätze benötigt wurden, mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit von QIAGEN nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.7.2 Ligation

Die Ligation von linearen Plasmiden mit entsprechenden Inserts wurde mit der T4-Ligase und dem entsprechenden Ligations-Puffer der Firma Boehringer, Mannheim in einem Volumen von 10 µl - 15 µl durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden entweder bei 12 °C über Nacht oder bei 20 °C für 3 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Entsalzung der Ligation mit Filtermembranen (VS-Filter; Ø 13 mm, 0,025 µm, Millipore). Dabei wurden die Ansätze auf die in Milli-Q schwimmenden Filtermembranen aufgetragen und nach 30 min wieder abgenommen.

2.8 Transformation

2.8.1 Elektrotransformation von *Escherichia coli* (DOWER et al., 1988)

2.8.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Elektroporation wurden 1000 ml LB mit 10 ml einer Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Das Wachstum der Kultur wurde durch regelmäßige Messung der optischen Dichte (OD_{600}) überwacht. Bei einer OD von 0,6 -1,0 wurden die Zellen sofort gekühlt und abzentrifugiert (Beckmann J2-HS, 5500 x g, 4 °C, 10 min). Nach der Zentrifugation wurden die Zellen zuerst mit eisgekühltem 5 % Glycerin, anschließend mit Milli-Q und im letzten Schritt mit 10 % Glycerin gewaschen. Dabei erfolgte eine 1000fache Aufkonzentrierung der Zellen, welche zu je 40 µl aliquotiert und bei – 70 °C aufbewahrt wurden.

2.8.1.2 Elektroporationsbedingungen bei *E. coli*

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde der eisgekühlte Ligationsansatz bzw. die Plasmid-DNA hinzupipettiert und in eisgekühlten 0,2 cm Elektroporationsküvetten überführt. Dem Gemisch wurde ein elektrischer Impuls (12,5 kV/cm, 25 µF, 200 Ω) mit einem Gene-Pulser (BioRad Gene Pulser™) appliziert. Sofort nach dem Impuls wurde die Suspension mit 960 µl (20 °C) SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt (200 U/min). Anschließend wurden 10 × 100 µl des Ansatzes auf LB bzw. BHI mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert und 16 - 24 h bei 37 °C inkubiert.

2.8.2 Elektrotransformation von *Lactococcus lactis* (mod. nach WELLS et al., 1993)

2.8.2.1 Herstellung kompetenter *Lactococcus lactis* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *Lactococcus* Zellen wurden 250 ml GM17 plus Glycin (je nach Stamm 0,5-2,5 %) mit einer 5 ml Übernachtkultur angeimpft und bei 30 °C bebrütet. Das Wachstum der Kultur wurde durch regelmäßige Messung der optischen Dichte (OD_{600}) überwacht. Bei einer OD von 0,5 -0,7 wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt und abzentrifugiert (3000 x g, 4 °C, 15 min). Die Zellen wurden 2 × mit eisgekühlter Waschlösung

vorsichtig gewaschen, erneut zentrifugiert (3000 x g, 4 °C, 15 min) und schließlich in 2,5 ml Waschlösung resuspendiert. Die Zellen wurden zu je 45 µl aliquotiert und bei – 70 °C aufbewahrt.

2.8.2.2 Elektroporationsbedingungen bei *Lactococcus lactis*

Die Elektroporation erfolgte wie in 2.8.1.2 beschrieben. Nach dem elektrischen Impuls wurde jedoch das Zell/DNA Gemisch in 960 µl eisgekühltem SGM17MC - Medium aufgenommen, 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 30 °C inkubiert. Nach 2 h Inkubation wurden die transformierten Zellen (100 µl - 200µl) auf GM17-Agar bzw. Regenerationsagar mit 5 µg ml^{-1} Erythromycin ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Nach 2 - 3 Tagen waren die ersten Transformanten erkennbar.

2.8.3 Protoplastierung und Transformation in *P. camemberti*

250 ml einer Malz-Glukose Bouillon wurde mit einer Sporensuspension angeimpft und unter Schütteln (150 U/min) 36 - 40 h bei 25 °C bebrütet. Das Pilzmycel wurde über einen sterilen Faltenfilter (Schleicher und Schüll, ∅185 mm) abfiltriert und in einer 0,6 M KCl (pH 6,5) Lösung aufgenommen. Der enzymatische Abbau der Zellwand erfolgte durch die Zugabe von 40 mg "Lysing Enzym" (aus *Trichoderma harzianum,* Sigma) und 30 µl ß-Glucuronidase Typ H-2S (Sigma). Das Enzym-Myzel Gemisch wurde unter vorsichtigem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Der Verlauf der Protoplasten-Bildung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach ausreichender Protoplastierung wurde die Suspension über eine sterile Watte abfiltriert. Anschließend wurde die Protoplastenlösung bei 3000 x g für 10 min bei 20 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 × mit STC-Puffer gewaschen. 1 µg Plasmid DNA wurde pro Ansatz hinzugefügt und 20 min bei 20 °C inkubiert. Danach wurde 0,8 ml PEG - Lösung zum Ansatz hinzupipettiert und weitere 20 min bei 20 °C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3000 x g, 10 min, 20 °C) wurde das Pellet in 100 µl STC resuspendiert und mit 50 ml Acetamid-Weichagar (42 °C) vermischt. Der Weichagar wurde gleichmäßig auf Acetamidagarplatten gegossen und bei 25 °C inkubiert. Nach 5 - 7 Tagen waren die ersten Transformanten sichtbar.
Von den Transformanten wurde jeweils eine Sporensuspension hergestellt und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Selektivagar ausplattiert um homokaryotische Organismen zu erhalten und zu überprüfen, ob abortive Transformanten vorhanden sind. Abortive Transformanten integrieren ihre Plasmide nicht stabil ins Genom, sondern enthalten die freien Plasmide nur im

Zytoplasma. Sie können zunächst auf dem Selektivmedium wachsen, jedoch kommt es nach einiger Zeit zum Wachstumsstop.

2.9 Nachweis der chromosomalen Integration von pELN118 in *P. camemberti*

2.9.1 DNA-Transfer auf eine Nylonmembran durch Vakuum-Blotting

Die Isolierung der chromosomalen DNA von den Transformanten erfolgte nach 2.4.1. Nach einem Totalverdau der DNA mit *Eco*RI wurden die Fragmente elektrophoretisch auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, gefärbt und fotografisch dokumentiert. Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N^+, Amersham) erfolgte mittels Vakuum-Blotting mit der LKB 2016 VacuGene Apparatur (Pharmacia LKB). Der Zusammenbau der Apparatur und das Auflegen des Gels auf die Membran erfolgte nach Angaben des Herstellers. Depurinierung, Denaturierung und Neutralisation erfolgten bei 45 mbar Unterdruck für jeweils 10-15 min. Nach 10-minütiger Inkubation mit Transferpuffer wurde der Unterdruck auf 50 mbar erniedrigt und erneut Transferpuffer für weitere 30 min auf das Gel gegossen. Nach Abschluß des Transfers wurde die DNA mit UV-Licht (0,7 J/cm, 312 nm, TFL-20M Fluo-Link) auf der Membran fixiert.

2.9.2 Markierung der *ply*118 Sonde mit Digoxigenin

Die Markierung der *ply*118 Sonde (846 bp) erfolgte mit dem DIG-DNA-Labeling Kit der Firma Boehringer, Mannheim. Dabei wurde DIG-dUTPs enzymatisch über "random prime labeling" (willkürliche Zusammensetzung von Hexanukleotid Primern) in die Template-DNA eingebaut. Die zu markierende DNA (1 µg/Ansatz) wurde denaturiert und 1 h bei 37 °C mit einem Hexanukleotid/dNTP Markierungsgemisch und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch EDTA (0,2 M) gestoppt und die markierte DNA mit LiCl (4 M) und 70 %igem Ethanol (–20 °C) gefällt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (7300 x g, 4 °C, 10 min) und das Pellet in 50 µl Tris-HCL-Puffer (10 mM, pH 7,5) resuspendiert.

2.9.3 Hybridisierungsreaktion

(DIG-Luminescent Detection Kit, Boehringer Mannheim)

Nach dem Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Hybond N^+, Amersham) wurde diese kurz mit 2 × SSC/0,1% SDS benetzt. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran für die markierte DNA zu blockieren wurde die Membran 90 min bei 65 °C in Hybridisierungspuffer vorinkubiert (Prähybridisierung). Die DIG-markierte DNA wurde zuerst denaturiert (5 min, 100 °C) und in Hybridisierungspuffer aufgenommen (DNA Konzentration: 10 ng/ml). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C. Anschließend wurde die Membran 20 min bei 40 °C mit 2 × SSC/0,1% SDS und 2 × mit 0,1 × SSC/0,1% SDS bei 65 °C gewaschen. Alle Hybridisierungreaktionen und Waschschritte erfolgten in einem temperaturregelbaren Rotationsofen (Biometra)

2.9.4 Detektion der DIG-markierten Hybride

(DIG-Luminescent Detection Kit, Boehringer, Mannheim)

Die Hybride wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper-Konjugate (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Fab-Fragmente) nachgewiesen. Die alkalische Phosphatase dephosphorliert das Chemilumineszenz-Substrat CDP-Star^{Tm} (Tropix), welches in ein instabiles Intermediärprodukt zerfällt und Licht in Form eines "Glühens" emittiert.
Die Membran wurde zuerst 2-3 min in Waschpuffer und anschließend für 30 min in Blockingpuffer inkubiert. Nach einer Inkubation (30 min) im verdünnten Anti-DIG-AP-Konjugat (1:10000 in Blockingpuffer) erfolgten weitere Waschschritte (1 × 10 min, 2 × 20 min Waschpuffer). Daraufhin wurde die Membran 5 min in DEA-Puffer geschwenkt, anschließend auf eine Klarsichtfolie gelegt und mit verdünnter CDP-Star^{TM}-Lösung (1:100 in DEA-Puffer) versetzt. Eine zweite Klarsichtfolie wurde auf die Membran gelegt und mit einer Walze die Lösung gleichmäßig verteilt sowie überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier entfernt. Mit Hilfe eines Röntgenfilmes (Agfa Curix) wurden nach verschiedenen Zeitpunkten die Lichtsignale detektiert.

2.10 Nachweis der Expression von *ply*118 in *P. camemberti*

2.10.1 Isolierung der Gesamt RNA

Um eine möglichst RNase-freie Umgebung zu schaffen wurden alle benötigten Geräte (Mörser, Pistill und Agarosegelkammer) zuerst mit einer SDS-Lösung (1%) gereinigt und anschließend mit 70 % Ethanol besprüht. Milli-Q und TAE-Puffer wurden mit 0,1 % DEPC versetzt, über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert (121 °C, 20 min).
Zur Isolierung der Gesamt RNA wurde einer Malz-Glukose Bouillon (250 ml) mit einer Pilz-Sporensuspension angeimpft und 3 Tage bei 25 °C bebrütet. Das Mycel wurde über einen sterilen Faltenfilter (Schleicher und Schüll, ∅185 mm) geerntet und in einen sterilen Mörser überführt. Das Mycel wurde mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem sterilen Pistill zu einem Pulver zerrieben. Die weiteren Isolierungsschritte erfolgten mit dem RNeasy Midi Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers. Konzentration und Reinheit der RNA wurden über Photometrie und AGE bestimmt.

2.10.2 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die Transkription des Gens *ply*118 wurde mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen. Die unter 2.10.1 isolierte RNA wurde mit RNase-freier DNase (Promega) nach Angaben des Hersteller bei 37 °C inkubiert. Nach dem Verdau wurde der Ansatz mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Die RT-PCR wurde mit Ready-To-Go® RT-PCR Beads (Pharmacia) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 25 pmol Primer und ungefähr 1 µg total RNA eingesetzt. Als Negativ Kontrolle wurden Parallel-Ansätze bei 95 °C für 10 min ohne Primer und ohne total RNA inkubiert (Inaktivierung der Reverse Transkriptase). Anschließend wurden zu den Kontrollansätzen Primer und total RNA hinzupipettiert und eine PCR durchgeführt. Die Amplifizierung erfolgte im Thermocycler Progene, Thermo-Dux, Werthheim/Main. Das Ergebnis der RT-PCR wurde auf einem Agarosegel dokumentiert.

2.11 Detektion der Nuklease Sekretion in *L. lactis*

2.11.1 Nuklease Aktivitätstest (nach LE LOIR et al., 1994)

Für die Identifikation von nuc^+ Klonen wurden rekombinante *E. coli* bzw. *Lactococcus*-Klone auf Brain-Heart Infusion Agar über Nacht angezüchtet. Anschließend wurden die Platten mit TB-D-Agar (0,05 M Tris (pH 9), 10 g/l Agar, 10 g/l NaCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.3 % Heringssperma-DNA und 90 mg/l Toluidin Blau O) überschichtet und 1 h bei 37 °C inkubiert. Positive Klone zeichneten sich durch die Bildung pinker Höfe um die Kolonien aus. Als negative Kontrollen wurden *E. coli* DH5α (pFUN) bzw. *L. lactis* MG1363 (pFUN) verwendet.

2.12 Endolysin Translation und Sekretion in *L. lactis*

2.12.1 Gewinnung von Endolysin Rohextrakten durch Zellaufschluß

50 ml einer rekombinanten Laktokokken-Übernachtkultur wurden abzentrifugiert (8000 x g, 4 °C, 10 min) und das Zellpellet in 10 ml SM-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet erneut in 2 ml SM-Puffer aufgenommen und 2 × durch die French Press Zelle (100 MPa; SLM Amicon, Zusammenbau und Bedienung der Zelle nach Angaben des Herstellers) geschleust. Die aufgeschlossenen Zellen wurden sofort auf Eis gestellt, zentrifugiert (8000 x g, 4 °C, 10 min) und der Überstand sterilfiltriert (0,22 µm; Gelmann Sciences). Die Endolysin Rohextrakte wurden bei –20 °C aufbewahrt.

2.12.2 Anzucht des Indikatorstammes *Listeria monocytogenes* WSLC 1001

Listeria monocytogenes WSLC 1001 diente als Indikatorstamm für die Detektion der Endolysinaktivität. Dabei wurde 1 l TB-Bouillon mit einer 5 ml Übernachtkultur angeimpft und 16 h bei 30 °C bebrütet. Die Zellsuspension wurde in 250 ml Zentrifugenbecher sedimentiert (15000 x g, 4 °C, 15 min) und mit 100 ml SM-Puffer gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (15000 x g, 4 °C, 15 min) wurden die Zellen mit SM-Puffer auf das 25fache Volumen aufkonzentriert. Das Zellkonzentrat wurde zu je 1 ml aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

2.12.3 Definition der lytischen Aktivität

Eine Unit (1 U) an lytischer Aktivität wurde festgelegt als die Menge an Endolysin, die in 1,0 ml einer Substratsuspension aus *Listeria monocytogenes* WSLC 1001 pro Minute eine Abnahme der optischen Dichte von Δ OD_{600} = – 0,01 bewirkt (20 °C, pH 7,5).

2.12.4 Messung der lytischen Aktivität

Zum Nachweis der Expression und Sekretion der rekombinanten Endolysine wurde entweder der Photometer- oder Platten-Diffusions Test durchgeführt.

2.12.4.1 Photometer-Test

Zur Bestimmung der lytischen Aktivität wurden 1 ml Zellkonzentrat von *L. monocytogenes* mit SM-Puffer auf eine OD_{600} = 1,5 ± 0,2 verdünnt und auf Eis gekühlt. Zu 900 µl Zellkonzentrat wurden 100 µl Rohextrakt des rekombinanten Stammes in eine Einwegküvette pipettiert und die Abnahme der OD_{600} in Abhängigkeit der Zeit gemessen.

2.12.4.2 Platten-Diffusions-Test

Zur Bestimmung der **Endolysin-Expression** wurde 8 ml TB-Weichagar (0,8 % Agar) mit 500 µl *L. monocytogenes* Zellen versetzt und in eine sterile Petrischale (∅ 94 mm) gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden Löcher (∅ 5 mm) in den trüben Agar gestanzt und mit 15 µl des rekombinanten Lysin-Rohextrakts versetzt. Nach 12 h konnte durch Bildung von Lysehöfen festgestellt werden, welches der Rohextrakte eine lytische Aktivität aufwies.

Die **Endolysin-Sekretion** der rekombinanten Stämme wurde auf $GM17^{Ery}$-*Listeria*-Agar (+ 0,8 % *L. monocytogenes* Zellkonzentrat) getestet. Eine Übernachtkultur, der zu überprüfenden Klone wurde in entsprechenden Verdünnungsstufen auf $GM17^{Ery}$-*Listeria*-Agar ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Durch die Zugabe der Listerien erhielt der Agar eine Trübung, so daß Klone, welche das lytische Enzym sekretierten, durch die Bildung klarer Lysehöfe um die Kolonie eindeutig erkannt wurden. Die Auswertung der Platten erfolgte nach 18-24 h Inkubation.

2.12.5 Immunologischer Nachweis von rekombinanten Endolysinen

2.12.5.1 Probenvorbereitung

Zur Überprüfung der Translation wurden die Zellaufschlüsse der rekombinanten Klone wie unter 2.11.1 beschrieben herangezogen.

Für die Detektion des Enzyms im Überstand wurden die rekombinanten Stämme in 50 ml 1/2 $GM17^{Ery}$-Bouillon 8 bis 20 h bei 30 °C bebrütet. Die Zellkultur wurde pelletiert (8000 x g, 10 min; 4 C) und 15 ml des Überstandes sterilfiltriert (0,22 µm, GelmanSciences). Durch mehrmaliges Zentrifugieren (5000 x g, 30 min, 4 °C) in Membrankonzentrationseinheiten (Fugisep®, Ausschlußgrenze 10 kDa, Sevatec) wurde der Überstand auf 500 µl aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde bei –20 °C aufbewahrt.

