

**„Identifikation des Gruppe I Introns *CDIS1* in offenen Leserastern
des *Clostridium difficile* Genoms und dessen Charakterisierung als
chimäres genetisches Element“**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Markus Mehlig

geboren in
Bingen/Rhein

Mainz, den 10.12.2002

Datum der mündlichen Prüfung: 04.12.2002

Im Andenken an Dr. rer. nat. Dieter Mehlig

Bei der elektronischen Version der Dissertation ist die Verwendung personenbezogener Daten bei der Danksagung aus Gründen des Datenschutzes untersagt. Die an dieser Stelle in der gedruckten Version vorhandene Danksagung ist daher leider gelöscht.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 <i>Clostridium difficile</i> und Große Clostridiale Zytotoxine (LCTs)	1
1.1.1 Allgemeine Charakteristika der Spezies <i>C. difficile</i> und ihrer Toxine	1
1.1.2 Klassifizierung der LCTs und Darstellung der enzymatischen Aktivität	2
1.2 Eigenschaften von mit <i>C. difficile</i> assoziierten mobilen genetischen Elementen	2
1.2.1 Insertionselemente, Transposons und Introns als mobile genetische Elemente	2
1.2.2 „Infektiöse Introns“ und <i>C. difficile</i>	4
1.2.3 Charakteristika von Gruppe I und Gruppe II Introns	5
1.2.3.1 Spleißmechanismus und Aufbau von Gruppe I Introns	5
1.2.3.2 Spleißmechanismus und Aufbau von Gruppe II Introns	7
1.3 Die Bedeutung von Introns in der Evolution	9
1.3.1 Die Diskrepanz zwischen der „Introns early“ und „Introns late“ Theorie	9
1.3.2 Sichtweise gemäss der „Introns early“ Theorie	10
1.3.3 Sichtweise gemäss der „Introns late“ Theorie	11
1.3.4 Ein neuer Blickwinkel in der „Introns early“ und „Introns late“ Debatte	11
1.4 Fragestellung	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.2.2 Enzyme	14
2.2.3 Vektoren	14
2.2 Bakterienstämme	15
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme	15
2.2.2 <i>Clostridium difficile</i> Stämme	15

2.2.3 Vertreter anderer clostridialer Spezies und <i>Bacillus subtilis</i>	15
2.3 Arbeiten mit Bakterien	16
2.3.1 Kulturmedien und Anzucht von Clostridien	16
2.3.2 Kulturmedien und Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	17
2.3.3 Herstellung kompetenter Bakterien	17
2.3.3.1 Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen	17
2.3.3.2 Herstellung von kompetenten <i>B. subtilis</i> Zellen	18
2.3.4 Transformation von Bakterien	18
2.3.4.1 Transformation in <i>E. coli</i> über Elektroporation	19
2.3.4.2 Transformation in <i>B. subtilis</i>	19
2.3.5 Transkonjugation von <i>B. subtilis</i> zu <i>C. difficile</i>	20
2.4 Arbeiten mit DNA	21
2.4.1 Präparation von DNA	21
2.4.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	21
2.4.1.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA	22
2.4.1.3 Präparation chromosomaler DNA aus Clostridien	22
2.4.2 Modifikation von DNA	23
2.4.2.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
2.4.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden	24
2.4.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.4.2.4 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	25
2.4.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.4.3.1 Standard PCR	26
2.4.3.2 Inverse PCR	26
2.4.3.3 RT-PCR	27
2.4.4 DNA-Sequenzierung	27
2.4.5 Ortsspezifische Mutagenese	28
2.4.6 Southern Hybridisierung	29
2.5 Arbeiten mit RNA	30
2.5.1 RNA-Präparation aus <i>C. difficile</i>	30
2.5.2 Reinigung der RNA-Präparation	31
2.5.3 cDNA-Synthese	32

2.6 Arbeiten mit Protein	32
2.6.1 Präparation von <i>C. difficile</i> Toxinen	32
2.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Gelfärbung	33
2.6.3 Proteinbestimmung	33
2.6.4 Glykosylierungsreaktion (Modifikation)	33
2.6.5 CAT Rapid Assay	34
2.7 PC-Analytik und Software	35
2.7.1 DNA-Analyse	35
2.7.2 RNA-Analyse	35
3 ERGEBNISSE	36
3.1 Der Stamm <i>Clostridium difficile</i> C34 als Wirt von <i>CdISt1</i>	36
3.1.1 Der Pathogenitätslokus und die Toxine von <i>C. difficile</i> C34	36
3.2 Die Charakterisierung von <i>CdISt1</i>	38
3.2.1 Darstellung des Aufbaus und der Sekundärstruktur von <i>CdISt1</i>	38
3.2.2 Funktionelle Analyse von <i>CdISt1</i>	41
3.3 <i>CdISt1</i>-verwandte Sequenzen im Genom von <i>Clostridium difficile</i>	43
3.3.1 PCR-Screening von <i>C. difficile</i> Stämmen	43
3.3.2 Southern Hybridisierung mit einer <i>CdISt1</i> -Sonde	44
3.3.3 Charakterisierung von <i>CdISt1</i> -Varianten im Stamm C34	46
3.3.4 Funktionelle Analyse der <i>CdISt1</i> -Varianten	51
3.4 Evaluation eines möglichen Einflusses von <i>CdISt1</i> auf die Evolution clostridialer Proteine	52
3.4.1 Generierung eines Vektorsystems für Transformationen in <i>C. difficile</i>	52
3.4.2 Konzeption eines Modellsystems zur Generierung alternativer Protein-Spezies	54
3.4.3 Umsetzung des Modellsystems	55
3.4.3.1 Generierung des Konstruktes zur Detektion von alternativem Spleißen	55
3.4.3.2 Generierung der Positivkontrolle	56
3.4.3.3 Generierung der Negativkontrolle	57
3.4.3.4 Verifizierung der Konstrukte	59