2.12.5.2 Western-Blotting

Die Proteine wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylen Difluorid (PVDF) Membran (GelmanSciences) durch diskontinuierliches Semidry Elektroblotting (Multiphor II, Pharmacia) nach KHYSE-ANDERSON (1984) bei 20 °C für 1 h bei 0,8 mA/cm^2 übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran getrocknet, kurz mit Methanol benetzt und anschließend mit TBS-Puffer gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindestellen wurde die Membran entweder über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei 20 °C mit einer 1 % Blocking-Lösung (Boehringer, Mannheim) in einem Rotationsofen (Biometra) inkubiert. Es folgte die Behandlung mit polyklonalen Anti-Ply-Antiköpern (pab productions, Herbertshausen, Deutschland) aus Kaninchenserum, in einer Verdünnung von 1:3000 in 0,5 % Blocking-Lösung (Boehringer Mannheim). Nach einem zweimaligen Waschschritt mit TBST-Puffer und 0,5% Blocking-Lösung für jeweils 10 min wurde die Membran mit einem Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:5000 in 0,5 % Blocking-Lösung für 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST-Puffer (4 × 15 min) wurde die Membran mit einer Chemilumineszenz-Substrat-Lösung (Boehringer, Mannheim) versetzt und in Klarsichtfolie eingeschweißt. Dabei oxidiert die Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 ein Chemilumineszenz-Substrat (Luminol), welches unter Lichtemmision über ein Intermediärprodukt zerfällt. Durch Exponieren der Membran auf einem Röntgenfilm konnten die lumineszierenden Proteinbanden dokumentiert werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Konstruktion eines *ply*-Expressionsvektors für *Lactococccus lactis*

Für die Expression der Endolysin-Gene *ply*511 und *ply*118 in *Lactococcus lactis* wurde ein Expressionsvektor konstruiert. Mit Hilfe der PCR Technik wurde *ply*118 mit einer "starken" Laktokokken Shine Dalgano Sequenz (GGAGG; ΔG: - 14,4 (VAN DE GUCHTE et al, 1992)) ausgestattet und in den *E. coli* Vektor pBluescript II (SK-) kloniert. Die Klonierung führte zum Vektor pBL118 (3,8 kb). Da der Vektor pBluescript II (SK-) nur mit Transkriptionssignalen für *E. coli* ausgestattet ist, mußten geeignete Promotoren stromaufwärts des Endolysingens eingeführt werden. Zu diesem Zweck wurden die Laktokokken Promotoren P21, P32 und P59 durch PCR amplifiziert und jeweils in pBL118 kloniert. Die Sequenzen der einzelnen Promotoren sind in Anhang A dargestellt. Bei den drei Promotoren handelt es sich um konstitutive Expressionssignale. Der Ursprung der Promotoren ist nur von P32 und P59 bekannt. P32 ist der Promotor einer Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase und P59 ist ein rRNA Promotor (VENEMA, 1993). Die neu entstandenen Expressionsvektoren wurden pBL118-P21, pBL118-P32 und pBL118-P59 genannt. Die jeweiligen Expressionskassetten P21-*ply*118, P32-*ply*118 und P59-*ply*118 wurden isoliert und in den *Lactococcus-E. coli* shuttle Vektor pTRKH2 eingeführt. pTRKH2 trägt sowohl den *E. coli* Replikationsstartpunkt P15A als auch pAMβ1, welche die Vermehrung in *Lactococcus* ermöglicht. Der Replikationsstartpunkt pAMβ1 stammt aus *Enterococcus faecalis* und stellt das Rückgrat vieler Gram-positiver Vektoren dar. Die Klonierung der Fragmente in pTRKH2 resultierten in den Laktokokken Expressionsvektoren pLC-PL118-P21, pLC-PL118-P32 sowie pLC-PL118-P59. Die Konstruktion, Replikation und Isolierung dieser Vektoren erfolgte zunächst in *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'. Nachdem die Größe der Vektoren sowie die Sequenzen der Expressionsfragmente durch Restriktionsanalysen bzw. Sequenzierung überprüft wurden, erfolgte die Transformation in *Lactococcus lactis* MG1363. Abbildungen 3.1 und 3.2 stellen am Beispiel der Vektoren pBL118-P32 und pLC-PL118-P32 die einzelnen Konstruktionsschritte schematisch dar.

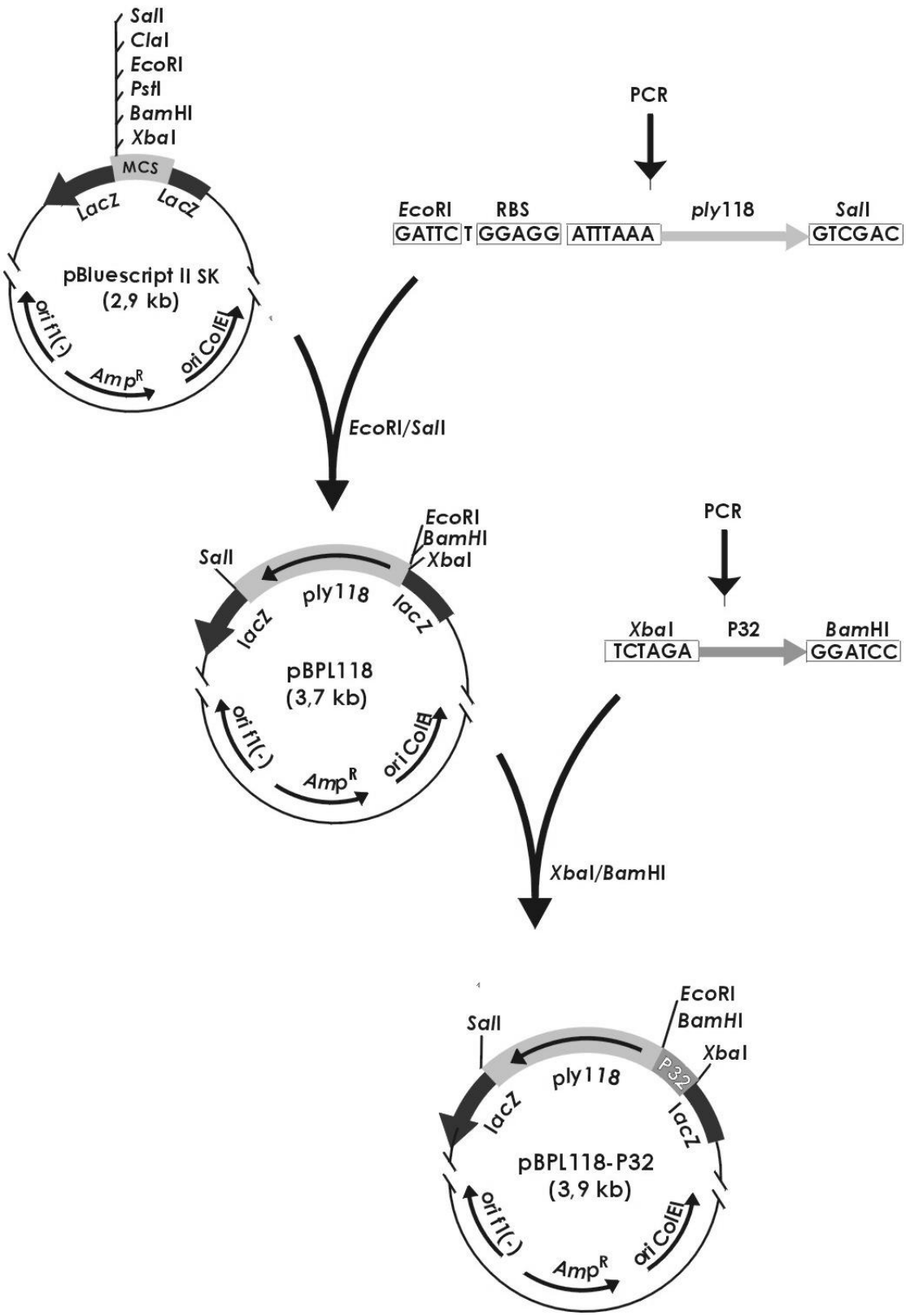

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Konstruktion der Vektoren pBPL118 und pBPL118-P32. Relevante Eigenschaften der Vektoren sind dargestellt. Nähere Erläuterungen siehe Text. Amp^R: Ampicillin-Resistenzgen, MCS: Multiple cloning site, *lac*Z: β-Galactosidase Gen, PCR: Polymerase Kettenreaktion, RBS: Ribosomale Bindestelle. *ply*118: *Listeria* Bakteriophagen Endolysin Gen, P32: Laktokokken Promotor

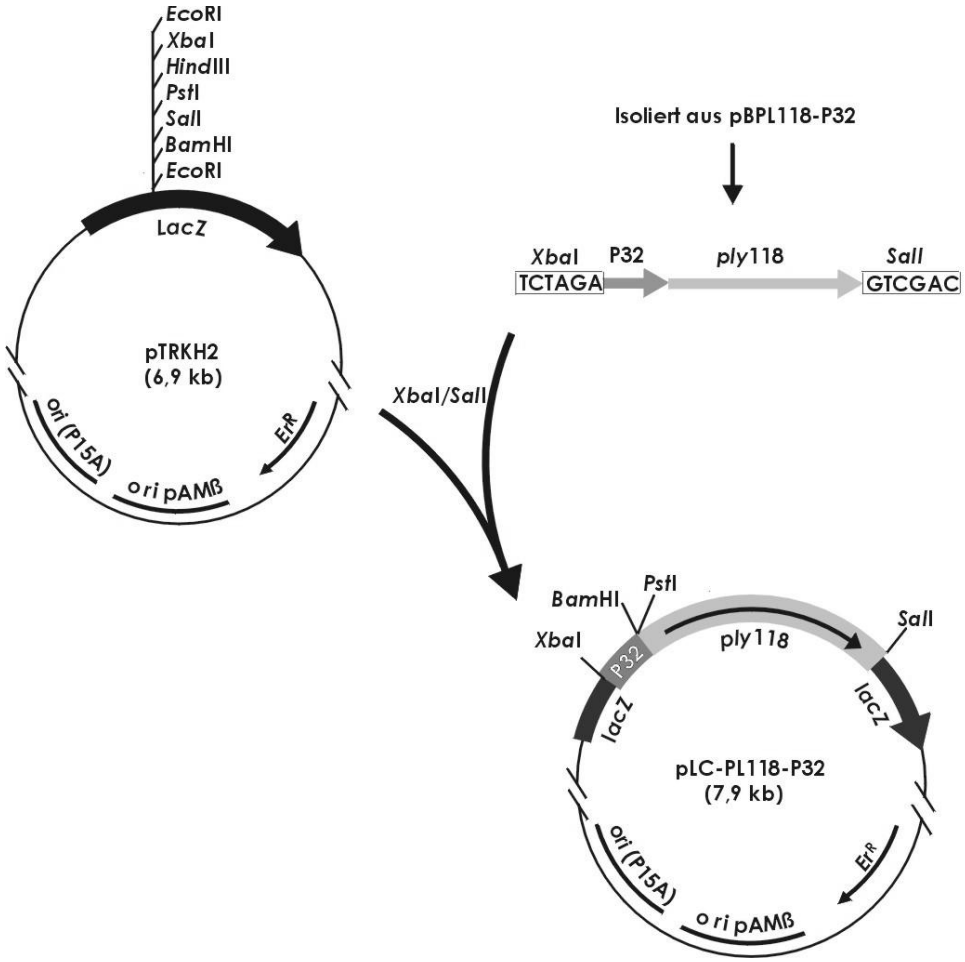

Abbildung 3.2: Letzter Konstruktionsschritt des *Lactococcus* Expressionsvektors pLC-PL118-P32. Die Expressionskassette P32-*ply*118 wurde aus pBPL118-P32 isoliert und in den *E. coli*-*Lactococcus* Shuttle-Vektor pTRKH2 cloniert. Das Produkt der Klonierung ist der Expressionsvektor pLC-PL118-P32. Nähere Erläuterungen siehe Text. Relevante Eigenschaften der Vektoren sind dargestellt. Er^R: Erythromycin-Resistenzgen, *lac*Z: β-Galactosidase Gen, *ply*118: *Listeria* Bakteriophagen Endolysin Gen, P32: Laktokokken Promotor.

3.2 Vergleich der Promotoren P21, P32 und P59 und die Konstruktion von pLC-PL511

Für die weiteren Experimente sollte derjenige Expressionsvektor ausgewählt werden, welcher die stärkste Enzmyaktivität aufzeigte. Folglich wurden rekombinante Zellextrakte der *Lactococcus lactis* Klone mit den jeweiligen Vektoren pLC-PL118-P21, pLC-PL118-P32 und pLC-PL118-P59 isoliert. Die Aktivität des Endolysins PLY118 wurde im Photometer-Test (2.12.4.1) und im Platten-Diffusions-Test (2.12.1.2) überprüft. Dabei zeigte sich, daß Promotor P32 für die Expression des Endolysin-Gens *ply*118 in *Lactococcus* am geeignetsten erschien (Daten nicht gezeigt). In beiden Testverfahren konnte die höchste lytische Aktivität in

Zellextrakten der Klone von *L. lactis* MG1363 (pLC-PL118-P32) nachgewiesen werden. Promotor P59 schien für die Expression des Endolysins ungeeignet zu sein, da mit diesem Promotor die schwächste enzymatische Aktivität erzielt worden ist. Abbildung 3.3 zeigt die lytische Aktivität der rekombinanten Zellextrakte der Derivate (pLC-PL118-P32). Dargestellt sind sowohl der Platten-Diffusions-Test als auch der Photometer-Test. Deutlich ist die rasche Abnahme der optischen Dichte der Listerien-Zellen zu erkennen. Schon nach kurzer Zeit wird aus einer trüben Listerien-Suspension eine klare Lösung. Der Kontrollwert bleibt jeweils konstant. Die Bildung eines lytischen Hofes nach Auftropfen des Zellextraktes auf Listerien-Agar ist ebenfalls deutlich zu sehen Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für alle weiteren Vektorkonstruktionen der Expressionsvektor pLC-PL118-P32 (7,7 kb) als Grundgerüst verwendet.

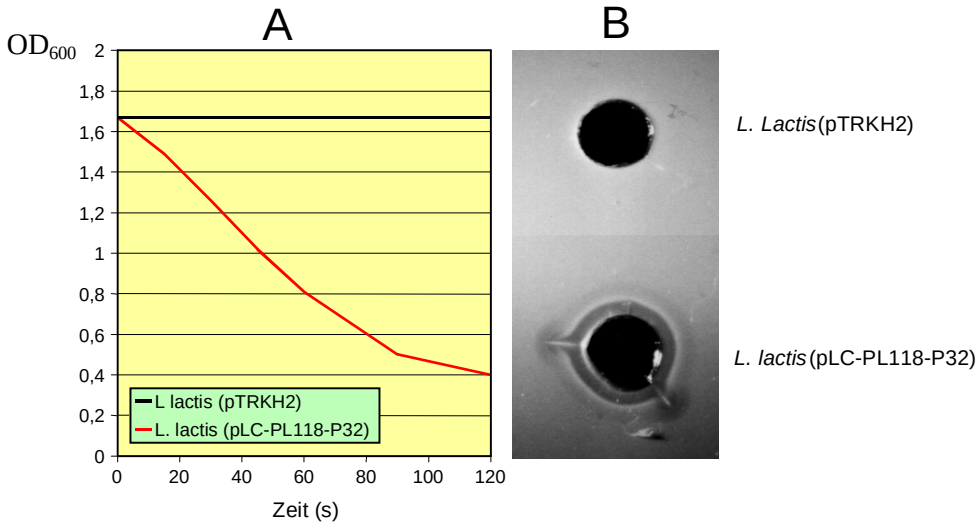

Abbildung 3.3: Dargestellt wird die lytische Aktivität des Zellextrakts aus *L. lactis* MG 1363 (pLC-PL118-P32) gegenüber *Listeria monocytogenes* WSLC1001 Zellen. A: Photometer-Test. B: Platten-Diffusions-Test. Der Kontrollstamm *L. lactis* MG 1363 (pTRKH2) zeigt keine Reaktion. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Für die Expression des Endolysins-Gens *ply*511 in *Lactococcus* wurde *ply*118 in pLC-PL118-P32 durch *ply*511 (Fragmentgröße: 1051 bp) ersetzt. Dabei erfolgte die Transformation direkt in *Lactococcus lactis* MG1363 ohne *E. coli* Xl1-Blue MRF' als Zwischenwirt zu verwenden. Der korrekte Austausch der beiden Endolysin-Gene wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung der Expressionskassette überprüft. Der neu entstandene Expressionsvektor wurde als pLC-PL511 (7,9 kb) bezeichnet.

3.3 Produktion der Endolysine Ply118 und Ply511 in *L. lactis*

Die Expression beider Endolysin-Gene und die Translation ihrer Genprodukte wurden durch den Photometer-Test sowie durch immunologische Nachweisverfahren überprüft. Zellextrakte der rekombinanten Laktokokken Stämme wurden isoliert. Um die lytische Aktivität des Zytoplasmas vergleichen zu können wurde der Gesamtproteingehalt bestimmt und die Suspension auf jeweils 0,5 mg/l Gesamtprotein eingestellt. Um sicherzustellen, daß die lytische Aktivität durch die Endolysine hervorgerufen wird, wurde der Vektor pTRKH2 in *Lactococcus lactis* MG1363 transformiert. Aus diesem Stamm wurde ebenfalls der Zellextrakt isoliert und auf 0,5 mg/l Gesamtproteingehalt eingestellt. Die standardisierten Lösungen wurden zum Photometer-Test herangezogen. Das Ergebnis des Aktivitätstest ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Deutlich ist die rasche Abnahme der optischen Dichte der Listerien-Zellsuspension nach Zugabe der rekombinanten Endolysin-Zellextrakte innerhalb weniger Minuten zu erkennen. Der Kontrollstamm *L. lactis* MG1363 (pTRKH2) blieb jedoch nahezu konstant. Der direkte Vergleich der beiden Lysine zeigt, daß Ply511 eine deutlich schnelle Abnahme der optischen Dichte bewirkt. Schon acht Minuten nach Zugabe des Ply511-Zellextrakts erscheint die Listerien-Zellsuspension klar. Wohingegen beim Versuchsansatz Ply118 zum gleichen Zeitpunkt die Listerien-Zellsuspension noch getrübt ist. Die rechnerische Bestimmung (2.12.3) der Enzym-Aktivität verdeutlicht die stärkere lytische Wirkung von PLy511. Dabei wurden für Ply511 180 U/ml und für Ply118 60 U/ml ermittelt.