3.4.4 Transfer der Konstrukte in den Rezipienten <i>C. difficile</i> CD37	61
3.4.4.1 Transformation der Konstrukte in <i>B. subtilis</i> BS49	61
3.4.4.2 Kontrolle der <i>B. subtilis</i> BS49 Transformanten	61
3.4.4.3 Transkonjugation von <i>B. subtilis</i> BS49 und <i>C. difficile</i> CD37	62
3.4.4.4 Kontrolle der <i>C. difficile</i> CD37 Transkonjuganten über PCR	63
3.4.4.5 Verifizierung der Integrität der transkonjugierten Konstrukte über eine Southern Hybridisierung	65
3.4.5 Ermittlung der minimalen Hemmstoff-Konzentration	67
3.4.5.1 Wachstumskontrolle auf Selektivplatten	67
3.4.5.2 Interpretation der MHK-Werte in Bezug zu den Literaturdaten	68
3.4.6 Detektion konventioneller und alternativer mRNA-Spezies	69
3.4.6.1 Auswahlkriterien für die Anzuchtbedingungen zur RNA-Präparation	69
3.4.6.2 Primerpaare zum Nachweis von alternativem und konventionellem Spleißen	69
3.4.6.3 Ergebnis der RT-PCRs	70
3.4.6.4 Absicherung der Ergebnisse der RT-PCR durch Sequenzanalysen	72
3.4.7 Direkter Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität	73
4 DISKUSSION	75
4.1 CdIS_{t1} als Prototyp für ein auf eubakterielle Gene adaptiertes Gruppe I Intron	75
4.1.1 Die Fundorte des Gruppe I Introns CdIS _{t1}	75
4.1.2 Die zwei Komponenten von CdIS _{t1}	76
4.1.3 Hypothese zur Entstehung von CdIS _{t1}	80
4.1.4 Der atypische strukturelle Aufbau des Introns CdIS _{t1} beeinträchtigt nicht dessen Funktionalität	82
4.1.5 Vorteile der chimären Struktur von CdIS _{t1}	82
4.1.6 Charakterisierung der wechselseitigen Beziehung zwischen der Intron-Komponente und der Transposase	84
4.1.7 Zusammenfassung der kennzeichnenden Merkmale des neuen Typus von Gruppe I Introns	85
4.2 Die Relation des Gruppe I Introns CdIS_{t1} zu seinem Wirt <i>C. difficile</i>	85
4.2.1 CdIS _{t1} ein Symbiont oder ein Parasit?	85
4.2.2 Die Variation von clostridialen Proteinen durch alternatives Spleißen	86
4.2.3 Die mögliche Variation von clostridialen Proteinen über Exon Shuffling	87

4.3 Cd/Sl1 markiert einen Wendepunkt in der Historie von Gruppe I Introns und eubakteriellen Genen_____	89
4.3.1 Cd/Sl1 als evolutionsgeschichtlich neues Gruppe I Intron_____	89
4.3.2 Die Rolle von Cd/Sl1 in der „Introns early“ und „Introns late“ Kontroverse_____	90
4.3.3 Die Rückkehr zu eubakteriellen Genen_____	91
5 ZUSAMMENFASSUNG _____	92
6 LITERATUR _____	94
ANHANG A: Primer _____	100
ANHANG B: PCR-Bedingungen _____	102
ANHANG C: Nukleotidsequenzen _____	104
ANHANG D: Lebenslauf _____	106
VERSICHERUNG _____	107
ABSTRACT _____	108

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Drei-Domänen-Modells der Großen Clostridialen Zytotoxine.	1
Abb. 1.2: Schaubild zu den Spleißmechanismen von Gruppe I und Gruppe II Introns.	6
Abb. 1.3: Skizze der RNA-Sekundärstruktur von Gruppe I und Gruppe II Introns.	9
Abb. 3.1: Darstellung des Pathogenitätslokus (PaLoc) von <i>C. difficile</i> C34, Größenvergleich der Toxine mit den Referenztoxinen und Dokumentation ihrer katalytischen Eigenschaften.	37
Abb. 3.2: Vergleichende Darstellung der RNA-Sekundärstruktur von <i>CdISt1</i> mit Gruppe I Introns des Subtyps IA2.	39
Abb. 3.3: RT-PCR Analyse mit <i>CdISt1</i> zum Nachweis des Spleißvorgangs.	41
Abb. 3.4: Zyklisierungsnachweis des Introns <i>CdISt1</i> .	42
Abb. 3.5: PCR zur Detektion einer <i>CdISt1</i> -spezifischen Sequenz.	44
Abb. 3.6: Detektion von <i>CdISt1</i> -verwandten Sequenzen über eine Southern Hybridisierung.	45
Abb. 3.7: Ablaufschema der inversen PCR (iPCR).	47
Abb. 3.8: Darstellung der in <i>C. difficile</i> C34 identifizierten <i>CdISt1</i> -Varianten.	48
Abb. 3.9: Unterteilung der <i>CdISt1</i> -Varianten in zwei Typen.	50
Abb. 3.10: Nachweis des Spleißens über RT-PCR bei ausgewählten <i>CdISt1</i> -Varianten.	51
Abb. 3.11: Ablaufschema zum Transfer rekombinanter DNA zu <i>C. difficile</i> über Konjugation.	53
Abb. 3.12: Darstellung des Vektors pTransfer1.	54
Abb. 3.13: Modellsystem zur Detektion von auf alternativem Spleißen beruhenden Proteinen.	55
Abb. 3.14: Darstellung der experimentellen Konstrukte zur <i>in vivo</i> Analyse von alternativem und konventionellem Spleißen.	58
Abb. 3.15: Kontroll-PCRs und Sequenzierungen zur Verifizierung der experimentellen Konstrukte.	60
Abb. 3.16: PCR-Nachweis der Integration der Konstrukte in das konjugative Transposon Tn916.	62
Abb. 3.17: PCR-Analysen zum Transkonjugationsnachweis der drei Konstrukte in den Empfängerstamm <i>C. difficile</i> CD37.	64
Abb. 3.18: Southern Hybridisierung mit einer <i>tcdA</i> -Sonde.	66
Abb. 3.19: RT-PCRs zum Vergleich von alternativem und konventionellem Spleißen.	71
Abb. 3.20: Rapid CAT Assay nach Azemun <i>et al.</i>	74
Abb. 4.1: Homologievergleich der Transposasen von <i>CdISt1</i> und IS8301 und das DDE-Sequenzmotiv.	79
Abb. 4.2: Sequenzvergleich zwischen <i>CdISt1</i> und IS8301.	80
Abb. 4.3: Modellvorstellung zur Entstehung von <i>CdISt1</i> .	81
Abb. 4.4: Das P1 Pairing von <i>CdISt1</i> .	83
Abb. 4.5: Modellvorstellung zum Exon Shuffling durch <i>CdISt1</i> .	88
Tab. 1.1: Die Gruppe der Großen Clostridialen Zytotoxine.	2
Tab. 1.2: Enzymatische Aktivität und zytopathischer Effekt verschiedener LCTs.	3
Tab. 3.1: Charakteristika von <i>CdISt1</i> -Varianten.	49
Tab. 3.2: Wachstumskontrolle nach 96 h zur Ermittlung der minimalen Hemmstoff-Konzentration.	68
Tab. 4.1: Integrationsstellen von ausgesuchten <i>CdISt1</i> -Varianten.	75
Tab. 4.2: Transposasen mit Homologie zu TlpA und TlpB.	78

Abkürzungen

AAD	Antibiotika-assoziierte Diarrhöe
As	Aminosäure(n)
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cDNA	copy-DNA
CPE	zytopathischer Effekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBS	Exon Binding Site
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
IBS	Intron Binding Site
IGS	Internal Guide Sequence
iPCR	Inverse Polymerasekettenreaktion
IS Element	Insertionselement
kD	Kilo-Dalton
LB	Luria Broth
LCT	Large Clostridial Cytotoxin
MHK	Minimale Hemmstoff-Konzentration
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Nt	Nukleotid(e)
ORF	Open Reading Frame
PaLoc	Pathogenitätslokus
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMC	Pseudomembranöse Kolitis
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
<i>tcdA</i>	Gen des Toxin A von <i>Clostridium difficile</i>
<i>tcdB</i>	Gen des Toxin B von <i>Clostridium difficile</i>
<i>tcnα</i>	Gen des Alpha-Toxins von <i>Clostridium novyi</i>
<i>tcsH</i>	Gen des Haemorrhagischen Toxins von <i>Clostridium sordellii</i>
<i>tcsL</i>	Gen des Letalen Toxins von <i>Clostridium sordellii</i>
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure

1 EINLEITUNG

1.1 *Clostridium difficile* und Große Clostridiale Zytotoxine (LCTs)

1.1.1 Allgemeine Charakteristika der Spezies *C. difficile* und ihrer Toxine

C. difficile ist ein Gram-positives, obligat anaerobes, sporenbildendes Bakterium, das der Familie der Bacillaceae zuzuordnen ist. Das humanpathogene Bakterium ist von klinischer Relevanz, es wurde als Auslöser einer Darmerkrankung nach Antibiotikatherapie identifiziert. Für die Pseudomembranöse Kolitis (PMC) sowie die weniger schwerwiegende Verlaufsform der Krankheit, die Antibiotika-assoziierte Diarrhöe (AAD), ist *C. difficile* verantwortlich [1]. Als Hauptvirulenzfaktoren sind hier die *C. difficile* Toxine TcdA (Enterotoxin) und TcdB (Zytotoxin) anzuführen, die zu der Gruppe der Großen Clostridialen Zytotoxine (LCT) zählen [2]. Derzeit werden noch drei weitere Toxine dieser Gruppe zugeordnet. Dazu gehören Tcn α von *C. novyi* sowie die *C. sordellii* Toxine TcsL und TcsH (Tab. 1.1). Es handelt sich hierbei um die größten bislang bekannten einkettigen bakteriellen Toxine. Neben der strukturellen Zweiteilung der LCTs in einen C-terminalen repetitiven Anteil und einen N-terminalen nicht repetitiven Anteil, ist auch eine Unterteilung der Toxine in funktionelle Domänen möglich. Ein Drei-Domänen-Modell, bestehend aus einer katalytischen Domäne, einer Translokationsdomäne und einer Ligandendomäne, ist für die LCTs etabliert (Abb. 1.1) [2]. Gemeinsamkeiten in den biochemischen und molekularbiologischen Eigenschaften untermauern die Einteilung der aufgeführten Toxine in die gemeinsame Gruppe der LCTs [2].

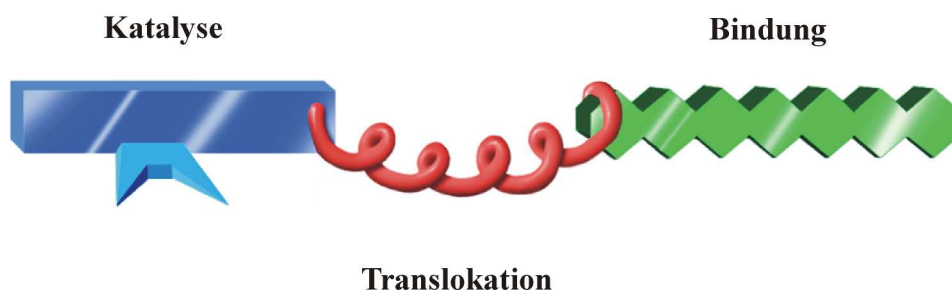


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Drei-Domänen-Modells der Großen Clostridialen Zytotoxine (nach [2]).

Spezies	Toxin	Molekülmasse (kDa)	Krankheitsbild
<i>C. difficile</i>	TcdA	308 ^[3]	Pseudomembranöse Kolitis
<i>C. difficile</i>	TcdB	270 ^[3]	Pseudomembranöse Kolitis
<i>C. sordellii</i>	TcsH	300 ^[4]	Gasgangrän
<i>C. sordellii</i>	TcsL	270 ^[4]	Gasgangrän
<i>C. novyi</i>	Tcn α	250 ^[5]	Gasgangrän

Tab. 1.1: Die Gruppe der Großen Clostridialen Zytotoxine.

1.1.2 Klassifizierung der LCTs und Darstellung der enzymatischen Aktivität

Die enzymatische Aktivität der Mitglieder der Familie der LCTs besteht aus einer kovalenten Modifikation verschiedener kleiner G-Proteine der Ras- und Rho-Subfamilie, mit dem Ergebnis der funktionellen Blockade dieser Signalproteine [2, 6-9]. LCTs agieren bei dieser Reaktion als Glykosyltransferasen (Tab. 1.2). Für jeden Vertreter der Familie sind hierbei charakteristische Substrate und Co-Substrate beschrieben. Den kleinen G-Proteinen wird eine zentrale Funktion bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts eukaryonter Zellen zugeschrieben [10, 11]. Ihre Inaktivierung durch die LCTs verursacht bei Kulturzellen eine morphologisch deutlich sichtbare Veränderung, die als zytopathischer Effekt (CPE) bezeichnet wird [2, 12]. Der CPE tritt, abhängig davon, welches LCT ihn verursacht, in zwei klar differenzierbaren Formen auf. Der D-Typ CPE wird von den *C. difficile* Toxinen TcdA und TcdB [12-15], von *C. novyi* Tcn α [16, 17] und von *C. sordellii* TcsH hervorgerufen [4], der S-Typ CPE von *C. sordellii* TcsL [12, 18] und den varianten *C. difficile* Toxinen TcdB-1470 und TcdB-8864 [19, 20]. Der von LCTs hervorgerufene CPE gründet sich auf Veränderungen in der Organisation von Komponenten des Zytoskeletts. Davon ist in erster Linie das dynamische Gleichgewicht des Polymerisations- und Depolymerisationsprozess von Aktin betroffen sowie die fokalen Adhäsionskomplexe, die den Ansatzpunkt der Aktin-Stressfasern darstellen [2, 21, 22]. Die morphologischen Veränderungen beim D-Typ CPE zeigen sich in einem sternförmigen Aussehen der Zellen, wobei filamentöse Ausläufer erhalten bleiben. Im Gegensatz hierzu ist beim S-Typ CPE eine Veränderung hin zu einem spindelförmigen Erscheinungsbild der Zelle zu beobachten. Diese zwei klar voneinander unterscheidbaren morphologischen Erscheinungsbilder werden mit der unterschiedlichen Wirkung der Toxine auf die fokalen Adhäsionskomplexe begründet [14]. Bei den S-Typ CPE induzierenden Toxinen wird der gesamte fokale Adhäsionskomplex abgebaut und damit auch die zugehörigen Integrine, die für die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix notwendig sind [14]. Bei Toxinen, die den D-Typ CPE verursachen ist nur ein partieller Abbau der fokalen

Adhäsionskomplexe zu beobachten. Die Integrine verbleiben an Ort und Stelle [14]. Über den CPE lässt sich zum Einen die zytotoxische Aktivität der LCTs austesten und zum Anderen eine auf dem morphologischen Erscheinungsbild der Zellen basierende Gruppierung vornehmen.