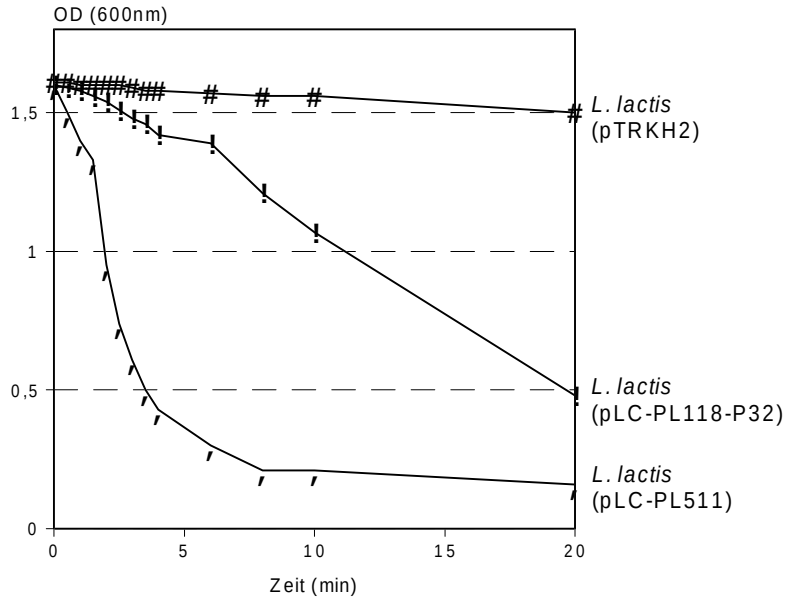

Abbildung 3.4: Abnahme der optischen Dichte einer *Listeria*-Suspension durch Zugabe rekombinaten Zellextrakts isoliert aus *L. lactis* pLC-PL118-P32 bzw. *L.lactis* pLC-PL511. Der Kontrollstamm *L. lactis* (pTRKH2) bleibt in seiner OD unverändert

Zur weiteren Analyse wurde mit den rekombinanten Zellextrakten ein Western Blot durchführt. Dabei wurden die Proben in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach 2.6.2.2 aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (2.11.5.2). Der anschließende Nachweis erfolgte mit polyklonalen Anti-Ply118-Antikörpern. Da Ply118 und Ply511 im C-terminalen Bereich starke Homologien auf Aminosäureebene aufweisen (LOESSNER et al, 1995), zeigte der Anti-Ply118-Antikörper starke Kreuzreaktionen mit Ply511 und konnte daher auch zu dessen Nachweis herangezogen werden. Das Ergebnis des Western-Blots wird in Abbildung 3.5 dargestellt. Deutlich ist im Zellextrakt von *L. lactis* (pLC-PL118-P32) (Spur 1) eine 30 kDa Bande zu erkennen. Dies entspricht dem Molekulargewicht von Ply118 (30,6 kDa). In Spur 3 wurde die *L. lactis* (pLC-PL511)-Fraktion aufgetragen. Hier reagiert der Antikörper mit einer 36 kDa Bande. Auch dieses Resultat stimmt mit dem Molekulargewicht von Ply511 (36,5 kDa) überein. Die Kontrolle (Spur 2) zeigt keine signifikante Bande.

Der Photometer-Test und der immunologische Nachweis zeigen, daß beide Endolysine sowohl enzymatisch aktiv als auch in ihren vollständigen Größe produziert werden und folglich pLC-PL118-P32 und pLC-PL511 geeignete Endolysin-Expressionsvektoren für *Lactococcus* sind.

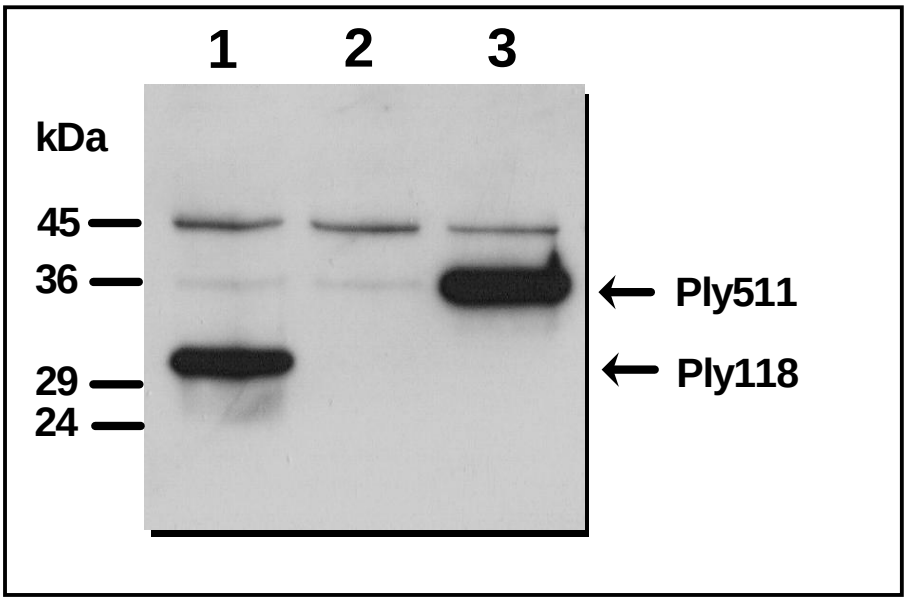

Abbildung 3.5: Immunologische Detektion der Endolysine Ply118 (Spur 1) und Ply511 (Spur 3) im Zellextrakt von *L. lactis* MG1363 (pLC-PL118-P32) bzw. *L. lactis* MG1363 (pLC-PL511) mit Anti-Ply-Antikörper. Der Zellextrakt des Kontrollstamms *L. lactis* MG1363 (pTRKH2) zeigt keine Reaktion (Spur 2) . Nähere Erläuterungen siehe Text. Auf der linken Seite ist der Marker in Kilodalton angegeben.

3.4 Sekretionsvektoren für *L. lactis*

Die erfolgreiche Expression und Translation der Endolysine Ply511 und Ply118 in *Lactococcus lactis* konnte nachgewiesen werden. Jedoch wurde von den Expressionsstämmen kein Endolysin in die Umgebung freigesetzt. Um jedoch effizient gegen Listerien wirksam zu sein, müssen die lytischen Enzyme aktiv ins Medium sekretiert werden. Daher wurde die Expressionskassette aus pLC-PL118-P32 und pLC-PL511 durch eine Sekretionskassette ausgetauscht.

Als Sekretionssignal wurde das Signalpeptid des S-Layer Proteins (SlpA) aus *Lactobacillus brevis* verwendet. Dieses Signalpeptid ($_{SP}$SlpA) besteht aus 31 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 2,9 kDa.

Um zunächst die Funktionalität des Signalpeptids in *Lactococcus* zu überprüfen, wurde eine Nuklease (Nuc) aus *Staphylococcus aureus* als Reporterprotein verwendet. Die Sekretion der Nuklease kann durch einen einfachen Nuclease-Test (Toluidin-Blau-DNA-Agar) nachgewiesen werden und wurde schon von POQUET et al. (1998) erfolgreich als Reporter für Sekretionssignale in Gram-positiven Bakterien eingesetzt.

Durch PCR wurde ein 117 bp Fragment bestehend aus einer "starken" Shine-Dalgano Sequenz und des $_{SP}$*slp*A Gens (93 bp) amplifiziert und durch Sequenzierung überprüft. Das Reportergen ($_{\Delta SP}$*nuc*) wurde ohne eigene Signalsequenz und ohne die ersten 39 Basenpaare amplifiziert. Um eine Fusion des Δ_{SP}*nuc* Gens (475 bp) mit $_{SP}$*slp*A im richtigen Leserahmen zu gewährleisten, mußten zwei zusätzliche Aminosäuren (Thr-Ser) an den N-Terminus des Δ_{SP}*nuc* Gens eingefügt werden. Durch Ligation der beiden Gene entstand ein 592 bp großes Sekretionsfragment, welches ebenfalls durch Sequenzierung überprüft wurde. Durch Austausch des *ply*118-Fragments aus pLC-PL118-P32 und Einfügen der Sekretionskassette ($_{SP}$*slp*A-Δ_{SP}*SPnuc*) entstand der neue Sekretionsvektor (pSL-Δ_{SP}SPnuc; 7,4 kb), welcher schematisch in Abbildung 3.7 dargestellt ist.

pSL-Δ_{SP}Nuc wurde zuerst in *E. coli* DH5α MCR transformiert und die rekombinanten Klone anschließend auf Nuklease-Aktivität überprüft. 80 % der Transformanten exportierten die Nuklease ins Medium. pSL-Δ_{SP}Nuc wurde aus *E. coli* isoliert und in *L. lactis* MG1363 transformiert. Auch die Laktokokken Transformanten zeigten auf Toluidin-Blau-DNA-Agar Nuklease-Aktivität. *E. coli* DH5α MCR (pFUN) und *L. lactis* (pFUN) wurden als Negativ Kontrollen verwendet. pFUN wurde von POQUET et al (1998) als Sekretions-Test-Vektor für Gram-positive Bakterien entwickelt und enthält Δ_{SP}Nuc ohne Signalpeptid.

Die Endolysine Ply118 und Ply511 wurden ebenfalls N-terminal mit den C-Terminus des Signalpeptides $_{SP}$SlpA fusioniert. Die beiden Hybride $_{SP}$*slp*A-*ply*511 (1147 bp) und $_{SP}$*slp*A-*ply*118 (967 bp) wurden jeweils an Stelle des *ply*118-Fragments in den Expressionsvektor pLC-PL118-P32 eingefügt. Durch die Fusion der Endolysine an den C-Terminus von $_{SP}$SlpA wurde Met-1 der Endolysine durch Thr und Ser ersetzt. Die neu konstruierten Endolysin-Sekretions-Vektoren wurden als pSL-PL511 (8,1 kb) und pSL-PL118 (7,9 kb) bezeichnet.

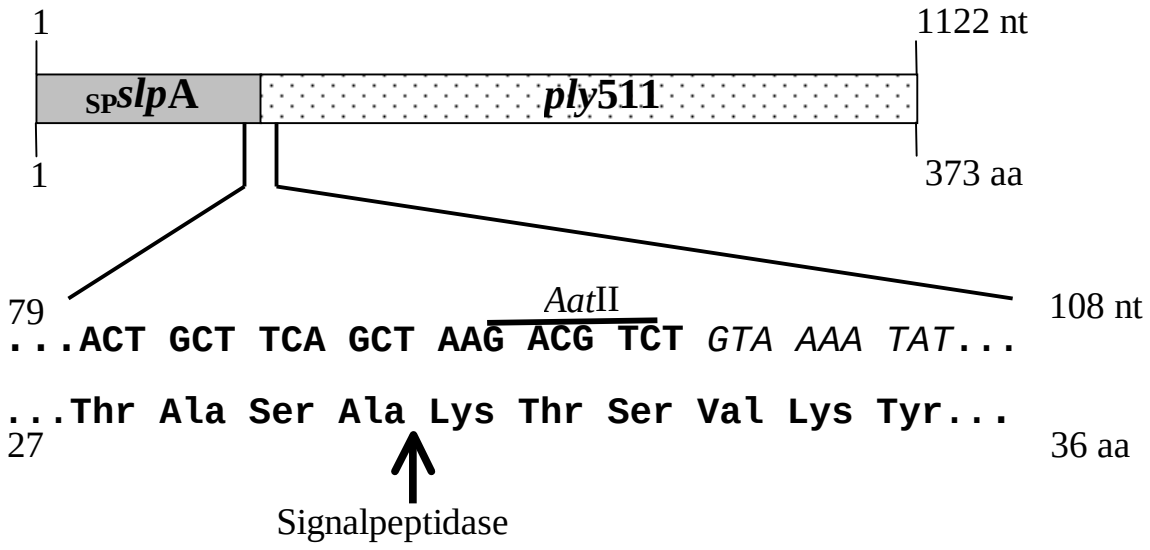

Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Sekretionsfragments $_{SP}$*slp*A-*ply*511. Die Nukleotidsequenz und die dazugehörige Aminosäuresequenz zeigen den vergrößerten Ausschnitt der Fusionsstelle zwischen beiden Genen bzw. Proteinen. Der Startcodon ATG des *ply* Gens wurde durch die Basen ACG TCT (fett gedruckt) ersetzt. Die weitergehende Sequenz des *ply*511 Gens sind kursiv hervorgehoben. Die *Aat*II-Schnittstelle ist unterstrichen. Der Pfeil zeigt die Erkennungsstelle der Signalpeptidase an. nt: Nukleotide, aa: Aminosäuren

Abbildung 3.7 zeigt die schematische Darstellung von pSL-PL511. Die Fusion sowie ein Ausschnitt der Nukleotidsequenz von $_{SP}$*slp*A-*ply*511 wird in Abbildung 3.6 dargestellt. Versuche die Endolysin-Sekretions-Vektoren in *E. coli* zu transformieren scheiterten jedoch, da alle isolierten Plasmide Mutationen in der Signalsequenz als auch im *ply*-Gen aufzeigten. Daher wurden pSL-PL511 und pSL-PL118 direkt in *L. lactis* kloniert. Die Sekretion der Endolysine wurde auf GM17^{Ery}-*Listeria*-Agar (2.12.4.2) überprüft. Klone, welche Ply118 bzw. Ply511 exportierten konnten eine Klärung des durch Listerien getrübten Agars verursachen. Trotz mehrerer Ansätze konnten keinerlei Transformanten isoliert werden, welche Ply118 ins Medium sekretierten. Die Plasmide einiger Klone wurden dennoch weiter analysiert und mehrere $_{SP}$*slp*A-*ply*118 Sekretionskassetten sequenziert. Die Sequenzanalysen ergaben häufige Veränderungen des Leserahmens durch Deletionen und Insertionen in *slp*A als auch im *ply*118 Gen. *Lactococcus*

Klone, welche mit pSL-PL511 transformiert wurden bildeten klare Lysehöfe auf GM17^{Ery}-*Listeria*-Agar und exportierten folglich Ply511 in aktiver Form. Der Kontrollstamm *L. lactis* (pLC-PL511) wurde ebenfalls auf GM17^{Ery}-*Listeria*-Agar ausplattiert. Dieser zeigte jedoch keine Ausbildung von Lysehöfen.

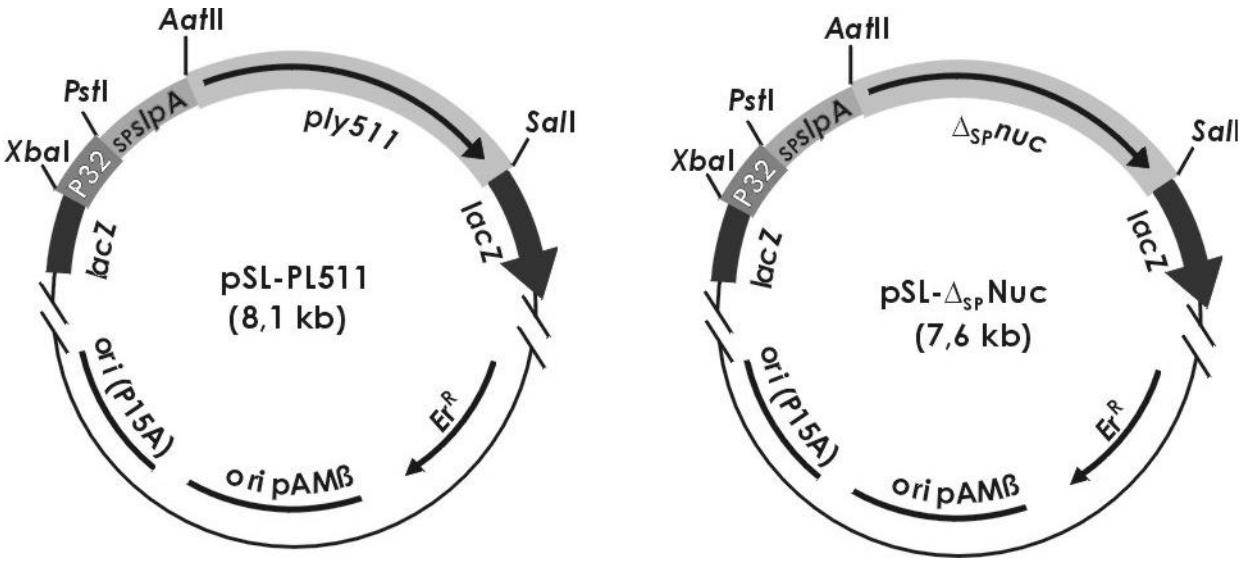

Abbildung 3.7: Sekretionsvektoren pSL-PL511 und pSL-Δ_{SP}Nuc für *Lactococcus lactis*. Nähere Erläuterungen siehe Text. Relevante Eigenschaften der Vektoren sind dargestellt. Er^{R}: Erythromycin-Resistenzgen, *lac*Z: β-Galactosidase Gen, *ply*511: *Listeria* Bakteriophagen Endolysin Gen, P32: Laktokokken Promotor, Δ_{SP}*nuc*: Nuclease-Gen ohne Signalpeptid, $_{SP}$*slp*A: Signalsequenz von *slp*A.

3.4.1 Sekretionsvektor pSL-PL511 ermöglicht Export von Ply511

Die Produktion und Sekretion des Ply511 Endolysins in *L. lactis* (pSL-PL511) Klone wurde mehrfach auf GM17^{Ery}-*Listeria*-Agar überprüft. Dabei zeigte sich, daß ein Klon wesentlich größere Lysehöfe produzierte im Vergleich zu anderen rekombinanten Laktokokken. Das Plasmid dieses Klons wurde isoliert und anschließend mit Restriktionsenzymen in der Weise geschnitten, daß die Größe der Sekretionskassette $_{SP}$*slp*A-*ply*511 durch Agarose-Gelelektrophores bestimmt werden konnte. Abbildung 3.8 dokumentiert das Ergebnis der Elektrophorese. Dabei ist deutlich zu erkennen, daß die Sekretionskassette des lytisch aktiveren Klons (Spur 3) kleiner ist, als die Kassette eines "normalen" Transformanten (Spur 2). Als zusätzliche Kontrolle wurde in Spur 4 das PCR-Produkt $_{SP}$*slp*a-*ply*511 aufgetragen, um einen exakten Größenvergleich zu bieten. Die Mutante wurde als *Lactococcus lactis* MG1363 (pSL-PL511ΔC) bezeichnet.

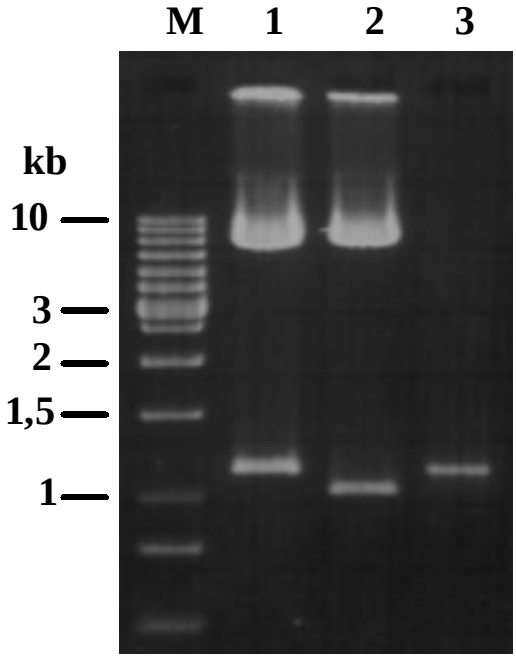

Abbildung 3.8: Agarose-Gelelektrophorese 1 %. Die Sekretionsplasmide pSL-PL511 (Spur 1) und pSL-PL511ΔC (Spur 2) wurden mit *Pst*I/*Sal*I geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Deutlich sind die unterschiedlichen Größenverhältnisse der Sekretionskassetten zu erkennen. Als exakten Größenvergleich wurde das PCR-Fragment $_{SP}$*slp*A-*ply*511 in Spur 3 aufgetragen. Als Standard (M) ist die 100 Kilobasen (kb) Leiter aufgetragen.

Die rekombinanten Laktokokken Klone (pSL-PL511) und (pSL-PL511ΔC) wurden weiter analysiert. Die Sequenzierung von pSL-PL511 ergab an 4 verschiedenen Stellen den Austausch von je einer Base. Diese Mutationen veränderten insgesamt dreimal die Aminosäuresequenz (Ile42→Thr; Tyr138→Cys; Phe303→Ile), welche jedoch keine Auswirkungen auf den Leserahmen und auf die lytische Aktivität des Enzyms hatten. Die Sequenzanalyse von pSL-PL511ΔC ergab eine Deletion von insgesamt 115 bp im C-Terminus von *ply*511. Durch diese Mutation kam es zu einer Änderung des Leserahmens und zur Schaffung eines neuen Stopcodons (TGA) 12 bp stromabwärts der Deletion. Die Abbildung 3.9 zeigt die C-terminale Basensequenz der Sekretionskassette $_{SP}$*slp*A-*ply*511 und das Ausmaß der Deletion und die Bildung des neuen Stopcodons. Das verkürzte Fragment $_{SP}$*slp*A-*ply*511ΔC kodiert somit für ein Protein mit 31,3 kDa [$_{SP}$SlpA-Ply511Δ(S294-K373)].

Trotz des Verlusts von 80 Aminosäuren (bezogen auf Ply511) wurde die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigt - im Gegenteil, die enzymatische Wirkung wird sogar deutlich verstärkt. Die lytische Aktivität der Mutante *L. lactis* MG1363 (pSL-PL511ΔC) ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Eine Übernachtkultur von *L. lactis* MG1363 (pSL-PL511ΔC) wurde verdünnt auf GM17^{Ery}-*Listeria*-Agar ausplattiert und bebrütet. Als Kontrolle wurde der Expressionsstamm *L. lactis* MG1363 (pLC-PL511) verwendet und auf gleiche Weise verfahren. Nach 12 Stunden waren deutlich aufklärende Höfe um die Kolonien des Sekretionsstammes zu erkennen. Der

Kontrollstamm zeigte keine lytische Aktivität. Mit diesem Aktivitätstest konnte deutlich die Sekretion und Aktivität des mutierten Proteins Ply511ΔC dargestellt werden.

Abbildung 3.9: Die Nukleotidsequenz stellt den C-terminalen Bereich der Sekretionskassette *slp*A-*ply*511 des Vektors pSL-PL511 dar. Der Stopcodon TAA ist unterstrichen. Die Restriktionsschnittstellen *Pst*I und *Sal*I sind in kursiver Schrift hervorgehoben. Die Signalsequenz und der N-terminale Bereich von *ply*511 sind schematisch als Balken dargestellt. Die fett gedruckten Sequenzen kennzeichnen den Deletionsbereich von insgesamt 115 bp der Mutante *L. lactis* (pSL-PL511ΔC). Ebenso ist der durch die Mutation neu entstandene Stopcodon **TGA** des verkürzten Lysingens hervorgehoben. Die Zahlen sind in Basenpaare (bp) angegeben. Weitere Erläuterungen siehe Text.

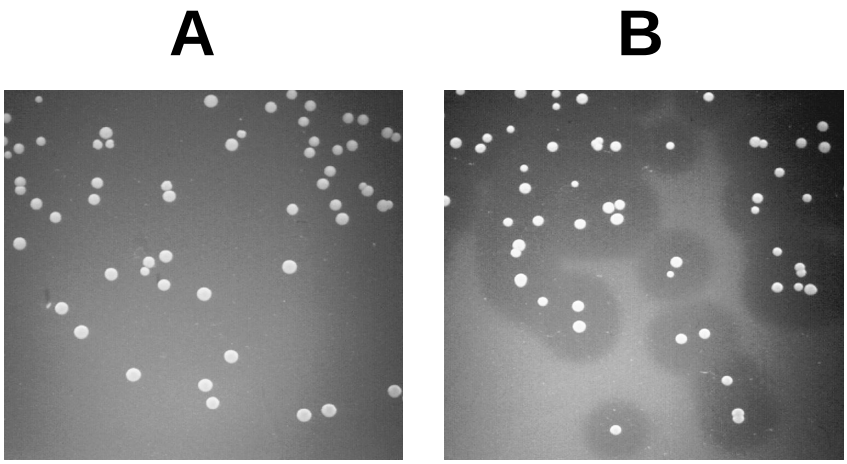

Abbildung 3.10: Nachweis der Sekretion des Endolysins PLY511ΔC. Eine verdünnte Übernachtkultur wurde auf GM17^{Ery}-Listeria Agar ausplattiert und bebrütet. Deutlich sind die Lysehöfe der Mutante *L. lactis* (pSL-PL511ΔC) (B) zu sehen. Der Kontrollstamm *L. lactis* (pLC-PL511) zeigte keine Reaktion (A).

3.4.2 Immunologischer Nachweis des sekretierten Ply511

Die aktive Sekretion der Endolysine Ply511 und Ply511ΔC wurde zusätzlich immunologisch überprüft. Der zellfreie Überstand der rekombinanten Klone wurde elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch einen Western Blot analysiert. Abbildung 3.11 stellt das Resultat dieses Experiments dar. Die Probe des *L. lactis* (pSL-Pl511) Klones zeigte deutlich eine Proteinbande bei 36 kDa. Dies entspricht genau dem errechneten Molekulargewicht des Endolysins Ply511 (36,5 kDa). Der Zellextrakt des Expressionsstammes *L. lactis* (pLC-PL511) wurde ebenfalls aufgetragen, um einen genauen Größenvergleich zum exportierten Ply511 zu besitzen. Die Proteinbande des Expressionsstammes und des Sekretionsstammes sind exakt auf gleicher Höhe. Dieses Ergebnis bestätigt, daß das sekretierte Ply511 während der Translokation durch die Zytoplasmamembran vom SlpA-Signalpeptid (2,9 kDa) abgespalten und als 36,5 kDa Protein in seine Umgebung ausgeschleust wird. Um sicherzustellen, daß Ply511 aktiv sekretiert wird und nicht durch eine Autolyse der Zellen ins Medium gelangt, wurde der Überstand des Expressionsstammes ebenfalls getestet. Spur B zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Im Überstand befinden sich keine Proteine, welche mit dem Anti-Ply-Antikörper reagieren können. Eine kleinere Proteinbande (ca. 29 kDa) konnte im Überstand von *L. lactis* (pSL-PL511ΔC) nachgewiesen werden. Auch dieses Resultat entspricht dem berechneten Molekulargewicht (28,5 kDa) des gekürzten Ply511ΔC Endolysins. Auffallend erscheint, daß in beiden Überständen der rekombinanten Sekretionsstämmen zusätzliche Proteinbanden detektiert wurden. In beiden Proben befinden sich die Banden unterhalb der Endolysinbanden. Es könnten sich hier um Abbauprodukte der exportierten Endolysine handeln. Immunologisch wurden ebenfalls die Zellextrakte der Sekretionsstämme *L. lactis* (pSL-PL511) und *L. lactis* (pSL-PL511ΔC) überprüft (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte gezeigt werden, daß Ply511 vollständig prozessiert und sekretiert wurde und kein Ply511 im Zellextrakt nachweisbar ist.

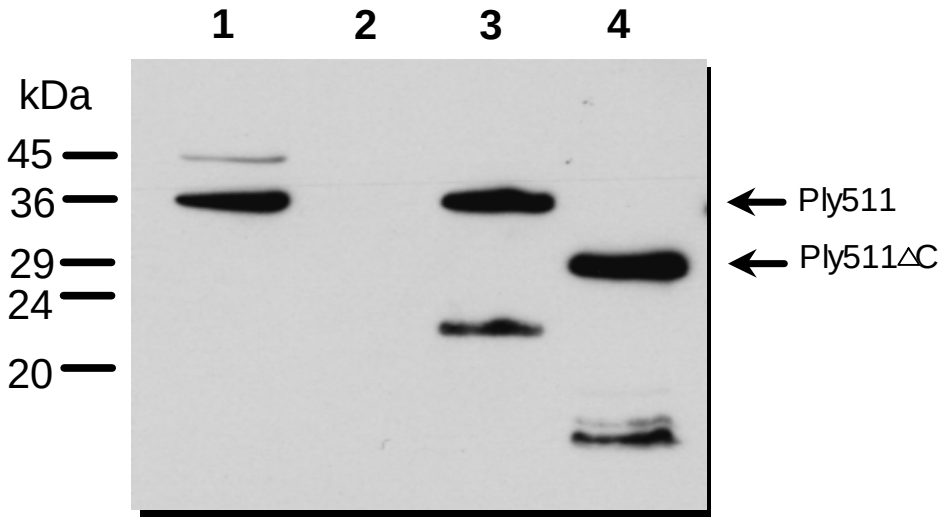

Abbildung 3.11: Immunologische Detektion von Ply511 und Ply511ΔC im Medium von *L. lactis* MG1363 (pSL-PL511) bzw. *L. lactis* MG1363 (pSL-PL511ΔC) durch Anti-Ply-Antikörper. Als positive (Spur 1) und negative (Spur 2) Kontrolle wurde der Zellextrakt bzw. der Überstand des Expressionstammes *L. lactis* (pLC-PL511) aufgetragen. Spur 3: Überstand *L. lactis* MG1363 (pSL-PL511), Spur 4: Überstand *L. lactis* MG1363 (pSL-PL511ΔC). Links sind die Markerproteine in Kilodalton (kDa) angedeutet. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.5 Endolysin Sekretion in Starterkulturen

Eine der wichtigsten Eigenschaften von Starterkulturen ist die Metabolisierung von Laktose zu Milchsäure. Aus diesem Grund wurde der Sekretionsvektor pSL-PL511 in *Lactococcus lactis* Bu2-129 transformiert. Dieser Stamm ist in der Lage Laktose zu verwerten und Milchsäure zu produzieren. Die Säuerung der Transformanten wurde auf Bromkresolpurpur-Laktose-Agar überprüft. Der im Agar enthaltene Indikator Bromkresolpurpur schlägt bei pH 4 von Lila auf Gelb über. Säureproduzierende Klone sind daher an einem gelben Hof zu erkennen. Alle isolierten Transformanten von Bu2-129 (pSL-PL511) bildeten auf Bromkresolpurpur-Laktose-Agar gelbe Höfe durch Ansäuerung des Mediums. Die Endolysin-Produktion wurde durch das Ausplattieren der Klone auf GM17^{Ery}-*Listeria*-Agar überprüft. Auch hier konnte die Sekretion des Ply511 Enzyms durch Bildung von Lysehöfen nachgewiesen werden. Um auszuschließen, daß die lytische Aktivität durch Säureproduktion verursacht wird, wurde der Kontrollstamm *L. lactis* Bu2-129 (pLC-PL511) ebenfalls auf GM17^{Ery}-*Listeria*-Agar ausplattiert. Hier zeigte sich jedoch keine Reaktion. Diese Versuche veranschaulichen, daß die Produktion von Milchsäure und Endolysin kompatibel ist und so eine Grundvoraussetzung für den Einsatz als Starterkultur erfüllt ist.

3.6 Endolysin Expression in *Penicillium camemberti*

3.6.1 Konstruktion und Transformation des Endolysin Expressionsvektors

Eine zusätzliche Fragestellung dieser Arbeit war die Klonierung und Expression des Endolysin-Gens *ply*118 in eukaryotische Starterkulturen. Als Modellorganismus wurde *Penicillium camemberti* ausgewählt, welcher als Reifungskultur bei Weichkäse und Rohwürsten eingesetzt wird. Die Transformation sollte durch eine Kotransformation des Selektionsplasmids p3SR2 (Abbildung 3.13) und eines neu konstruierten Endolysin-Expressionsplasmids erfolgen. Zuerst wurden verschiedene *Penicillium cambemberti* Stämme (GEISEN, 1996) überprüft, ob sie in der Lage sind Acetamid als einzige Stickstoffquelle nützen zu können. Dazu wurden die Originalstämme als Dreipunktausstrich auf Acetamid-Minimalmedium angezogen. Nach 7-10 Tagen Bebrütung wurde der Versuch ausgewertet. Die *Penicillium camemberti* Stämme BFE225 und BFE223 zeigten ein schwaches Wachstum auf Acetamid-Minimalmedium und wurden nicht für die Transformation verwendet. Tabelle 3.1 faßt das Ergebnis der Wachstumsversuche zusammen.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Wachstumsversuche auf Acetamid-haltigem Minimalmedium. (-) kein Wachstum, (-/+) leichtes Wachstum

P. CAMEMBERTI STAMM	WACHSTUM AUF ACETAMID-MINIMALMEDIUM
BFE 223	–/+
BFE 224	–
BFE 225	–/+
BFE 226	–
BFE 229	–
BFE 230	–
BFE 231	–

Das Endolysin-Gen wurde durch PCR mit einer *BamH*I bzw. *EcoR*E Schnittstelle versehen, so daß eine gerichtete Klonierung stattfinden konnte. Durch die Klonierung von *ply*118 wurde das Dihydofolatreduktase-Gen aus *E. coli* in pELN5 durch das Endolysin Gen ersetzt. pELN5 verfügt über einen relativ starken Promotor der mitochondrialen ATP-Synthase Untereinheit 9 Gens *oli*C31 aus *Aspergillus nidulans* sowie die ersten 12 Aminosäuren des Signalpeptids

OliC31. Durch die Fusion von *ply*118 mit dem 5'-Ende des $_{SP}$*oli*C31 sollte die Expression des Endolysins verstärkt werden. Der neu konstruierte Expressionsvektor wurde als pELN118 (Abbildung 3.13) bezeichnet. Die Konstruktion und Multiplikation von pELN118 wurde zuerst in *E. coli* XL1-Blue MRF' durchgeführt. Die Klonierung des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Promotorsequenz und die Fusion beider Gene unter Berücksichtigung des Leserahmens sind in Abbildung 3.12. Ebenfalls sind die spezifischen Promotorbereiche gekennzeichnet.

---

gttaacccgg aaactcagtc tccttggccc cgtcccgaag ggacccgact taccaggctg

ggaaagccag ggatagaata cactgtacgg gcttcgtacg ggaggttcgg cgtagggttg

ttcccaagtt ttacacaccc cccaagacag ctagcgcacg aaagacgcgg agggtttggt

gaaaaaaggg cgaaaattaa gcgggagacg tatttaggtg ctagggccgg tttcctcccc

atttttcttc ggttcccttt ctctcctgga agactttctc tctctctctt cttctcttct

tccatc ctcag tccatc ttcctttcccatca tccatc tcctcacc tccatc tcaact

Signalpeptid oliC31→

ccatcacatcaca ATG GCC GCC TCT CGT GTC TTC GCT CAG CGC CTG GCC TCG

***Bam*HI** ***ply*118 →**

CTC GA*G GAT CC*C *ATG* ACA AGT TAT TAT TAT AGT.....

Abbildung 3.12: Promotorsequenz der ATP-Synthase Untereinheit 9 (*oli*C31) sowie die Fusionierung der ersten 36 Nukleotide der Signalsequenz des *oli*C31 Gens und des *ply*118 Gens. Über einen Linker wurde eine *Bam*HI Schnittstelle eingebaut. Fett hervorgehoben sind die mögliche TATA-Box sowie die Kozak-Sequenz (KOZAK, 1986) und der Transkriptionsstart der ATP-Synthase. Eingerahmt sind die für eukaryotische Promotoren typischen Hexamerstrukturen (KINNAIRD und FINCHAM, 1983; LEGERTON und YANOFSKY, 1985).

Wie in 2.8.3 beschrieben wurden die beide Plasmide pELN118 und das Selektionsplasmid p3SR2 (HYNES, 1983) durch Protoplastierung in verschiedene *Penicillium camemberti* Stämme transformiert. Nach 10 Tagen konnten 12 Transformanten auf Acetamid-haltigem Selektivmedium isoliert werden. Da es sich bei filamentösen Pilzen um mehrkernige

Organismen handelt, wurde eine Sporensuspension von den entsprechenden Transformanten erstellt und in verschiedene Verdünnungsstufen auf Selektivagar ausplattiert, um homokaryotische Klone zu erhalten. Weiterhin wurde überprüft, ob abortive Transformanten isoliert wurden. Dabei werden die Plasmide nur ins Zytoplasma aufgenommen und nicht stabil ins Genom integriert. Sie können zuerst auf dem Selektivmedium wachsen, doch nach einiger Zeit kommt es zum Wachstumsstop. Es zeigte sich, daß alle 12 Transformanten auch ohne Selektionsdruck mitotisch stabil waren und davon ausgegangen werden konnte, daß p3SR2 stabil ins Genom integriert wurde. Da bei einer Kotransformation 80 % der Transformanten ebenfalls den Konstruktionsvektor aufnehmen, ist eine Integration des Expressionsvektors pELN118 sehr wahrscheinlich aufgetreten.

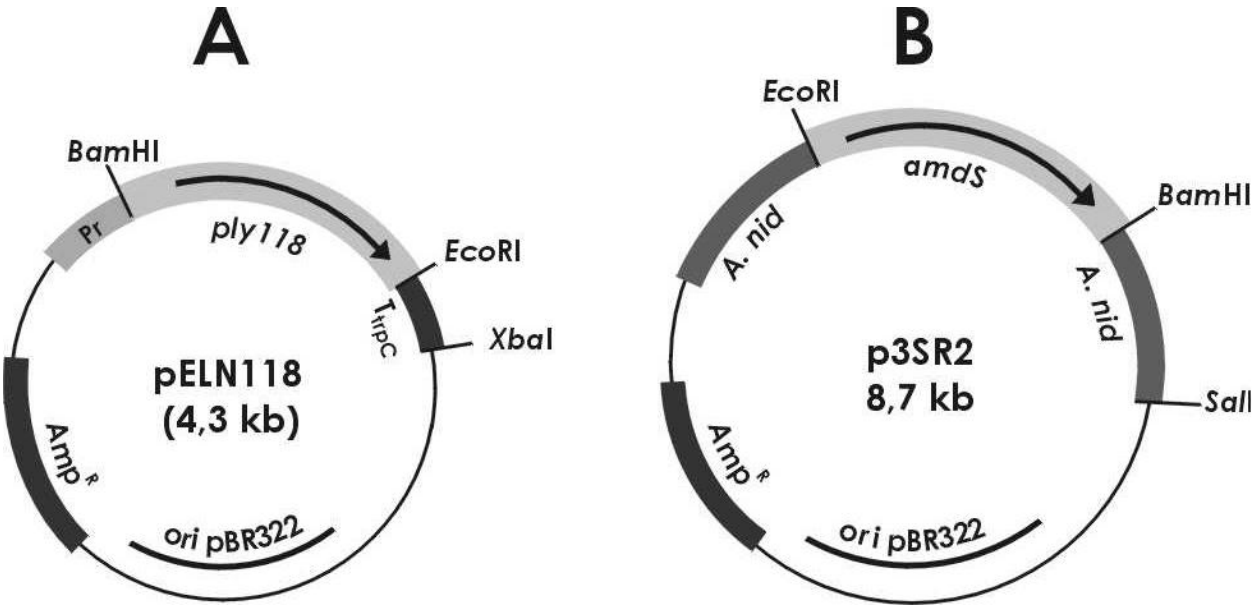

Abbildung 3.13: (A): Expressionsplasmid pELN118 mit dem Promotor der ATP-Synthase Untereinheit OliC31. (B): Selektionsplasmid p3SR2 zur Selektion auf Acetamid-haltigen Medium. Amp^R: Ampicillinresistenz; T_{trpc}. Terminator Region des *trp*C Gens aus *Aspergillus nidulans*; *amd*S: Acetamidase Gen aus *Aspergillus nidulans*; *A. nid*: chromosomale DNA aus *Aspergillus nidulans*; ori pBR322: Replikationsursprung für *E. coli*. Nur relevante Eigenschaften der Vektoren sind dargestellt.