Spezies	Toxin	Zielproteine ^a	Zytopathischer Effekt ^b
<i>C. difficile</i>	TcdA	Rho, Rac, Cdc42, Rap ^[13]	D-Typ ^[12-15]
<i>C. difficile</i>	TcdB	Rho, Rac, Cdc42 ^[8, 13]	D-Typ ^[12-15]
<i>C. sordellii</i>	TcsH	n.b.	D-Typ ^[4]
<i>C. sordellii</i>	TcsL	Rac, Ras, Rap ^[9] , Ral ^[23] R-Ras ^[14]	S-Typ ^[12, 18]
<i>C. novyi</i>	Tcn α	Rho, Rac, Cdc42 ^[6] , Rap ^[24]	D-Typ ^[16, 17]

^a Die Zielproteine gehören zu den kleinen G-Proteinen der Rho- und Ras-Superfamilie

^b Der Zytopathische Effekt wurde an Zellen in Kultur getestet

n.b. nicht bestimmt

Tab. 1.2: Enzymatische Aktivität und zytopathischer Effekt verschiedener LCTs.

1.2 Eigenschaften von mit *C. difficile* assoziierten mobilen genetischen Elementen

1.2.1 Insertionselemente, Transposons und Introns als mobile genetische Elemente

Insertionselemente wurden erstmals 1972 von Starlinger und Saedler beschrieben [25]. Bei der Untersuchung von *E. coli* Mutanten wurden Insertionssequenzen (IS Elemente) im Galaktose Operon charakterisiert [25], die sich nachfolgend als typische Bestandteile des Bakteriengenoms herausstellten. IS Elemente bestehen i.d.R. aus 800-2000 Basenpaaren. An ihren Enden tragen IS Elemente kurze gegenläufige Sequenzwiederholungen, die als Inverted Repeats bezeichnet werden. IS Elemente sind genetisch kompakt. Im zentralen Bereich der IS Elemente werden ausschliesslich Proteine kodiert, die für ihre Mobilität verantwortlich sind.

Diese als Transposasen bezeichneten Proteine werden zumeist von einem, vereinzelt auch von zweien, offenen Leseraster kodiert. In *C. difficile* konnten bislang keine IS Elemente identifiziert werden.

Transposons sind bedeutend größer als IS Elemente. Neben den für die Mobilität verantwortlichen Genen besitzen Transposons Gene, die zusätzliche Funktionen vermitteln. Oftmals ermöglichen es diese Gene Bakterien in einer für sie nachteilhaften Umwelt zu überleben, indem sie beispielsweise Resistenzen gegenüber Antibiotika bewirken. Die Mitte der 60er Jahre noch als R Faktoren bezeichneten Antibiotikaresistenzen konnten schliesslich 10 Jahre später mit den Transposons in Zusammenhang gebracht werden [26]. Transposons werden in zwei Klassen unterteilt. Klasse I Transposons sind von IS Elementen eingerahmt, die über Transposasen die Mobilität des genetischen Elements vermitteln. Klasse II Transposons weisen an ihren Enden Inverted Repeats auf, die Transpositionsproteine werden bei diesen Elementen im zentralen Teil kodiert. Für *C. difficile* sind bislang mit Tn916, Tn5397, Tn5398 und Tn4453 vier Transposons in der Fachliteratur beschrieben [27-30].

Introns sind mobile genetische Elemente, die sich grundlegend von den oben beschriebenen IS Elementen und Transposons unterscheiden. Führt die Integration eines IS Elements oder eines Transposons in ein Gen mit großer Wahrscheinlichkeit zu dessen Inaktivierung, so ist die Integration eines Introns mit weitaus weniger drastischen Konsequenzen verbunden. Der DNA-Abschnitt mit dem Intron wird zwar transkribiert, das Intron wird jedoch nachfolgend durch einen als Spleißen bezeichneten Prozess ausgeschnitten und fehlt damit in der funktionellen mRNA [31, 32]. Auf diese Weise ist die Translation zu einem funktionellen Protein trotz Integration eines Introns in das entsprechende Gen möglich. Der Spleißvorgang findet immer auf Ebene der RNA statt, manche RNA-Moleküle mit definierten Sekundärstrukturfaltungen spleißen bei *in vitro* Versuchen ohne Beteiligung von Proteinen. Dieses autokatalytische Spleißen wird auch als Selbstspleißen bezeichnet und ist charakteristisch für Gruppe I und Gruppe II Introns [31-33]. In Anlehnung an die katalytische Aktivität von Enzymen werden Gruppe I und Gruppe II Introns auch als Ribozyme klassifiziert [34].

1.2.2 „Infektiöse Introns“ und *C. difficile*

Der Begriff „infektiöse Introns“ wurde 1989 von Lambowitz geprägt und verdeutlicht, dass die so bezeichneten Gruppe I und Gruppe II Introns phylogenetisch sehr weit verbreitet und mit einer großen Verteilungsvielfalt im Genom versehen sind [31, 35]. Dies zeigt auf, dass Gruppe I und Gruppe II Introns verschiedene sehr effiziente Mechanismen zu ihrer Verbreitung entwickelt haben müssen. Die Mobilität von Gruppe I Introns wird beispielsweise mit der Aktivität intronkodierter Endonukleasen, sog. Homing Endonukleasen, korreliert [31, 32, 36, 37]. Für Gruppe II Introns sind Reverse Transkriptase-ähnliche Proteine

beschrieben worden, die ebenfalls intronkodiert sind und die Mobilität dieser Introns entsprechend vermitteln [31, 32, 36]. Eine charakteristische Eigenschaft von Gruppe I und Gruppe II Introns ist, wie bei 1.2.1 beschrieben, ihre autokatalytische Aktivität. Beide Introngruppen sind zur Durchführung einer *in vitro* Selbstsplicingreaktion befähigt, bei der sich das Intron aus der Vorläufer-mRNA ausschneidet. Damit verbunden ist die gleichzeitige Verknüpfung der Exonsequenzen. Das Resultat des Splicingprozesses ist eine gereifte mRNA [31-34].

Die Arbeitsgruppe um P. Mullany wies 1996 erstmals ein Gruppe II Intron in *C. difficile* nach [29]. Das Intron wurde bei Studien mit dem konjugativen Transposon Tn5397 entdeckt, in dessen Gen *orf14** es inseriert ist. In Folgeexperimenten konnte gezeigt werden, dass das Gruppe II Intron weder für die Konjugation von Tn5397 notwendig ist noch die Transferhäufigkeit beeinflusst [38].