3.7 Integration des *ply*118 Gens ins Genom von *P. camemberti*

Die Integration des Endolysin Gens *ply*118 wurde durch PCR und Southern Blotting überprüft. Von allen 12 Transformanten und den Originalstämmen wurde chromosomale DNA isoliert und aufgereinigt. Diese diente bei der anschließenden PCR als Template. Die PCR ergab, daß nur

vier *P. camemberti* BFE 229 Klone das Endolysin *ply*118 ins Genom integriert hatten. In diesen Fällen hatten nur 25 % der Transformanten beide Plasmide aufgenommen und chromosomal integriert. Abbildung 3.14 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der jeweiligen PCR-Produkte. Die Spuren 1-4 zeigen deutliche Banden, welche genau der Größe des *ply*-Gens (846 bp) entsprechen. Als positive PCR-Kontrolle wurde pELN118 als Template verwendet. Das Ergebnis dieser PCR ist in Spur 6 dargestellt. Die chromosomale Pilz DNA des Wildtyps zeigte kein PCR Signal (Spur 5). Der anschließend durchgeführte Southern-Blot (Daten nicht gezeigt) bewies eindeutig, daß die PCR-Produkte dem Endolysin Gen *ply*118 entsprachen.

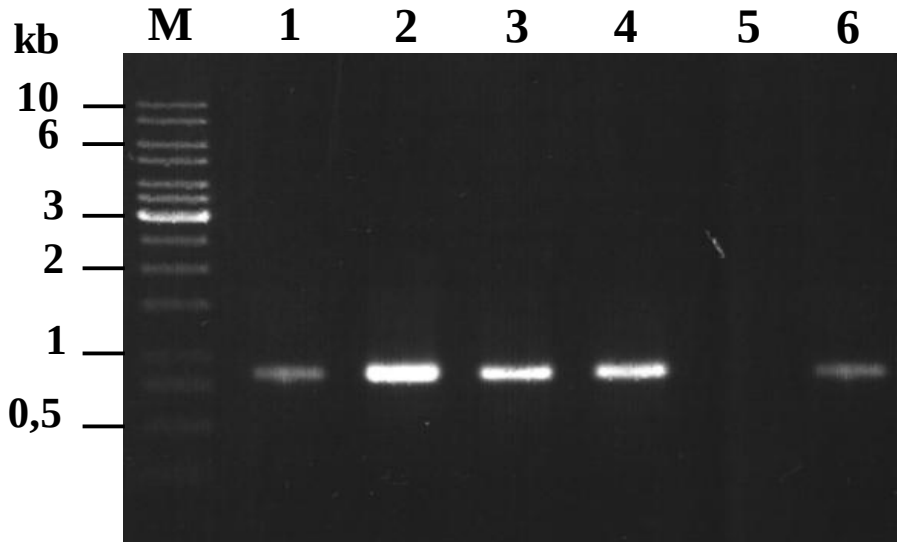

Abbildung 3.14: Nachweis der chromosomalen Integration des *ply*118 Gens in *P. camemberti* BFE229 durch PCR. Als Template wurde die aufgereinigte DNA der rekombinaten Pilze verwendet. Spur 1-4: rekombinante *P. camemberti* (pELN118), Spur 5: Wildtyp *P. camemberti*; Spur 6: positive Kontrolle, als Template diente pELN118. Als Standard ist die 100 Kilobasen (kb) Leiter aufgetragen.

Durch das Ergebnis der PCR konnte nachgewiesen werden, daß *ply*118 in das Genom von *P. camemberti* integriert wurde. Die PCR kann jedoch keinen Aufschluß darüber geben, wie oft dieses Integrationsereignis ins Genom stattgefunden hat. Daher wurde die chromosomale DNA der rekombinanten Pilze mit *Eco*RI vollständig verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und ein Southern-Blot durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

Drei Transformanten (Spur 1, 3 und 4) zeigen ein identisches Bandenmuster. Der rekombinante Transformant in Spur 2 besitzt eine zusätzliche Bande. Der Kontrollstamm *P. camemberti* BFE229 (Spur 5) reagiert schwach mit der DIG-markierten *ply*-Sonde. Da jedoch alle Proben die gleiche Bande an dieser Stelle aufweisen, handelt es sich hier wohl um eine Kreuzreaktion der

ply-Sonde mit der Pilz-DNA. Der Southern-Blot ist ein zusätzlicher Beweis für die chromosomale Integration des Endolysin-Gens in *P. camemberti*. Bei allen Transformanten wurde der Vektor pELN118 mehrfach integriert.

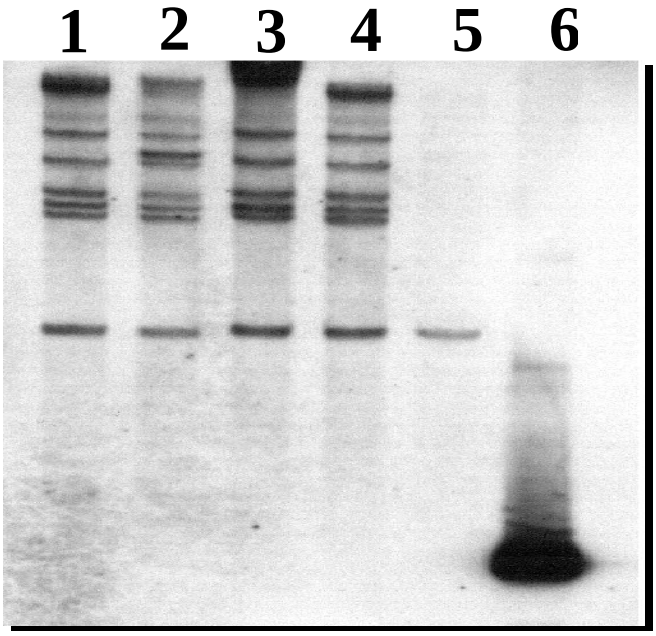

Abbildung 3.15: Southern Blot Analyse der mit *Eco*RI vollständig verdauten *P. camemberti* (pELN118) DNA. Spur 1-4: rekombinante *P. camemberti* BFE 229 (pELN118), Spur 5: *P.camemberti* BFE 229; Spur 6: *ply*118

3.8 Detektion des *ply*118 Transkripts

Die Expression des Endolysin-Gens wurde mit Hilfe der Reversen-Transkriptase (RT) PCR durchgeführt. Die rekombinanten Stämme als auch der nichtransformierte Stamm wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und deren Gesamt-RNA isoliert. Die Qualität der Gesamt-RNA wurde auf einem Agarosegel überprüft und diente in der durchgeführten RT-PCR als Template. Alle vier Transformanten zeigten eindeutige Signale auf Höhe des *ply*-Gens (Abbildung 3.16). Der Kontrollstamm (Wildtyp) ergab kein Signal. Um sicherzugehen, daß keine Spuren von DNA als Kontamination vorhanden waren, wurde als Kontrolle eine PCR mit der Gesamt-RNA der einzelnen Transformanten durchgeführt. Hier konnten keinerlei Signale nachgewiesen werden. Daher erscheint es naheliegend, daß die Promotor Sequenz der ATP Synthase Untereinheit 9 von *Penicillium camemberti* erkannt wird und die Expressionskassette vollständig und funktionsfähig

ins Genom integriert wurde. Ebenso konnte bei allen vier Transformanten die mRNA des *ply*118-Gens nachgewiesen und somit gezeigt werden, daß eine Transkription stattfindet.

3.9 Keine Translation des Endolysins in *P. camemberti*

Zum Nachweis der Translation wurden Zellextrakte der Transformanten isoliert und durch Western Blotting analysiert. Die Anti-Ply-Antikörper zeigten starke Kreuzreaktionen mit zahlreichen Pilzproteinen, so daß die Autoradiogramme nicht auswertbar waren. Eine zusätzliche chromatographische Aufreinigung (pab productions, Herbertshausen, Deutschland) der Anti-Ply-Antikörper verminderte zwar die Kreuzreaktionen, jedoch waren keine eindeutigen Signale sichtbar (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis der Translation des Endolysins Ply118 im Zytoplasma von *Penicillium* -Transformanten war daher nicht möglich.

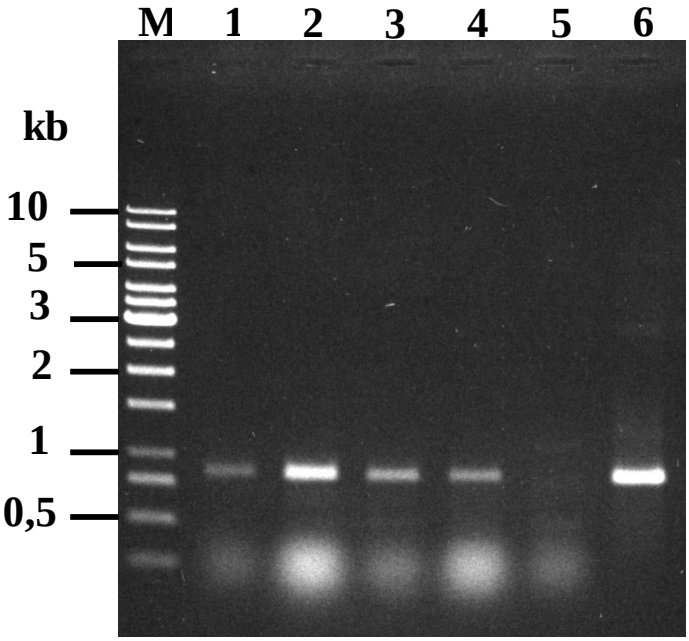

Abbildung 3.16: Detektion der mRNA des Endolyingens *ply*118 in *P. camemberti* mit Hilfe der RT-PCR. Spuren 1-4: *P. camemberti* (pELN118) Klone. Spur 5: Wildtyp. Spur 6: positive Kontrolle (als Template wurde pELN118 verwendet). Als Standard (M) ist die 100 Kilobasen (kb) Leiter aufgetragen.

.

4 DISKUSSION

4.1 Endolysin Expression in *Lactococcus lactis*

4.1.1 Die Auswahl der Transkriptions- und Translationselemente

In dieser Arbeit wurde die Konstruktion eines Endolysin Expressionsvektors für *Lactococcus lactis* erfolgreich demonstriert. Die Klonierung einer Expressionskassette wurde mit Hilfe des Vektors pBluescript II (SK-) in *E. coli* durchgeführt. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine schnelle Reproduktion und Überprüfung der einzelnen Konstruktionsschritte. Als Ribosomale Bindestelle (RBS) wurde die Nukleotidsequenz GGAGG (ΔG = -14.4 kcal/mol) ausgewählt, welche in mehreren stark expremierten Laktokokken Genen aufzufinden ist (MAYO et al., 1991; KOK et al., 1988; VAN DER VOSSEN, 1987). Ebenfalls eine große Bedeutung für eine effektive Initiation der Translation wird der Anzahl der Nukleotide zwischen RBS und des Startcodons zugeschrieben. Wie bei *E. coli* (GOLD, 1988) und *B. subtilis* bereits beschrieben (HAGER und RABINOWITZ, 1985) variiert dieser Bereich bei *Lactococcus* zwischen 4 und 15 Basenpaare. Am häufigsten sind jedoch 9 Nukleotide zu finden (VAN DE GUCHTE et al., 1992), so daß für Konstruktion der hier verwendeten Expressionskassette ebefalls diese Anzahl von Nukleotiden eingesetzt wurde.

Für die Expression der Endolysine in *Lactococcus lactis* wurden die drei Promotoren P21, P32 und P59 ausgewählt. Alle drei Expressionssignale wurden aus *Lactococcus lactis* Wg2 mit Hilfe des Promotor-Selektions-Vektors pGKV210 isoliert (VAN DER VOSSEN et al., 1987). Diese Promotoren besitzen den typischen Aufbau eines prokaryotischen Expressionssignals mit der Pribnow Box "TATAAT" und der -35 Region "TTGACA", die sowohl in *E. coli* als auch in *Bacillus subtilis* (VAN DER VOSSEN et al., 1987) aktiv sind. Im direkten Vergleich der Promotoren P21, P32 und P59 wurde die höchste Endolysinaktivität unter der Kontrolle des Promotors P32 gemessen, welcher normalerweise die Expression des Fruktose 1,6-Biphosphat Aldolase Gens reguliert. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Arbeit von VAN DER VOSSEN (1987), welcher aufgrund der Aktivität der Chloramphenicolazetyltransferase P59 als stärkeren Promotor einordnete. P32 wurde jedoch erfolgreich für die Expression verschiedener Gene in *Lactococcus lactis* eingesetzt. So wurden die Bakteriozine Divergicin A (VAN BELKUM et al., 1997) und Colicin V (MCCORMICK et al., 1999) sowie das Hühnereiweiß Lysozym (VAN DE GUCHTE et al.,

1989), die "Neutral Protease" aus *Bacillus subtilis* (VAN DE GUCHTE et al., 1992), und das *slp*H Gen aus *Lactobacillus helveticus* (CALLEGARI et al., 1998) unter der Kontrolle des Promotors P32 exprimiert. Im Gegensatz zu vielen anderen Laktokokken Promotoren, die durch äußere Einflüsse wie Laktose (PAYNE et al., 1995), Nisin (DE RUYTER et al., 1996), pH oder Temperatur (ISRAELSON et al., 1995) reguliert werden, handelt es sich bei P32 um einen konstitutiven Promotor, so daß keine Induktion der Expression stattfinden muß. Aus diesen Gründen wurde auch für alle weiteren Vektorkonstruktionen P32 als Promotor verwendet.

4.1.2 Stabile Expression der Endolysine Ply118 und Ply511

Durch die Integration der Expressionskassetten P32-*Ply*118 und P32-*Ply*511 in den *E. coli*-*Lactococcus*-Shuttle-Vektor pTRKH2 konnte eine stabile Expression der Endolysine in *Lactococcus lactis* erreicht werden. pTRKH2 (O'SULLIVAN und KLAENHAMMER, 1993) besitzt gegenüber anderen Klonierungsvektoren den Vorteil, daß er sich durch den Theta-Replikationsmechanismus (BRUAND et al., 1991) multipliziert. Im Gegensatz zum "rolling circle"-Prinzip entstehen dabei keine DNA-Einzelstränge als Zwischenprodukt und erhöht damit die strukturelle Stabilität des Plasmids (KIEWIET et al., 1993). Ein weiterer Vorteil ist die Klonierung und Replikation in *E. coli*, so daß auch in diesem Mikroorganismus die Konstruktion der Endolysin-Expressionsvektoren durchgeführt wurde.

Wie in anderen Arbeiten (CALLEGARI et al., 1998; GAIER et al., 1992) zuvor beschrieben zeigten die rekombinanten *Lactococcus lactis* MG1363 (pLC-PL118) bzw. (pLC-PL511) gegenüber dem Wildtyp ein geringeres Wachstum. Es ist bekannt, daß durch die Akkumulation heterologer Proteine die Zellphysiologie negativ beeinflußt werden kann und sich somit auch auf die Wachstumgeschwindigkeit auswirkt (MAKRIDES, 1996; KURLAND und DONG, 1996).

Die Expression der Endolysine Ply118 und Ply511 in *Lactococcus lactis* wurden durch zwei unterschiedliche Methoden aufgezeigt. Im Photometer-Test (Abb. 3.4) konnte dargestellt werden, daß durch die Expression der Endolysine in *Lactococcus* ihre Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Im direkten Vergleich der Endolysine zeigt Ply511 eine deutlich höhere lytische Aktivität als Ply118. Dies steht im Gegensatz zu der heterologen Expression der Endolysine in *Escherichia coli*. LOESSNER et al. (1996) zeigten in ihrer Arbeit, daß Ply118 die stärkste lytische Wirkung auf *Listeria monocytogenes* Zellen besitzt.

Durch den immunologischen Nachweis konnte nachgewiesen werden, daß beide Enzyme in ihrer vollständigen Größe synthetisiert werden. Die Detektion von Ply511 durch Anti-Ply118

Antikörper ist dadurch möglich, daß beide Lysine signifikante Homologien auf Aminosäureebene im zentralen C-Terminus (LOESSNER et al. 1995) besitzen.

4.2 Export in *Lactococcus*

4.2.1 Nuclease - ein geeigneter Export Reporter für *L. lactis*

In früheren Experimenten (LANG-HALTER, 1998) wurde bereits gezeigt, daß durch die Expression und zytoplasmatische Anreicherung der Endolysine in *Lactococcus* keine effiziente Reduktion der *Listeria* Kontaminationen z.B. auf der Käseoberfläche erreicht werden konnte. Die natürliche Autolyse von Laktokokken am Ende der stationären Phase führte zu einer unzureichenden Endolysinfreisetzung in die Umgebung. Auch im Medienüberstand der rekombinanten *Lactococcus lactis* (pLC-PL118-P32) bzw. (pLC-PL511) konnten keine Phagenlysine nachgewiesen werden. Eine ausreichende Lysinausschüttung konnte daher nur durch eine Sekretion von Ply118 und Ply511 gewährleistet werden.
Die häufig eingesetzten Exportsignale von *Lactococcus lactis* $_{SP}$Usp45 (VAN ASSELDONK et al., 1990) und $_{SP}$PrtP (VOS et al., 1989) wurden erfolgreich für die Sekretion heterologer Proteine in Laktokokken verwendet. Jedoch konnten dabei in der Regel nur geringe heterologe Proteinmengen wie z.B das Tetanus Toxin Fragment (2.9 mg/l) (WELLS et al., 1993) oder das Murin Interleukin-2 (3 mg/l) (STEIDLER et al., 1995) im Überstand nachgewiesen werden. SAVIJOKI et al., (1997) beschrieb zum erstenmal den Einsatz des *Lactobacillus brevis* S-Layer Signalpeptid $_{SP}$SlpA für den Export heterologer Proteine in Milchsäurebakterien. Dabei konnte durch die Fusion von $_{SP}$SlpA mit der *E. coli* β-Lactamase in *Lactococcus lactis* bis zu 50 mg/l heterologes Protein im Überstand detektiert werden. Ebenso wurden die Reportergene (β-Glucuronidase, Luciferase und Aminopeptidase) in *Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum* und in *Lactobacillus gasseri* durch $_{SP}$SlpA sekretiert (KAHALA und PALVA, 1999). In dieser Arbeit konnte durch die Verknüpfung des Signalpeptids $_{SP}$SlpA mit der *Staphylococcus aureus* Nuklease (ohne eigenes Signalpeptid) die Sekretion des Reporterproteins dargestellt werden. Damit zeigte sich, daß sowohl die Konstruktion der Sekretionskassette als auch das Signalpeptid für die heterologe Expression und Sekretion in *Lactococcus lactis* MG1363 geeignet sind. Durch den einfachen und schnellen Plattendiffusionstest, wobei im Gegensatz zu anderen Screeningverfahren (HOLS et al., 1994) die Vitalität rekombinanter Klone erhalten bleibt, zeichnet sich die *Staphylococcus aureus* Nuklease als ideales Reporterprotein für die Detektion und Analyse von Exportsignalen aus. So beschrieben LANGELLA und LE LOIR, (1999) die

Regulierung eines Sekretionssystems in *Lactococcus lactis* mit Hilfe der Nuklease . POQUET et al., (1998) konnte durch Δ_{SP}Nuc bis dahin unbekannte Export- und Membranproteine in *Lactococcus lactis* identifizieren.