In eubakteriellen Gen konnten bis zu diesem Zeitpunkt keine Gruppe I Introns nachgewiesen werden. Sehr häufig wurden Gruppe I Introns in mitochondrialer DNA von Pilzen und Pflanzen, in rRNA Genen von niederen Eukaryonten wie *Tetrahymena*, in Chloroplasten-DNA und in Bakteriophagen nachgewiesen [39-51]. In Eubakterien gefundene Gruppe I Introns waren ausschliesslich in der Antikodonschleife von tRNA-Genen lokalisiert [40-44].

1.2.3 Charakteristika von Gruppe I und Gruppe II Introns

1.2.3.1 Splicingmechanismus und Aufbau von Gruppe I Introns

Die Pionierarbeiten zur Aufklärung des Splicingmechanismus erfolgten mit dem rRNA Intron von *Tetrahymena* [52]. Der Umstand, dass dieser Mechanismus auch für zahlreiche weitere Gruppe I Introns nachvollzogen werden konnte, untermauert dessen Allgemeingültigkeit [53]. Der Splicingmechanismus vollzieht sich auf Ebene der RNA in zwei aufeinanderfolgenden Transesterifizierungsreaktionen von Phosphodiester-Bindungen (Abb. 1.2A) [31-33]. Für den Splicingvorgang sind lediglich Mg^{2+} -Kationen und ein externes Guanosin notwendig. Die Splicingreaktion wird von einem nukleophilen Angriff des Guanosins auf die Phosphatgruppe der 5'-Splicingstelle initiiert. Über zwei aufeinanderfolgende Transesterifizierungen erfolgt dann die Exzision des Introns und die Ligation des 5'- und 3'-Exons (Abb. 1.2A). Da das Lösen und Verknüpfen der Bindungen miteinander gekoppelt sind, wird keine zusätzliche Energie für die Reaktion benötigt, die dementsprechend auch vollständig reversibel ist. Gruppe I Introns können über eine zusätzliche Transesterifizierung nach ihrer Exzision zyklisieren [31-33]. Mit dieser Reaktion wird möglicherweise das Gleichgewicht der Splicingreaktion hin zu den gesplizten Produkten verlagert [32].

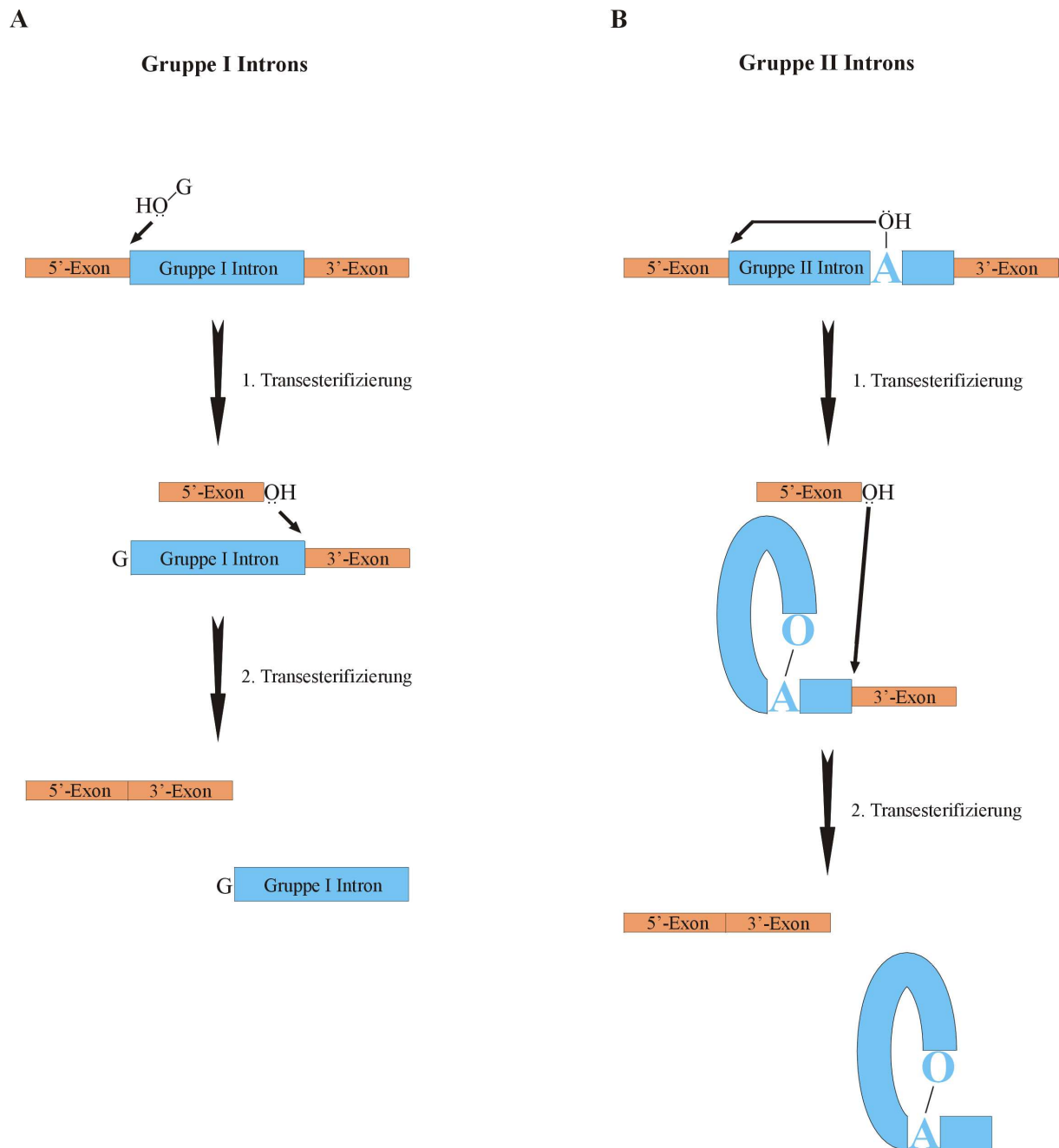


Abb. 1.2: Schaubild zu den Spleißmechanismen von Gruppe I und Gruppe II Introns (modifiziert nach [31]). **A:** Teilabbildung A zeigt den Ablauf der Spleißreaktion bei Gruppe I Introns über zwei aufeinanderfolgende Transesterifizierungen. Nicht dargestellt ist eine mögliche Zyklisierung des ausgespleißten Introns. **B:** Bei der Spleißreaktion von Gruppe II Introns wird die charakteristische Struktur des Intron-Lariats, einer Lasso-ähnlichen Zwischenform, ausgebildet. Analog zu Gruppe I Introns vollzieht sich die Spleißreaktion auch hier über zwei Transesterifizierungen.