4.2.2 Export von Ply511

Der effiziente Einsatz heterologer Endolysine als Biokonservierungsmittel gegen eine Kontamination mit *Listeria monocytogenes* kann nur durch eine ausreichende Sekretion ermöglicht werden. Der erfolgreiche Transport der Nuklease zeigt, daß die Verwendung von $_{SP}$SlpA ein geeigneter Weg zur Bewältigung dieser Aufgabe sein kann. Daher wurden die beiden Bakteriophagen Endolysine Ply118 und Ply511 auf die gleiche Weise mit dem Signalpeptid fusioniert und in *Lactococcus lactis* MG1363 transformiert wie $_{\Delta SP}$Nuc aus *Staphylococcus aureus*. Die Veränderung des N-Terminus durch die Verknüpfung mit einem Exportsignal führt zu keiner Beeinträchtigung der lytischen Aktivität. LOESSNER et al. (1996) zeigte, daß durch die Verknüpfung von 36 Nukleotidresten und Modifikation des 5' Ende der *ply*118 und *ply*511 Gene keine Einschränkung ihrer Transkription und Translation in einem heterologen Wirt stattfindet.
Auch in dieser Arbeit führte die Fusion mit $_{SP}$SlpA und anschließenden Transformation des Sekretionsvektors pSL-PL511 in *Lactococcus lactis* MG 1363 zur Expression und Sekretion des aktiven Ply511-Lysins. Die Ergebnisse des Western-Blots zeigen deutlich, daß Ply511 vollständig transkripiert und ins Medium sekretiert wird. Phagenlysine gelangen meist durch sogenannte Holine, welche Löcher in der Zytoplasmembran formen, zu ihrem Wirkungsort, dem Peptidoglykan. In dieser Arbeit wurde zum erstenmal gezeigt, daß Lysine durch klassische Signalpeptide exportiert werden können.
Das häufigste Problem bei der Sekretion heterologer Proteine ist eine unzureichende Erkennung fremder Signalsequenzen und/oder die nicht korrekte Prozessierung dieser Sekretionskassette (WELLS et al., 1992). Dabei kommt es zu einer Ansammlung des nicht-exportierten Proteins im Zytoplasma, wodurch die Zelle häufig unter physiologischen Streß gerät. Aufgrund immunologischer Analysen des Zytolplasmas des Sekretionsstammes *Lactococcus lactis* (pSL-PL511) konnte in dieser Arbeit keine Akkumulation von nicht-sekretierten Ply511 nachgewiesen werden. Dies wurde ebenfalls von SAVIJOKI et al., (1997) beschrieben, wodurch die Fusion des Signalpeptids $_{SP}$SlpA mit der *E. coli* β-Lactamase keine oder nur geringe Mengen der unreifen β-Lactamase im Zellextrakt gefunden wurde.

Die anschliessenden Sequenzanalysen der *Lactococcus lactis* (pSL-PL511) Klone wiesen meistens nur leichte Mutation in der Sekretionskassette nach, welche weder den Leserahmen (ORF), noch die Aktivität beeinflußten. Die Mutation des rekombinanten *L. lactis* (pSL-PL511ΔC) führte jedoch zu einem starken Anstieg der lytischen Aktivität. Bei dieser Mutation handelte es sich um die Deletion von 80 Aminosäuren, welches 24 % des C-Terminus entspricht. Die Beobachtung, daß Deletionen im C-Terminus von Bakteriophagen Endolysinen die lytische Aktivität erhöhen können ist nicht neu. Zwei *Staphylococcus aureus* Endolysine zeigten ebenfalls durch Deletionen (bis zu 75 %) im C-terminalen Bereich eine Steigerung ihrer Aktivität (GÄNG, 1995; LOESSNER et al., 1998). Es scheint, daß viele Zellwand lytische Enzyme von Bakterien und Bakteriophagen einen modularen Aufbau aufweisen. Dabei kann eine Unterteilung in eine katalytische und Binde-spezifische Domäne vorgenommen werden. Auch für die Endolysine Ply511 und Ply118 wird eine solche Einteilung vermutet. Dabei enthält der N-terminale Bereich die lytische Aktivität, wobei der C-Termiuns für die Bindung und Rezeptorerkennung verantwortlich ist. Warum jedoch die Deletionen zu einer erhöhten lytischen Aktivität führen, muß weiter analysiert werden. Jedoch bieten diese Erkenntnisse neue Möglichkeiten für die Optimierung lytischer Proteine modularem Aufbau.

4.2.3 Transformation der Fusion $_{SP}$*slp*A-*ply*118 führt zur Letalität

Die Fusion des Endolysins Ply118 mit $_{SP}$SlpA erfolgte nach dem gleichen Prinzip, wie die Konstruktion der Sekretionskassetten $_{SP}$*slp*A-$_{\Delta SP}$*nuc* und $_{SP}$*slp*A-*ply*511, die erfolgreich in *Lactococcus lactis* MG1363 transformiert wurden. Jedoch konnten keine *L. lactis* (pSL-PL118) Klone, welche aktives Ply118 exportierten, gefunden werden. Alle erhaltenen Transformanten zeigten sowohl schwere Mutationen in der Signalsequenz als auch im *ply*118 Gen. Da die Expression des Endolysins Ply118 in *Lactococcus* in dieser Arbeit gezeigt wurde, scheint die Translokation des Lysins durch die Zellwand und die damit verbundene Prozessierung toxisch für die Zellen zu sein. Obwohl die Zugabe der L-Alanyl-D-Peptidase von außen keine Lyse der Laktokokken Zellen herbeiführt (LOESSNER et al., 1995), scheint der direkte Kontakt mit der inneren Zellwand sich letal auf das Zellwachstum auszuwirken. Dies korreliert mit der Beobachtung, daß die intrazelluläre Synthese von Ply118 in *Lactococcus* weitaus geringer ist als in *E. coli* (LOESSNER et al., 1996). Die Toxizität, welche durch die Expression heterologer Proteine verursacht wird, wurde ebenfalls bei DROUAULT et al. (2000) beschrieben. In dieser Arbeit sollte die *Staphylococcus hyicus* Lipase unter der Kontrolle des Laktokokken Promotors

P32 in *Lactococcus lactis* exprimiert werden. Dies war jedoch nicht möglich. Erst als der konstitutive Promotor P32 durch den induzierbaren Promotor P*nisA* ersetzt wurde, konnten die entsprechenden Transformanten gewonnen werden. Ebenso ist der Export der β-Galaktosidase im Falle einer Überexpression in *E. coli* letal. (EMR und SILHAVY, 1980). Dabei wurde beobachtet, daß die β-Galaktosidase inkompatibel mit den Komponenten des Exportmechanismus ist. Aufgrund ihrer Konformation kommt es zu einer Blockade der Sekretionsmaschinerie, wobei andere lebensnotwendige Exportproteine ebenfalls nicht mehr sekretiert werden können (LEE et al., 1989). Um eine Sekretion des Ply118 in *Lactococcus* zu erreichen sollte das Endolysin unter der Kontrolle eines induktiven Promotors gestellt werden. Die Regulation könnte dann durch Promotoren erfolgen, welche durch die Zugabe von Laktose (PAYNE et al., 1995), Nisin (DE RUYTER et al., 1996) oder über Änderungen des pH- bzw Temperaturbereichs (ISRAELSON et al., 1995) induziert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Fusionierung gekürzter *ply*118-Fragmente mit dem Signalpeptid. Diese Methode führte bei der Sekretion der β-Galaktosidase zu einer reduzierten Hemmung der Exportmaschinerie (BENSON et al., 1984).

4.2.4 Einsatzmöglichkeit in der Industrie

Lactococcus lactis MG1363 (GASSON, 1983) wurde für Expressions- und Sekretionsstudien verwendet. Dieser plasmidfreie Stamm zeichnet sich durch das Fehlen der Zellwandgebundenen Serineprotease aus. Dadurch soll verhindert werden, daß heterologe Proteine proteolytisch verdaut werden. Jedoch ist der Stamm MG1363 nicht in der Lage Laktose zu verwerten. Dies ist jedoch notwendig um als Starterkultur in der Käseproduktion Verwendung zu finden. Daher wurde das Sekretionsplasmid pSL-PL511 in den Laktose-positiven Stamm *Lactococcus lactis* Bu2-129 transformiert. Mit diesem Stamm konnte aufgezeigt werden, daß die aktive Sekretion des Endolysins als auch die Produktion von Milchsäure möglich ist und somit beide Plasmide kompatibel sind. Für den Einsatz in Lebensmittel sollten genetisch veränderte Organismen jedoch keine Antibiotikaresistenzen besitzen. Sogenannte „food-grade“ Systeme wurden entwickelt, um auf diese Art der Selektion verzichten zu können. Dabei werden selektive Marker wie Nisin-Resistenz (FROSETH und MCKAY, 1992), Thymidylat-Synthase, das LacF Gen oder "Amber Suppressor" Mutanten in der Pyrimidin Biosynthese (SØRENSEN et al., 2000) eingesetzt. Um einer möglichen Instabilität des Vektors vorzubeugen kann der Vektor oder nur das gewünschte Gen in das Genom integriert werden. MARTÍN et al., (2000) entwickelte dabei ein

System, bei dem durch eine Integrase eine spezifische Integration ins Genom von Milchsäurebakterien stattfinden kann und durch eine β-Rekombinase unerwünschte Sequenzen (z.B. Antibiotikaresistenz) entfernt werden können.

4.3 Klonierung von *ply*118 in *P. camemberti*

4.3.1 Vektor pELN118

Für die Expression des Endolysins Ply118 in *Penicillium camemberti* wurde der Vektor pELN118 konstruiert. Da bis heute keine Transkriptionssignale aus *Penicillium camemberti* isoliert werden konnten, wurde zur Expression von *ply*118 der Vektor pELN5 verwendet. pELN5 besitzt den Promotor- und Terminationsbereich aus *Aspergillus nidulans*. Die Fähigkeit Transkriptions- und Translationselemente von anderen filamentösen Pilz Spezien zu erkennen, ist besonders in der Gruppe der Ascomycten weit verbreitet (GURR et al.,1987). Diese Erkenntnis wird seit langem für die Konstruktion von Expressions- und Sekretionsvektoren eingesetzt. So werden die Selektionsmarker Pyr4 (Orotidine 5'-P Decarboxylase) aus *Neurospora crassa* und AmdS (Acetamidase) aus *Aspergillus nidulans* für die Transformation vieler Pilze verwendet (BALANCE, 1991). Der starke Promotor der mitochondrialen Synthase Untereinheit 9 OliC31 (WARD und TURNER, 1986) besitzt alle klassischen Merkmale eines starken Pilz-Promotors. Eine TATA-Box und eine auffallende Pyrimidin reiche Region zwischen der TATA-Box und dem Transkriptionsstart wurden in ähnlicher Form bei stark exprimierten Hefen Genen gefunden. Deletionsanalysen im *trp*C Promotor aus *Aspergillus nidulans* haben gezeigt, daß sowohl die TATA Box als auch die Pyrimidin reichen Bereiche eine wichtige Rolle bei der Initiation der Transkription spielen (HAMER und TIMBERLAKE, 1987). Dabei wird angenommen, daß das Ausmaß der CT-reichen Region in direktem Zusammenhang mit der Stärke der Expression steht (LEGERTON und YANOFSKY, 1985). Weiterhin auffallend ist ein sich wiederholendes Hexamer (TCCATC), welches (jedoch in einfacher Kopienzahl) auch bei stark exprimierenden Genen filamentöser Pilze zu finden ist (KINNAIRD und FINCHAM, 1983; KOZAK, 1986). Die Basenfolge ATCACATG im Bereich des Transkriptionsstarts stimmt optimal mit der Konsensussequenz ATCACA/CATG überein, welche von 11 *Neurospora crassa* Genen abgeleitet wurde (LEGERTON und YANOFSKY, 1985). GEISEN (2000) exprimierte erfolgreich das *lac*Z von *Escherichia coli* in *Penicillium camemberti* unter der Kontrolle dieses Promotors. Ein weiterer

Vorteil von pELN5 ist die Replikation in *E. coli*, so daß die Konstruktion und Vermehrung von pELN118 zuerst in *Escherichia coli* durchgeführt werden konnte. Aufgrund dieser Merkmale wurde der Promotor des *oli*C31 Gens für die Expression des Endolysinsgens *ply*118 in *Penicillium* verwendet.

Für die weitere Optimierung der Expression wurde *ply*118 mit den ersten 12 Aminosäuren des Signalpeptids OliC31 N-terminal verknüpft. Diese Fusion führt zwar zu keiner Sekretion des Endolysins, jedoch wird angenommen, daß Genfusionen sich positiv auf die (Post)Translation wie z.B erhöhte Stabilität der mRNA und verminderter proteolytischer Abbau des heterologen Proteins, auswirken können (GOUKA et al., 1996; GOUKA et al., 1997).

Die Ko-Transformation des Expressionsvektors pELN118 und des Selektionsplasmids p3SR2 konnten ohne Probleme in *Penicillium camemberti* durchgeführt werden. Wie in anderen Arbeiten (GEISEN und LEISTNER, 1989; BERI und TURNER, 1987) beschrieben zeigte sich, daß *amd*S ein geeigneter Selektionsmarker für *Pencillium* darstellt. Die Analyse der chromosomalen DNA der rekombinanten *Penicillium* Klone ergab, daß von 12 Transformanten 4 das *ply*118 Gen integriert hatten. Jedoch lag die Effizienz der Transformation unter den Erwartungen. Normalerweise integrieren über 50 % der Transformanten beide Plasmide (PUNT et al., 1987; GEISEN, 1995). In dieser Arbeit konnte jedoch nur eine Transformationseffizienz von 25 % erreicht werden. Die Transformation bei Pilzen ist stark abhängig von der Inkubation der Protoplasten mit der DNA (GEISEN und LEISTNER, 1989). Unter diesen Umständen hätte eine längere Inkubation die Transformationseffizienz erhöhen können. Jedoch erzielten GEISEN und LEISTNER (1989) bei der alleinigen Transformation des Plasmids p3SR2 in *Penicillium nalgiovense* eine Transformationseffizienz von 12 Transformanten/µg DNA. Dies bestätigt somit das Ergebnis dieser Arbeit, wo ebenfalls 12 Transformanten/µg DNA erhalten wurden.

Der Southern Blot zeigt ebenfalls die Integration des Expressionsvektors pELN118 in das Pilzgenom. Auffallend ist, daß alle 4 Transformanten ein fast identisches Bandenmuster aufweisen (Transformant 2 zeigt eine zusätzliche Bande). Dies läßt vermuten, daß der Vektor pELN118 bei allen Transformanten in die gleichen Stellen des Genoms integriert. Anscheinend besitzen die Sequenzbereiche des Expressionsvektors aus *Aspergillus nidulans* Homologien zur genomischen DNA von *Penicillium camemberti*. Dabei sollten für die homologe Rekombination identische Bereiche von mindestens 500 bp vorliegen (GASSEN und MINOL, 1996)

4.3.2 Nicht nachweisbare Detektion des aktiven Endolysins Ply118

Mit Hilfe des Platten-Diffusions Test und Western Blotting wurde versucht die Produktion von rekombinantem Ply118 nachzuweisen. Die verwendeten polyklonalen Anti-Ply-Antikörper zeigten zuerst starke Kreuzreaktionen mit zahlreichen Pilzproteinen. Für den immunologischen Nachweis wurde Kaninchenserum mit Anti-Ply-Antikörper verwendet. Die starken Kreuzkontaminationen beruhten wahrscheinlich auf „Verunreinigungen“ des Serums mit Schimmelpilz-Antikörper, die durch den direkten Kontakt des Kaninchens durch Schimmelpilze im Futter und Einstreu entwickelt wurden. Eine zusätzliche chromatographische Aufreinigung führte zwar zur Reduktion unspezifischer Reaktionen, jedoch konnte kein Endolysin im Zytoplasma nachgewiesen werden. Der Nachweis der spezifischen mRNA konnte aber in allen vier Transformanten durch RT-PCR erbracht werden. Leider kann durch diese Methode keine Aussage über die quantitative Expression und die Stabilität der mRNA gemacht werden. Durch die RT-PCR konnte nur bewiesen werden, daß die Transkriptionssignale aus *Aspergillus nidulans* von *Penicillium camemberti* erkannt werden können.

Eine große Anzahl von Veröffentlichungen beschäftigt sich mit der Produktion heterologer Proteine in filamentösen Pilzen (FOWLER und BERKA, 1991; VAN DEN HONDEL et al., 1991). Dabei konnten nie Produktionsmengen erreicht werden, welche bei der Expression rekombinanter homologer Proteine erzielt werden. Die Probleme sind sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene zu finden. GOUKA et al. (1996) zeigte bei der Expression von homologen und heterologen Genen in *Aspergillus awamori*, daß nur die mRNA homologer Gene in hohen Konzentrationen vorliegt. Jedoch konnte durch eine N-terminale Fusion des heterologen Proteins mit der Glucoamylase (GlaA) aus *Aspergillus niger* die Stabilität der mRNA erhöht werden (GOUKA et al., 1997). Genauere Infornationen über den Status der Endolysin mRNA könnte nur die Durchführung eines Northern Blots liefern.

In einigen Fällen beeinflußte der Integrationsort des rekombinanten Gens die Expression. Dabei konnte gezeigt werden, daß keine Korrelation zwischen Anzahl der integrierten Gene und der produzierten Enzymmenge besteht. Jedoch konnte ein Zusammenhang hergestellt werden, ob Integrationen in einem Chromosom oder in sechs verschiedenen Chromosomen stattfanden (VERDOES et al., 1994). Auch bei erfolgreicher Transkription und Translation kann die Aktivität des Endolysins blockiert sein. Bei der Expression einer rekombinanten Aspartat Protease und Triglycerid Lipase konnte keine Aktivität nachgewiesen werden, da eine ungenügende Prozessierung der Proteine im Wirt stattfand (WARD und KODAMA, 1991). Ebenso wurde von Modifikationen der Proteine durch zu starke Glykosylierung berichtet (FLIPPHI et al., 1993;

JOUTSJOKI et al., 1993), die bei bestimmten Enzymen unter Umständen zur Inaktivierung führen können. Da keine Erfahrungen über die Expression von Bakteriophagen Enzymen in Eukaryoten vorliegen, könnte dies ebenfalls die Aktivität des Endolysin beeinflussen. Ein weiterer Grund für den negativen Nachweis des Ply118 Proteins könnte die Degradierung durch pilzeigene Proteasen sein. Der proteolytische Abbau ist die Hauptursache für die geringe Effizienz bei der Produktion heterologer Proteine in Pilzen (VERDOES et al., 1995; MACKENZIE et al., 1993; VAN GORCOM et al., 1994). Dabei spielen intrazelluläre als auch extrazelluläre Enzyme eine entscheidende Rolle. Bei *Aspergillus niger* konnte nachgewiesen werden, daß das Immunoglobulin bindende Protein (BiP), welches in die Proteinfaltung involviert ist, mit ungenügend gefalteten Proteinen interagiert. Es wird angenommen, daß BiP für den Abbau dieser Proteine zuständig ist (KNITTLER et al., 1995). Extrazelluläre Proteasen könnten beim Zellaufschluß proteolytisch das rekombinante Endolysin verdauen.

Die oben genannten Punkte sind Erklärungsversuche, weshalb das rekombinante Endolysin in *Penicillium* nicht nachweisbar war. Um die genauen Ursachen zu ergründen könnten weitere Experimente durchgeführt werden. Die ersten Schritte beinhalten eine quantitative Bestimmung der Endolysin mRNA und deren Stabilität. Da die Integration ins Genom die Transkription beeinflussen kann, wäre es von Vorteil Selektion und Expression in einem Vektor zu vereinigen um negative Genunterbrechungen zu reduzieren. Um einem proteolytischen Abbau durch Pilzproteasen vorzubeugen könnten Protease-negative Mutanten für die Expression verwendet werden (VAN DEN HOMBERGH et al., 1997). Durch Genunterbrechungen konnte die Expression der PEPA Protease in *Aspergillus niger* bis zu 20 % reduziert werden (BERKA et al., 1990) Ebenfalls konnten durch UV-Behandlung mehrere Mutanten isoliert werden, die eine reduzierte Protease Aktivität aufwiesen. Der Einsatz solcher Mutanten führte zu einer verbesserten Produktion heterologer Proteine. Auch über die Medienzusammensetzung könnte eine Reduktion von extrazellulären Proteasen erreicht werden (BARTLING et al., 1996). Für den Einsatz in der Milchindustrie sind jedoch Proteasen essentiell für die Textur und die Reifung eines Käses. So kann die Verwendung von Protease Mutanten nur für die Optimierung der Endolysin Expression verwendet werden, um dann dieses Konstrukt in eine Reifungskultur zu transformieren. Interessant wäre ebenfalls die Expression eines weiteren Endolysins. Vielleicht wäre Ply511 weniger anfällig für den proteolytischen Abbau, da unter Umständen die räumliche Struktur eines Proteins und so die Zugänglichkeit zu Proteaseerkennungstellen entscheidend sein können.

4.3.3 Endolysine als Biokonservierung - ein Ausblick

Die industrielle Revolution und die sich daraus resultierende Entwicklung der Lebensmittelindustrie erhöhte die Notwendigkeit der Lebensmittelkonservierung. Durch den Einsatz von Lebensmittel-Zusatzstoffen konnte die Haltbarkeit und die Qualität von Lebensmittel erhöht werden. In den letzten Jahren fordert der Konsument Alternativen zu chemischen Konservierungsmitteln und bevorzugt Lebensmittel mit hoher Qualität und geringer industrieller Bearbeitung. Dies erhöhte den Bedarf an Alternativen zu herkömmlichen Konservierungsmöglichkeiten. Eine Haltbarmachung von Lebensmitteln durch das antagonistische Wachstum von Bakterien wurde von HURD 1973 beschrieben. Dabei spielen Milchsäurebakterien und ihre Bakteriozine eine bedeutende Rolle. Nisin, welches von *Lactococcus lactis* produziert wird, ist in über 45 Ländern als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen (DELVES-BROUGHTON, 1990). Weitere Bakteriozine wie Pediocin A und Pediocin PA1 könnten das Potential dafür besitzen. Jedoch wurden viele Bakteriozin-Studien unter Laborbedingungen und nicht im Lebensmittel getestet. Im Medium Lebensmittel könnten viele Faktoren die Aktivität reduzieren. Viele Bakteriozine sind hydrophob und könnten von Fetten und Phospholipiden gebunden werden. Die Aktivität von Nisin wird durch zunehmende Fettkonzentration vermindert. Zwar kann durch den Zusatz von nichtionischen Emulgatoren wie Tween 80 eine Inaktivierung vermindert werden, jedoch nicht durch Lecithin (JUNG et al., 1992). Die meisten Bakteriozine hemmen oder töten verwandte Arten oder Stämme, so daß nicht nur unerwünschte Bakterien, sondern auch erwünschte Organismen wie z.B. Starterkulturen und Aromabildner gehemmt werden. Da Bakteriozine wie Nisin nur im sauren Bereich aktiv sind, ist ihr Einsatz nur auf gewisse Lebensmittel begrenzt. Ein Einsatz der Endolysine wäre eine neue Art der Biokonservierung. Die lytischen Enzyme Ply118 und Ply511 zeichnen sich durch ihre relative pH unabhängige und außerordentliche spezifische Aktivität aus. Durch ihren Einsatz könnten ganz gezielt *Listeria* Kontaminationen in Lebensmittel und Lebensmittelinhaltsstoffen bekämpft werden. Starter- und Reifungskulturen wären durch die Produktion von Endolysinen nicht betroffen. Im Gegensatz zu weiteren natürlichen Konservierungsstoffen wie organische Säuren und Bakteriozine sind bis heute keine Resistenzbildungen bei Endolysinen bekannt. Dagegen konnte MING und DAESCHEL (1995) spontane Resistenzen gegenüber Nisin beim *Listeria monocytogenes* ScottA nachweisen.

Jedoch zum letztendlichen Einsatz in der Lebensmittelindustrie müssen noch viele experimentelle Hürden überwunden werden. Die Stabilität des Sekretionsvektors sowie die Konstruktion eines lebensmittelgerechten Sekretionssystems müssen untersucht werden.

Inwieweit Endolysin produzierende Laktokokken tatsächlich *Listeria* Zellen im Weichkäse inhibieren können, wird zur Zeit am FML Weihenstephan , Institut für Mikrobiologie überprüft.
Die Expression und Sekretion der Endolysine in Starterkulturen konnte nur mit Hilfe der Gentechnik ermöglicht werden. Für den Einsatz dieser gentechnisch veränderter Mikroorganismen fehlt zur Zeit die gesetzliche Grundlage sowie die allgemeine Akzeptanz des Verbrauchers. Können dem Verbraucher jedoch klare gesundheitliche und ernährungphysiologische Vorteile durch solch gentechnisch veränderte Produkte aufgezeigt werden, steigt die Akzeptanz und die Kaufbereitschaft (VERRIPS und VAN DEN BERG, 1996).

5 LITERATURVERZEICHNIS

Archer, D.B., I.N. Roberts und D.A. MacKenzie. 1990. Heterologous protein secretion from *Aspergillus niger* in phosphate-buffered batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:313-315

Ballance, D.J. 1991. Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. In: S.A. Leong und R.M. Berka (Hrgb). Molecular industrial mycology: systems and applications for filamentous fungi. S. 1-29. N.Y., Marcel Dekker.

Bartling, S., J.P.T.W. van den Hombergh, O. Olsen, D. von Wettstein und J. Visser. Expression of an *Erwinia* pectate lyase in three species of *Aspergillus*. 1996. Curr. Genet. 29: 474-481

Batt, C. 1999. *Listeria* not gone, not forgotten. Food Microbiology. 16: 103

Benson, S.A., E. Bremer und T.J. Silhavy. 1984. Intragenic regions required for LamB export. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 3830-3834

Berka, R.M., M Ward, L.J. Wilson, K.J. Hayenga, K.H. Kodama, L.P. Carlomagno und S.A. Thompson. 1990. Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori***.** Gene. 86: 153-162

BgVV. (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin**).** 1999. Listerien-Infektionen vermeiden. Pressedienst: 03/99

Broekhuijsen, M.P., I.E. Mattern, R. Contreras, J.R. Kinghorn und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1993. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. J. Biotechnol. 31:135-145

Broome-Smith, J.K., M. Tadayyon und Y. Zhang. 1990. β-Lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. Mol. Microbiol. 4:1637-1644

Bruand, C., S. Ehrlich und L. Jannière. 1991. Unidirectional theta replication of the structurally stable *Enterococcus faecalis* plasmid pAMβ1. EMBO J. 10:2171-2177

Buxton, F.P., D.I. Gwynne und R.W. Davies. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* using the *arg*B gene of *Aspergillus nidulans*. Gene. 37:207-214

Callegari, M.L., B. Riboli, J.W. Sanders, P.S. Cocconcelli, J. Kok, G. Venema, L. Morelli. 1998. The S-layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892. cloning, sequence and heterologous expression. Microbiol. 144:719-726

Carpenter, S.L. und M. Sevoian. 1983. Cellular immune response to Marek' Desease: listeriosis as a model of study. Avian Dis. 27:344-356

Champell, A. 1977. Defective bacteriophages and incomplete prophages. In: Comprehensive Virology, S. 259-328. Fraenkel-Conrat, Wagner (Hrsg.), Plenum Press, London

Chopin, A., M.C. Chopin, A. Moillo-Batt und P. Langella. 1984. Two plasmid-determined restriction systems in *Streptococcus lactis*. Plasmid. 11:260-263

Dalton, C.B., C.C. Austin, J. Sobel, P.S. Hayes, W.F. Bibb, L.M. Graves, B. Swaminathan, M.E. Proctor und P M. Griffin. 1997. An outbreak of *Listeria monocytogenes* in milk. N. Engl. J. Med. 336:100-105

David, S., M.E. van der Rest, A.J.M. Driessen, G. Simons und W.M. de Vos. 1990. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *Lactococcus lactis* citrat permeasen gene. J. Bacteriol. 172:5789-5794

De Ruyter, P.G.G.A., O.P. Kuipers und W.M. de Vos. 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. Appl. Environ. Microbiol. 62:3662-3667

De Ruyter, P.G., O.P. Kuipers, W.C. Meijer und W.M. de Vos. 1997. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. Nat. Biotechnol. 15:976-979

De Vos, W.M., P. Vos, G. Simons und S. David. 1989. Gene organization and expression in mesophilic lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 72:3398-3405

De Vos, W.M., P. Vos, P. de Haard, I. Boerriger. 1989. Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. Gene. 85: 169-179

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technol. 44: 100-117

Dijkstra, R.G. 1971. Investigations in the survival times of *Listeria* bacteria in suspensions of brain tissue, silage and faeces and in milk. Zbl. Bakteriol. I. Abt. Orig. 216: 92-95

Drouhault, S., G. Corthier, S.D. Ehrlich und P. Renault. 2000. Expression of the *Staphylococcus hyicus* lipase in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 588-598

Dunn-Coleman N.S, E.A. Bodie, G.L. Carter und G.L. Armstrong. 1992. Stability of recombinant strains under fermentation conditions. In: J.R. Kinghorn und G. Turner (Hrgb). Applied molecular genetics of filamentous fungi. S. 152-174. BlackieGlasgow

Dunn-Coleman, N.S., P. Bloebaum, R. Berka, E. Bodie, N. Robinson, G. Armstrong, M. Ward, M. Przetak, G.L. Carter, R. LaCost, L.J. Wilson, K.H. Kodama, E.F. Baliu, B. Bower, M. Lamsa und H. Heinsohn. 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. Bio/Technology 9: 976-981

Emr, S.D. und T.J. Silhavy. 1980**.** Mutations affecting localization of an *Escherichia coli* outer membrane protein, the bacteriophage lambda receptor. J. Mol. Biol. 141: 63-90

Engelke, G., Z. Gutowski-Eckel, M. Hammelmann und K.D. Entian. 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membran localization of the NisB protein. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3730-3743

Farber, M.J. und P.I. Peterkin. 1991 *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55: 476-511

Fath, M.J. und R. Kolter. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. Microbiol. Rev. 57: 995-1017.

Flipphi, M.J.A., J. Visser, P. van der Veen, L.H. de Graaff. 1993. Cloning of the *Aspergillus niger* gene coding α-L-arabinofuranosidase A. Appl. Environ. Microbiol. 39: 335-340

Fowler, T. und R.M. Berka. 1991. Gene expression systems for filamentous fungi. Curr. Opin. Biotechnol. 2:691-697

Fremaux, C., C. Ahn und T.R. Klaenhammer. 1993. Molecular analysis of the lactacin F operon. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3906-3915

Gaeng, S., S. Scherer, H. Neve und M.J. Loessner. 2000. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2951-2958

Gaier, W., R.F. Vogel und W.P. Hammes. 1992. Cloning and expression of the lysostaphin gene in *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus casei*. Lett. Appl. Microbiol. 14: 72-76

Gäng, S. 1995. Identifizierung, Klonierung und Sequenzierung der Endolysingene aus zwei *Staphylococcus aureus* Bakteriophagen. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Gasson, M.J. und G.F. Fitzgerald. 1994. Gene transfer systems and transposition. In: Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Hrgb: Gasson, M.J. und W.M. de Vos. S. 1-51. London: Blackie Academic and Professional.

Gasson, M. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol. 154: 1-9.

Geisen, R. 1995. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Penicillium nalgiovense*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 322-325

Geisen, R. 2000. persönliche Mitteilung

Geisen, R. pELN5 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Geisen zur Verfügung gestellt. Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Institut für Hygiene und Toxikologie, Karlsruhe

Geisen, R. und L. Leistner. 1989. Transformation of *Penicillium nalgiovense* with the *amd*S gene of *Aspergillus nidulans*. Curr. Genet. 15: 307-309

Geisen, R., **E. Glenn und L. Leistner.** 1989. Production and regeneration of protoplasts from *Penicillium nalgiovense*. Lett. Appl. Micorbiol. 8: 99-100

Gold, L. 1988. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. Ann. Rev. Biochem. 57:199-233

Gouin, E., J. Mengaud und P. Cossart. 1994. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a non-pathogenic species. Infect. Immun. 62: 3550-3553

Gouka, R.J., P.J. Punt und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1997. Glucoamylase gene fusion alleviate limitations für protein production in *Aspergillus awamori* at the transcriptional and (post)translational levels. Appl. Environ. Microbiol. 63: 488-497

Gouka, R.J., P.J. Punt, J.G.M. Hessing und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1996. Analysis of heterologous proteins production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1951-1957

Gurr, S.J., S.E. Unkles und J.R. Kinghorn. 1987. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In Gene Structure in Eukaryotic Microbes, Hrgb. Kinghorn, J. R. Seite: 93-162

Hager, P.W. und J.C. Rabinowitz. 1985. Translation specificity in *Bacillus subtilis*. In: The molecular biology of the bacilli. Hrgb. Dubnau, D A., Vol II, Seite 1-31, Academic Press, Orlando, FL.

Hamer, J.E. und W.E. Timberlake. 1987. Functional organisation of the *Aspergillus nidulans trp*C promotor. Mol. Cell. Biol. 7: 2352-2359

Havarstein, L.S., H. Holo und I.F. Nes. 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptide that are common among peptide bacteriocines produced by gram-positive bacteria. Microbiology 140:2383-2389

Henry, B.S. 1933. Dissociation in the genus *Brucella*. J. Infect. Dis. 52: 374-402

Hof, **H.** 1999. Listeriose. Was Ärzte über Infektionsrisiken und Erkrankung wissen sollten. 42: 558-561. In Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz. Springer-Verlag

Hoffmann, C.S. und A. Wright. 1985. Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studying protein secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5107-5111

Hols, P., A. Baulard, D. Garmyn, B. Delplace, S. Hogan und J. Delcour. 1992. Isolation and characterization of genetic expression aud secretion signals from *Enterococcus faecalis* through the use of broad-host-range α-amylase probe vectors. Gene. 118:21-30

Holzapfel, W.H., R. Geisen und U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. 24: 343-362

Horn, N., M.I. Martínez, J.M. Martínez, P.E. Hernández, M.J. Gasson, J.M. Rodríguez und H.M. Dodd. 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. Appl. Environ. Microbiol. 64: 818-823

Hurst, A. 1973. Microbial antagonism in foods. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6: 80-90

Hynes, M. J., C. M. Cormick und J. A. King. 1983. Isolation of genomic clones containing the amdS of *Aspergillus nidulans* and their use in the analyses of structural and regulatory mutations. Mol. Cell. Biol. 3:1430-1439

Israelson, H., S.M. Madsen, A. Vrang, E.B. Hansen und E. Johansen. 1995**.** Cloning and partial characterization of regulated promotors from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promotor probe vector, pAK80. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2540-2547

Izard, J.W. und D.A. Kendall. 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promotors. Mol. Microbiol. 13: 765-773

Jaquet, Ch., B. Catimel, V. Goulet, A. Lepoutre, P. Veit, P. Dehaumont und J. Rocourt. 1995. Typing of *Listeria monocytogenes* during epidemiological investigations of the French listeriosis outbreaks in 1992, 1993 and 1995. Proceeding of XIIth International Symposium on Problems of Listeriosis, Perth, Western Australia, October 2-6, Seite: 161-176

Joutsjoki, V.V., T.K. Torkkeli, K.M. Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the Hormoconis resinae glucoamylase P (*gam*P) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. 24: 223-228

Kahala, M. und A. Palva. 1999. The expression signals of the *Lactobacillus brevis slp*A gene efficient heterologous protein production in lactic acid bacteria. Appl. Microbiol Biotechnol. 51: 71-78

Kelly, J.M. und M.J. Hynes. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amd*S gene of *Aspergillus nidulans*. EMBO J. 4: 475-479

Kiewiet, R., J. Kok, J.F.M.L. Seegers, G. Venema und S. Bron. 1993. The mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 358-364.

Kinnaird, J.H. und J.R.S., Fincham. 1983. The complete nucleotide sequence of *Neurospora crassa am* (NADP specific Glutamate Dehydrogenase) gene. Gene. 26: 253-260.