Die Fähigkeit zum autokatalytischen Spleißen liegt in der hoch konservierten RNA-Sekundär- und Tertiärstruktur der Gruppe I Introns begründet (Abb. 1.3A). Verschiedene Gruppe I Introns weisen über ihre Gesamtsequenz betrachtet keine hohen Sequenzhomologien zueinander auf, jedoch ist eine Serie von kurzen Sequenzfolgen hoch konserviert. Es handelt sich dabei um die P, Q, R und S Sequenzen. Dabei bilden Teilbereiche von P und Q sowie R und S Basenpaarungen aus, von denen sich eine konservierte Struktur ableiten lässt [31-33, 53]. Die Intronengrenzen sind streng von jeweils einem Nukleotid definiert. Im 5'-Bereich handelt es sich dabei um ein Uracil, im 3'-Bereich um ein Guanosin. Die Sekundärstruktur leitet sich von gepaarten Sequenzbereichen ab, die mit P1-P10 bezeichnet werden [31-33, 53]. Das 5' gelegene P1 Pairing beinhaltet Paarungen mit der 5'-Exonsequenz. Dieser Bereich wird als Internal Guide Sequence (IGS) bezeichnet. Die Pairings P3-P8 bilden das katalytische Zentrum von Gruppe I Introns aus. Die von den Pairings P1-P10 vorgegebene Sekundärstruktur ermöglichte eine Klassifizierung der Gruppe I Introns in vier große Untergruppen, bezeichnet mit IA-ID [53, 54].

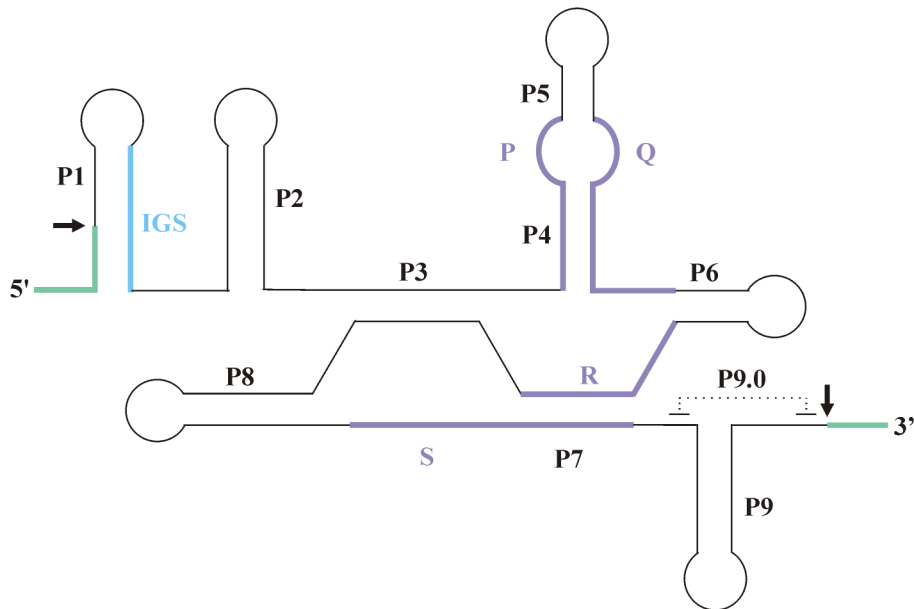
1.2.3.2 Spleißmechanismus und Aufbau von Gruppe II Introns

Auch bei Gruppe II Introns wird die Spleißreaktion durch zwei aufeinanderfolgende Transesterifizierungen vollzogen [31, 32]. Für den Spleißvorgang werden Mg^{2+} -Kationen benötigt, weitere externe Faktoren, wie etwa Guanosin bei den Gruppe I Introns, sind hier nicht erforderlich. Beim ersten Schritt kommt es zur Ausbildung einer Lasso-ähnlichen Zwischenform, der Intron-Lariat Struktur, bei der das Nukleotid am 5' Ende des Introns kovalent mit einem Nukleotid nahe des 3' Endes, i.d.R. ein Adenosin, verknüpft wird (Abb. 1.2B). Darauf folgend vollzieht sich, gekoppelt an das Schneiden des Exons an der 3'-Spleißstelle, die Ligation der Exons und die Freisetzung des Intron-Lariats (Abb. 1.2B).

Wie bei Gruppe I Introns der Fall, so ist auch bei Gruppe II Introns die Gesamtsequenz betreffend keine große Sequenzhomologie zueinander vorhanden [31, 32]. Allerdings weisen sie ebenfalls eine konservierte RNA-Sekundärstruktur auf, die ihre katalytische Aktivität bedingt (Abb. 1.3B) [31, 32]. Von einer zentralen radähnlichen Struktur ausgehend sind sechs helikale Domänen (I-VI) bei Gruppe II Introns ausgebildet, anhand derer sich zwei große Hauptgruppen, bezeichnet als IIA und IIB, definieren lassen. Die Intronengrenzen sind durch konservierte Sequenzen vorgegeben. Im 5'-Bereich ist dies die Sequenzfolge GUGYG, im 3'-Bereich AY. Die am stärksten konservierte Domäne V bildet mit Domäne I das katalytische Zentrum von Gruppe II Introns. Die 5'-Spleißstelle ist durch eine Paarung zwischen einer kurzen Intronsequenz der Domäne I, der Exon Binding Site 1 (EBS1) und einer Sequenz des 5'-Exons, der Intron Binding Site 1 (IBS1), definiert.

A

Gruppe I Intron



B

Gruppe II Intron

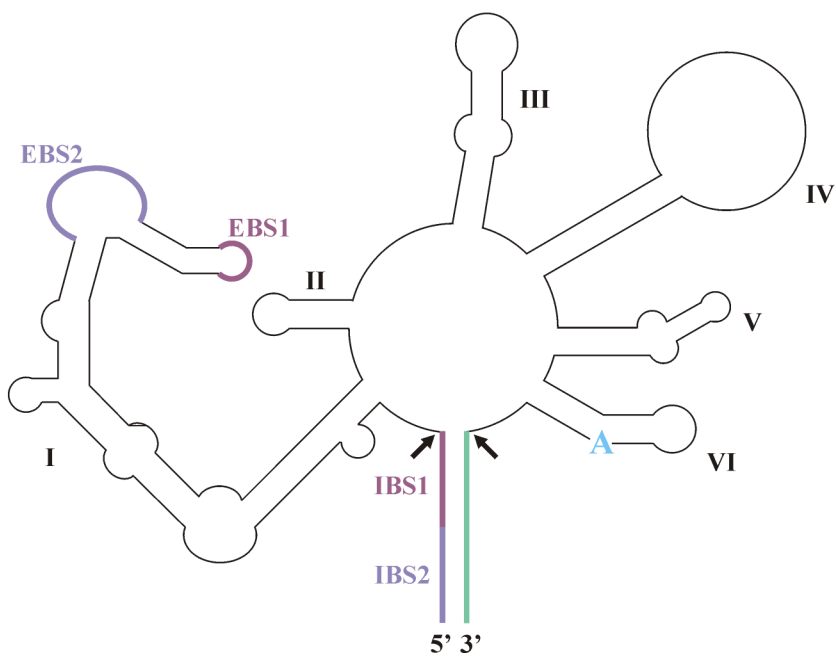




Abb. 1.3: Skizze der RNA-Sekundärstruktur von Gruppe I und Gruppe II Introns (modifiziert nach [31]). **A:** Beispielskizze eines Gruppe I Introns. 5'- und 3'-Exon sind grün eingezeichnet, die Internal Guide Sequence (IGS) blau. Die P, Q, R und S Sequenzen sind lila dargestellt, die 5'- und 3'-Spleißstellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das mit dem 3'-Exon gebildete P10 Pairing ist nicht abgebildet; der Aufbau ist im Text näher erläutert. **B:** Darstellung eines Gruppe II Introns. Die dem 5'-Exon zugehörigen Sequenzabschnitte Intron Binding Site 1 (IBS1) und Intron Binding Site 2 (IBS2) sind in der gleichen Farbe wie ihr jeweiliger Bindungspartner im Intron, die Exon Binding Site 1 (EBS1) und die Exon Binding Site 2 (EBS2), abgebildet. Das 3'-Exon ist grün eingezeichnet, die Spleißstellen sind mit einem Pfeil markiert. Die Domäne I ist oftmals komplexer ausgebildet, als hier gezeigt; die Struktur des Introns ist im Text beschrieben.

Neben der EBS1-IBS1 Paarung trägt die EBS2-IBS2 Paarung zur Positionierung der 5'-Spleißstelle bei. Die Definition der 3'-Spleißstelle obliegt komplexen Interaktionen. Dabei interagiert die Domäne VI mit dem katalytischen Zentrum und ist in die Formation des Intron-Lariats involviert. Das terminale Nukleotid des Introns bildet mit einem zwischen der Domäne II und III sitzenden Nukleotid eine Basenpaarung aus und es kommt des weiteren zu einer Basenpaarung zwischen dem ersten Nukleotid des 3'-Exons und einem Nukleotid direkt vor der EBS1 Sequenz.

1.3 Die Bedeutung von Introns in der Evolution

1.3.1 Die Diskrepanz zwischen der „Introns early“ und „Introns late“ Theorie

Die Rolle von Introns und Exons in der Evolution von Genen und Proteinen ist Gegenstand einer Diskussion mit sehr unterschiedlichen Standpunkten. Vertreter der „Introns early“ Theorie stehen auf dem Standpunkt, dass Introns von jeher in Genen inseriert waren und über die Kombination der sie flankierenden Exons die ersten komplexen Gene entstanden sind [55-57]. Ganz im Gegensatz dazu postulieren die Vertreter der „Introns late“ Sichtweise, dass Introns erst im Laufe der Evolution in vorhandene Gene inseriert sind [58-60]. Die Rolle der Introns ist damit Gegenstand einer sich seit Jahrzehnten hinziehenden, extrem kontroversen Debatte. So veröffentlichten beispielsweise J.D. Palmer und J.M. Logsdon 1991 in *Current Opinion in Genetics and Development* einen Artikel mit dem Titel „The recent origin of introns“ [59]. In der gleichen Ausgabe des Journals, direkt nach diesem Paper ist dann eine Publikation von D.A. Shub zu finden, die den Titel „The antiquity of group I introns“ trägt [57].

1.3.2 Sichtweise gemäss der „Introns early“ Theorie

Die „Introns early“ Theorie gründet sich auf der im Jahr 1978 von W. Gilbert formulierten Hypothese, dass Introns die Evolution von Proteinen beschleunigen, indem neue Rekombinationstellen durch sie zur Verfügung gestellt werden. Auf diese Weise hätten neukombinierte Exons, sofern sie funktionell und vorteilhaft sind, die Möglichkeit, sich zu etablieren [61]. Der Vorgang wurde später unter dem Begriff „Exon Shuffling“ populär und Introns wurden als Hot Spots für die Rekombination beschrieben [56, 62]. Für die Beobachtung, dass Introns in Eukaryonten sehr häufig vorzufinden sind, im eubakteriellen Genom jedoch fehlen, lieferte W.F. Doolittle ebenfalls im Jahr 1978 eine plausible Erklärung [63]. Er beschrieb einen hohen Selektionsdruck bei Eubakterien hin zu einer effizienten Genomstruktur, da die Generationszeit hier so kurz sein kann wie die Dauer der DNA-Replikation. Der Preis für dieses rationalisierte, effiziente und „stromlinienförmige“ Genom sei der Verlust an Evolutionspotential [63].

Die „Introns early“ Theorie geht davon aus, dass Introns schon im Genom des Progenoten vorzufinden waren und entscheidenden Einfluß auf die Proteinevolution nahmen [55-57]. Dieser Sichtweise folgend ergeben sich eine Reihe von Konsequenzen. Dazu gehört der o.a. Verlust von Introns bei Eubakterien und ein Verlust von Introns bei homologen Genen, sofern die betreffenden Introns nicht in allen homologen Genen vorzufinden sind. In homologen Genen sind zudem die Positionen von Introns nicht immer exakt gleich, insbesondere wenn homologe Gene mit größerer evolutionärer Distanz betrachtet werden. Dieser Umstand wird mit „Intron sliding“ oder dem Synonym „Intron drift“ erklärt, was ein Rutschen des Introns in die neue Position bedeutet [57]. Ein weiterer Punkt, den es zu beachten gilt, ist mit der Hypothese verbunden, dass Introns die Ausbildung der ersten komplexen Gene ermöglichten und über Neukombinationen die Proteinevolution beschleunigten. Für die Funktionalität dieser Prozesse ist es eine unabdingbare Voraussetzung, dass die Integrationsphase (die Position des Introns im Kodon) der Introns korreliert ist. Darunter ist zu verstehen, dass die Introns an der gleichen Position innerhalb eines kodierenden Triplets inseriert sind. Ist ein Intron vor dem ersten Nukleotid des Triplets inseriert, liegt die Integrationsphase 0 vor. Bei einer Insertion nach dem ersten Nukleotid eines Triplets liegt die Integrationsphase 1 vor. Dementsprechend bezeichnet die Integrationsphase 2 die Insertion eines Introns nach dem zweiten Nukleotid eines Triplets. Nur durch die Korrelation der Integrationsphasen ist gewährleistet, dass bei einer Neukombination ein offenes Leseraster ohne Frameshift-Mutation ausgebildet werden kann. Aufgrund der Phasenkorrelation und des ursprünglichen Aufbaus der Gene aus Exons wird zudem die dreidimensionale Struktur der Proteine in Relation zu dem Integrationsort von Introns gesetzt.