Kittson, E. 1992. A case cluster of listeriosis in Western Australia with link to pâté consumption. Proc. XIth International Symposium on Problems of listeriosis, Copenhagen, Mai 11-14, Seite: 39-40

Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39-85

Kluge, R.M. 1990. Listeriosis - problems and therapeutic options- Leading article. Journal of Antimicrobioal Chemotherapy. 25: 887-890

Knittler, M.R., S. Dirks und I.G. Haas. 1995. Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acd. Sci. USA 92: 1764-1768

Koivula, T., I. Palva und H. Hemilä. 1991. Nucleotide sequence of the *sec*Y gene from *Lactococcus lactis* and idenfication of conserved regions by comparison of four SecY proteins. FEBS Lett. 288: 114-118

Kok, J., K.J. Leenhouts, A.J. Haandrikman, A.M. Lederboer und G. Venema. 1988. Nukleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol. 54: 231-238

Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eucaryotic ribosomes. Cell 44: 283-292

Kurland, C.G. und H. Dong. 1996. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. Mol. Microbiol. 21: 1-4

Langella, P. und Y. Le Loir. 1999. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. Braz. J. Med. Res. 32: 191-198

Le Loir, Y., A. Gruss, S.D. Ehrlich und P. Langella. 1994. Direct screening of recombinants in gram-positiv bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. J. Bacteriol. 176: 5135-5139

Lee, C., P. Li, H. Inouye, E.R. Brickman und J. Beckwith. 1989. Genetic studies on the inability of β-Galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. J. Bacteriol. 171: 4609-4616

Legerton, T.L. und C. Yanofsky. 1985. Cloning and characterization of the multifunctional *his*-3 gene of *Neurospora crassa*. Gene. 39: 129-140

Loessner, M.J., A. Schneider und S. Scherer. 1996. Modified *Listeria* bacteriophage lysin genes (*ply*) allow efficient overexpression and one-step purification of biochemically active fusion proteins. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3057-3060

Loessner, M.J. 1991. *Listeria* Bakteriophagen: Isolierung, Charakterisierung und Anwendung in der Phagentypisierung. Dissertation. Bakteriologisches Institut, SVFM, Technische Universität München-Weihenstephan.

Loessner, M.J. und M. Busse. 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1912-1918

Loessner, M.J., G. Wendlinger und S. Scherer. 1995. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. Mol. Microbiol. 16: 1231-1241

Loessner, M.J., S. Gaeng, G. Wendlinger, S.K. Maier und S. Scherer. 1998. The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: a large TTG-start holin and an associated amidase endolysin. FEMS Microbiol. Lett. 162: 265-274

Loessner, M.J., **S.K. Maier, H. Daubek-Puza, G. Wendlinger und S. Scherer.** 1997. Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. J. Bacteriol. 179: 2845-2851

Lossner, M.J., S. Gaeng und S. Scherer. 1999. Evidence for holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. J. Bacteriol. 181: 4452-4460

Marrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichi coli*. Microbiol. Rev.. 60: 512-538

Martín, M.C., J.C. Alonso, J.E. Suárez und M.A. Alvarez. 2000. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2599-2604

Marugg, J.D., C.F. Gonzalez, B.S. Kunka, A.M. Ledeboer, M.J. Pucci, M.Y. Toonen, S.A. Walker, L.C.M. Zoetmulder und P.A. Vandenbergh. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2360-2367

Mayo, B., J. Kok, K. Veneman, W. Bockelmann, M. Teuber, H. Reineke und G. Venema. 1991. Molecular cloning and sequences analysis of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 38-44.

Mazulli, T. und I.S. Salit. 1991. Pleural fluid infection cause by *Listeria monocytogenes*: cases and review. Rev. Infect. Dis. 4: 564-570

McCormick, J.K., T.R. Klaenhammer und M.E. Stiles. 1999. Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 29: 37-41

Ming, X. und M.A. Daeschel. 1995. Correlation of cellular phospholipids content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Prot. 56: 944-948

Neve, H., A. Geis und M. Teuber. 1987. Conjugation, a common plasmid transfer mechanism in lactic acid bacteria streptococci of dairy starter cultures. System. Appl. Microbiol. 9: 151-157.

Nyyssönen, E. und S. Keränen. 1995. Multiples roles of the celluslase CBHI in enhancing production of fusion antibodies by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. 28: 71-79

O'Sullivan, T.F. und G.F. Fitzgerald. 1999. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. J. Appl. Microbiol. 86: 275-283

Otto, R., W.M. de Vos und J. Gavrieli. 1982. Plasmid DNA in *Streptococcus cremoris* Wg2: influence of pH on selection in chemostats of a varient lacking a protease plasmid. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1272-1277.

Payne, J., C.A. MacCormick, H.G. Griffin und M.J. Gasson. 1995. Exploitation of a chromosomally integrated lactose operon for controlled gene expression in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol. Lett. 136: 19-24

Penalva, M.A., A. Tourino, C. Patino, F. Sanchez, F. Fernandez, J.M. Sousa und V. Rubio. 1985. Studies on transformation of *Cephalosporium acremonium*. In Molecular genetics of filamentous fungi, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 34, Timberlake, W. E., ed., A. R. Liss, New York, Seite: 59-68

Perez-Martinez, G., J. Kok, G. Venema, J.M. van Dijl, H. Smith und S. Bron. 1992. Protein export elements from *Lactococcus lactis*. Mol. Gen. Genet. 234: 401-411

Platteeuw, C., G. Simons und W.M. de Vos. 1994. Use of the *Escherichia coli* β-Glucuronidase (*gus*A) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 60: 587-593

Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 57: 50-108

Punt, P.J., R.P. Oliver, M.A. Dingemanse, P.H. Pouwels und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1987. Transformation of *Aspergillus* based in the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. Gene 56: 117-124

Riviera, L., F. Dubini und M.G. Bellotti. 1993. *Listeria monocytogenes* infections: the organism, its pathogenicity and antimicrobioal drugs susceptibility. Microbiologica. 16: 189-204

Rocourt, J. und P. Cossart. 1997. *Listeria monocytogenes*, S. 337-352. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat und T. j. Montville (Hrgb.), Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers, ASM Press, Washington D.C.

Ryser, E.T. 1999. Foodborn Listeriosis. Seite: 299-358. In. Ryser, E. T. und E. H. Marth (Hrgb.) *Listeria*, Listerosis and Food Safety, Marcel Dekker Inc. New York.

Sanders, J.W., G. Venema und J. Kok. 1997. A chlorid-inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4877-4882

Satho, E., Y. Ito, Y. Sasaki und T. Sasaki. 1997. Application of the extracellulare α-amylase gene from *Streptococcus bovis* 148 to construction of a secretion vector for yogurt starter strains. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4593-4596

Savijoki, K., M. Kahala, A. Palva. 1997. High level heterologous protein production in *Lactococcus* and *Lactobacillus* using a new secretion system based on the *Lactobacillus brevis* S-layer signals. Gene. 186: 255-262

Schillinger, U., R. Geisen und W.H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends Food Sci. Technol. 7: 158-164

Schleifer, K.-H. und R. Kilpper-Bälz. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: A review. Syst. .Appl. Microbiol. 10: 1-19

Schleifer, K.-H., 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Re. 46: 201-203

Schleifer, K.-H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Bälz, M.D. Collins und W. Fischer. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. 6: 183-195

Seeliger, H.P.R. 1961. Listeriosis. Karger Verlag, Basel

Seeliger, H.P.R. und D. Jones. 1986. *Listeria*, Seite:1235-1245. In P. H. A. Sneath, N .S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holt (Hrgb), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 2, 8 Auflage, Williams & Wilkins, Baltimore, USA

Simonen, M. und I. Palva. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol. Rev. 57: 109-137

Simons, G., G. Rutten, M. Hornes, M. Nijhuis und M. van Asseldonk. 1992. Production of prochymosin in lactococci. Adv. Exp. Med. Biol. 306: 115-120

Sørensen, K.I., R. Larsen, A. Kibenich, M.P. Junge und E. Johansen. 2000. A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1253-1258

Steidler, L., J.M. Wells, A. Raeymaekers, J. Vandekerckhove, W. Fiers und E. Remault. 1995. Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1627-1629

Steidler, L., J. Viaene, W. Fiers und E. Remaut. 1998. Functional display of a heterologous protein on the surface of *Lactococcus lactis* by means of the cell wall anchor of *Staphylococcus aureus* protein A

Stoddard, G.W., J.P. Petzel, M.J. Belkum, J. Kok und L.L. McKay. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1952-1961

Van Asseldonk, M.W.M. de Vos und G. Simons. 1993. Functional analysis of the *Lactococcus lactis usp*45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous α-amylase. Mol. Gen. Genet. 240: 428-434

Van de Guchte, M, F.J. van der Wal, J. Kok und G. Venema. 1992. Lysozyme expression in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 216-224

Van de Guchte, M, J. Kodde, J.M.B. van der Vossen, J. Kok und G. Venema. 1990. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2606-2611

Van de Guchte, M, J.M.B. van der Vossen, J. Kok und G. Venema. 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expresssion of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 224-228

Van den Hombergh, J.P.T.W., P.J.I. van de Vonervoort, L. Fraissinet-Tachet und J. Visser. 1997. *Aspergillus* as a host of heterologous protein production: the problem of proteases. Trends Biotechnol. 15: 256-263

Van den Hondel, C.A.M.J.J., P.J. Punt, und R.F.M. van Gorcom. 1991. Heterologous gene expression in filamentous fungi. In J.W. Bennett und L. L. Lasure (Hrgb.), More gene manipulations in fungi. Academic Press, San Diego, Calif. Seite: 396-428

Van der Vossen, J.M.B.M., J. Kok und G. Venema. 1985. Construction of cloning, promotor screening- and terminator screening shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 50: 540-542

Van Gorcom, R.F.M., P.J. Punt und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1994. Heterologous gene expression in *Aspergillus*. Seite: 241-250. In K. A. Powell (Hrgb). The genus *Aspergillus* Plenum Press, New York

Verdoes, J.C., A.D. Diepeningen, P.J. Punt, A.J.M.Debets, A.H. Stouthamer und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1994. The effect of multiple copies of the upstream region of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene on expression. Gene. 145: 179-187

Verdoes, J.C., P.J. Punt und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1995. Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 195-205

Verdoes, J.C., P.J. Punt, J.M. Schrickx, H.W. van Verseveld, A.H. Stouthamer und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1993. Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the *gla*A gene. Transgenic Res. 2: 84-92

Verrips, C.T. und D.J. van den Berg. 1996. Barriers to application of genetically modified lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 70: 299-316

Von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acid Res. 14: 4683-4690

Ward, M. und G. Turner. 1986. The ATP synthase subunit 9 gene of *Aspergillus nidulans*: sequenze and transcription. Mol. Gen. Genet. 205: 331-338

Ward, M. und K. H. Kodoma. 1991. Introduction to fungal proteinases and expression in fungal systems. In: Dunn B. M. (Ed) Advances in experimental medicine and biology. Plenum, New York. S. 306 : 149-160

Ward, P.P., C.S. Piddington, G.A. Cunningham, X. Zhou, R.D. Wyatt und O.M. Conneely. 1995. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. Biotechnology 13: 498-503

Waterfield, N.R., R.W.F. Le Page, P.W. Wilson und J.M. Wells. 1995. The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis.* Gene. 165: 9-15

Wells, J.M., P.W. Wilson, P.M. Norton und R.W.F. Le Page. 1993. A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3954-3959

Wendlinger, G. 1995. *Listeria*-Bakteriophagen: Molekulare Aspekte der Wirtszellenerkennung und der enzymatischen Zellwandlyse. Dissertation. Institut für Mikrobiologie, FML, Technische Universität München-Weihenstephan.

Wiliams, A.M., J.L. Fryer und M.D. Collins. 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov: a new *Lactococcus* species from salmonid fish. FEMS Microbiol. Lett. 68: 109-114

Worobo, R.W., T. Henkel, M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas und M.E. Stiles. 1994. Charcteristics and genetic deteminant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A. produced by *Carnobacterium pisicola*. Microbiology. 140: 517-526

Worobo, R.W., M.J. van Belkum, M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas und M.E. Stiles. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. J. Bacteriol. 177: 3143-3149

Yelton, M.M., W.E. Timberlake und C.A.M.J.J. van den Hondel. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trp*C plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474

Young, R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanisms and regulation. Microbiol. Rev. 56: 430-481

Young, R. und U. Bläsi. 1995. Holins: form and function in bacteriophage lysis. FEMS Microbiol. Rev. 17: 191-205

6 ANHANG

Anhang I: Sequenzen, der drei *Lactococcus* Promotoren P21, P32 und P59, sowie die ersten Nukleotide des *ply*118-Gens. **Fett**: Restriktionsschnittstellen; unterstrichen: Ribosomale Bindestelle; *kursiv* und unterstrichen: -10 bzw. die -35 Box der Promotoren.

P21 5'→3'

*Xba*I

AAGCTGGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCGC TCTAGAAGAA AATACACTAA CCAAAGAAGC

GCGTAATATC AGGGTTTAAG AGACAATAAG AAAAAAAGAT TGAAAAAGTG ACATTAAATT

-35

***CTTGACAG*GG AGAGATAGGT TTGA*TAGAAT A*TAATAGTTG TCGCGAGAGA CGAGCGTTGA**

*Bam*HI *Eco*RI

AGCGCGACAA GCTAGACCAT TGAAAACTGA ATAAAGGGAT CCCCCGGGCT GCAGGAATTC

RBS *ply*118

TGGAGGATTA AAATGACAAG TTATTATTAT AGTAGAAGTT TAGCGAATGT AAATAAGTTA

P32 5'→3'

*Xba*I

AAGCTGGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCGC TCTAGAATAG TTTTAGCTAT TAATCTTTTT

TTATTTTTAT TTAAGAATGG CTTAATAAAG CGGTTACTTT GGATTTTTGT GAGCTTGGAC

-35 *Bam*HI

***TAGAAA*AAAA CTTCACAAAA TG*CTATACTA* GGTAGGTAAA AAAATATTCG GGATCCCCCG**

*Eco*RI RBS

GGCTGCAGGA ATTCTGGAGG ATTAAAATGA CAAGTTATTA TTATAGTAGA AGTTTAGCGA

P59 5'→3'

*Xba*I

AAGCTGGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCGC TCTAGACAAA TCCCACACTC TATCGTCAAA

CAATTTCAAA ATTTATGAAG ACTTATAATC CGTAATTTAT TGACTTTTAT ATCAGTGATT

-35

TATGAGTTTT TT*CTTGACA*G AAGAAGGCGA AAAATG*GTAT TA*TATTTAGG TACTGTTTTG

*BamH*I *Eco*RI

CGGTGGTGGC GGAATTGGCA GACGCGCAGG ATTAAGGGAT CCCCCGGGCT GCAGGAATTC

RBS *ply*118

TGGAGGATTA AAATGACAAG TTATTATTAT AGTAGAAGTT TAGCGAATGT AAATAAGTTA

Anhang II: Dargestellt sind die Nukleotid- und Aminosäurensequenz der Fusion zwischen $_{SP}$*slp*A und *ply*511 bzw Δ_{SP}*nuc*. Von den Genen *ply*511 und Δ_{SP}*nuc* sind nur die ersten 30 Nukleotide bzw. 10 Aminosäuren dargestellt. Die Pfeile markieren den Start von *slp*A und *ply*511 bzw Δ_{SP}*SPnuc*. **Fett**: Restriktionsschnittstellen

$_{SP}$*slp*a-*ply*511

*Pst*I $_{SP}$*slp*A

CTG CAG TGG AGG ATT AAA ATG CAA TCA AGT TTA AAG AAA TCT CTT TAC TTG

Leu Gln Trp Arg Ile Lys Met Gln Ser Ser Leu Lys Lys Ser Leu Tyr Leu

GGC CTT GCC GCA TTG AGC TTT GCT GGT GTT GCT GCC GTT TCA ACG ACT GCT

Gly Leu Ala Ala Leu Ser Phe Ala Gly Val Ala Ala Val Ser Thr Thr Ala

*Aat*II *ply*511

TCA GCT AAG ACG TCT GTA AAA TAT ACC GTA GAC AAG AAA ATT ATT

Ser Ala Lys *Thr Ser* Val Lys Tyr Thr Val Glu Asn Lys Ile Ile

*slp*A-Δ_{SP}*nuc*

*Pst*I $_{SP}$*slp*A

CTG CAG TGG AGG ATT AAA ATG CAA TCA AGT TTA AAG AAA TCT CTT TAC TTG

Leu Gln Trp Arg Ile Lys Met Gln Ser Ser Leu Lys Lys Ser Leu Tyr Leu

GGC CTT GCC GCA TTG AGC TTT GCT GGT GTT GCT GCC GTT TCA ACG ACT GCT

Gly Leu Ala Ala Leu Ser Phe Ala Gly Val Ala Ala Val Ser Thr Thr Ala

*Aat*II Δ_{SP}*nuc*

TCA GCT AAG ACG TCT GAT CCA ACA GTA TAT AGT GCA ACT TCA ACT

Ser Ala Lys *Thr Ser* Asp Pro Thr Val Tyr Ser Ala Thr Ser Thr

LEBENSLAUF

Name	Susanne Gäng
Geburtsdatum	27. Dezember 1968
Geburtsort	Biberach an der Riss
Familienstand	ledig

1975 - 1979	Mittelberg Grundschule in Biberach/Riss
1979 - 1985	Dollinger-Realschule in Biberach/Riss Abschluß: Mittlere Reife
1985 - 1988	Berufliches Gymnasium der dreijährigen Aufbauform an der Matthias-Erzberger Schule in Biberach/Riss Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
10/1988 - 07/1989	tudium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/1989 - 07/1995	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Abschluß als Diplom-Biologin Univ.
10/1995 - 3/1999	Dissertation bei Prof. Dr. S. Scherer als wissenschaftliche Angestellte am Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München in Freising.
10/1996 - 12/1998	Aufbaustudiengang Biotechnologie an der Technischen Universität München; Abschluß: Biotechnologin
seit Februar 2000	Wissenschaftliche Angestellte am Internationalen Nestlé-Forschungszentrum in Lausanne (Schweiz)

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer am Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München, angefertigt.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für sein Interesse an meiner Arbeit und die sehr angenehme und persönliche Betreuung als Doktorvater bedanken.

Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer (Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München), möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferates sehr danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. habil. Martin J. Loessner für die hilfreichen Diskussionen, die Betreuung und Durchsicht dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ralf Zink für die wertvollen Ratschläge, die kritische Durchsicht der Arbeit und die Freundschaft, die er mir in dieser nicht ganz einfachen Zeit entgegenbrachte.

Dr. habil. Rolf Geisen (Institut für Hygiene und Toxikologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe) danke ich für die lehrreiche Zeit in Karlsruhe und die freundliche Hilfestellung bei meiner Arbeit mit Schimmelpilzen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie am FML Weihenstephan für die freundliche und oft so lustige Zeit bedanken. Die große Hilfsbereitschaft und die herzliche Atmosphäre haben einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigesteuert.

Meine tiefste Dankbarkeit gehört meiner Familie. Nur durch den Rückhalt und die ständige Bereitschaft für mich da zu sein, konnte ich diese Arbeit beenden.

Zuletzt bedanke ich mich bei Hanspeter, der all die Zeit an meiner Seite stand und immer an mich geglaubt hat.