1.3.3 Sichtweise gemäss der „Introns late“ Theorie

Die „Introns late“ Theorie vertritt einen sehr konträren Standpunkt. Hier wird davon ausgegangen, dass Introns erst später in der Evolution in schon bestehende Gene inseriert sind [58-60]. Demnach spielten Introns auch nie eine Rolle bei der Entstehung von komplexen Genen im Progenoten und die Proteinevolution durch „Exon Shuffling“, sofern sie denn stattfindet, ist ebenfalls nur von untergeordneter Bedeutung. Der Grund für das Fehlen von Introns in Eubakterien ist nach der „Introns late“ Theorie nicht in einem massenhaften Verlust von Introns, wie von der „Introns early“ Theorie postuliert, zu finden, sondern einfach in dem Umstand, dass Introns nie in deren offenen Leserastern vorhanden waren. Bei der Integration von Introns handelt es sich um voneinander unabhängige Insertionsereignisse in vorhandene Gene. Eine Korrelation der Integrationsphasen von Introns kann daher nicht vorgegeben sein. Sollten bei homologen Genen Introns inseriert sein, wird hier von einem zufälligen Ereignis ausgegangen, da es nur wenige Beispiele hierfür gibt. Die „Introns late“ Theorie schliesst „Intron sliding“ nach der Insertion von Introns in homologen Genen grundsätzlich aus, weil wie o.a. voneinander unabhängige Insertionsereignisse vorliegen. Ein Zusammenhang zwischen dem Integrationsort von Introns und der dreidimensionalen Struktur der Proteine wird aus dem gleichen Grund negiert.

1.3.4 Ein neuer Blickwinkel in der „Introns early“ und „Introns late“ Debatte

In Anbetracht der Tatsache, dass sowohl die Vertreter der „Introns early“ Theorie als auch die Vertreter der „Introns late“ Theorie eine Vielzahl an Argumenten und Fakten anführen können, um ihre Hypothese zu untermauern, verwundert es, dass erst 1998 der Versuch unternommen wurde, einen gemeinsamen Nenner für beide Theorien zu finden [64]. Die Arbeitsgruppe um De Souza und W. Gilbert versuchte beiden Theorien gerecht zu werden und liefert damit Erklärungsansätze für viele Streitpunkte. Als Grundlage diente bei dieser Betrachtungsweise eine Intron Datenbank, die auf der Datenbank „GenBank Release 101“ basierte. Dabei wurde ein Datensatz von 5772 Genen mit Introns ausgewählt und zusätzlich ein reduzierter Datensatz von 1997 Genen mit Introns gebildet. Beide Datensätze waren bei den späteren Ergebnissen fast deckungsgleich. Neu ist hier der Ansatzpunkt zwischen ursprünglichen Proteinen („ancient proteins“) und Proteinen evolutionär neueren Ursprungs zu unterscheiden. Für die ursprünglichen Proteine konnte eine Phasenkorrelation der Introns belegt werden und auch eine Korrelation der Intronposition zur dreidimensionalen Struktur der Proteine. Diese Beobachtungen waren nicht auf die Gruppe von neueren Proteinen

übertragbar. Hier galten die Regeln der „Introns late“ Theorie. De Souza *et al.* folgerten, dass zwei Drittel aller Introns neueren Ursprungs sind und später im Laufe der Evolution in die Gene inserierten. Demnach würden diese Introns der „Introns late“ Konvention entsprechen. Ein Drittel aller Introns waren damit potentielle Kandidaten für ursprüngliche Introns, die der „Introns early“ Konvention folgen.

1.4 Fragestellung

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden begonnen, um in einer *C. difficile* Stammsammlung nach varianten Toxinen zu suchen. Anhand von Variationen sollte das Verständnis der molekularen Charakteristika der LCTs erweitert werden. In initialen Experimenten wurde bei PCR-Analysen mit dem aus Kanada stammenden Isolat *C. difficile* C34 eine Vergrößerung des *tcdA*-Gen um ca. 2000 Basenpaare gefunden. Zu unserer Überraschung handelt es sich dabei nicht um den Nachweis eines varianten Toxingens, sondern um die Entdeckung eines Gruppe I Introns, das bisher nicht beschriebene Eigenschaften aufweisen sollte. Dieser Zufall führte zu einer grundlegenden Umorientierung der Zielsetzung der Promotionsarbeit.

Die Ziele der Arbeit wurden auf die Beschreibung des neuartigen genetischen Elements fokussiert und waren im Einzelnen:

- Klonierung, Sequenzierung und Charakterisierung der Insertion *CdIS1* im Integrationsort *tcdA*-C34.
- Identifikation homologer Sequenzen in Datenbanken und Suche nach hypothetischen funktionellen Eigenschaften des *CdIS1* Elements.
- Nachweis der Ribozym-Eigenschaften von *CdIS1* in *in vitro* Spleißreaktionen.
- Suche nach homologen *CdIS1*-Sequenzen im Genom von *C. difficile* C34 und Charakterisierung von Intronvarianten.
- Suche nach *CdIS1*-Varianten in anderen Clostridien.
- Untersuchung alternativer Spleißreaktionen und Etablierung eines Modellsystems für *C. difficile*, um deren Bedeutung für die Evolution von Proteinen zu analysieren.

Die ausschliessliche Integration von *CdIS1* in offenen Leserastern wirft wichtige Fragen auf, die sich insbesondere auf eine mögliche Bedeutung dieses neuartigen genetischen Elements für die Evolution bakterieller Proteine beziehen, so dass sich für die eigenen Daten der Bezug zur „Introns early“ und „Introns late“ Theorie ergab.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Biochemika und Medienzusätze wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Oxoid (Wesel), Becton Dickinson (Heidelberg), New England Biolabs (Schwalbach), Bio-Rad (München), Difco (Augsburg), Biozym (Hameln), GIBCO-BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), NEN DuPont (Bad Homburg), Schleicher & Schüll (Dassel), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhof), Qiagen (Hilden) und Whatman (Maidstone, England) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Die im Verlauf der experimentellen Arbeiten zur Anwendung gekommenen Enzyme wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Biolabs (Schwalbach), Boehringer (Mannheim), Clontech (Heidelberg), GIBCO-BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Sigma (Deisenhof) bezogen. Im Einzelnen wurden hierbei verwendet: Alkalische Phosphatase (Boehringer, MBI-Fermentas), DNase, RNase-frei (Pharmacia), Klenow-Enzym (MBI-Fermentas), Lysozym (Sigma), Lysostaphin (Sigma), Proteinase K (Sigma), Restriktionsendonukleasen (Boehringer, MBI-Fermentas, New England Biolabs), RNase A (Boehringer), Taq-DNA-Polymerase (MBI-Fermentas, New England Biolabs), T4-DNA-Polymerase (Clontech), T4-DNA-Ligase (Clontech, MBI-Fermentas).

2.1.3 Vektoren

Für die Arbeiten mit rekombinanter DNA in *E. coli* wurden, entsprechend den jeweiligen Erfordernissen, drei verschiedene Vektoren eingesetzt. Bei dem Vektor pQE11a18 handelt es sich um ein an anderer Stelle im Labor modifiziertes pQE11 Derivat [65]. Des Weiteren wurde der Vektor pUC18 eingesetzt sowie der aus dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen stammende Vektor pCR2.1.

2.2 Bakterienstämme

2.2.1 *Escherichia coli* Stämme

Die im Rahmen dieser Arbeit zu Klonierungszwecken und für Plasmidpräparationen verwendeten *E. coli* Stämme sind nachfolgend mit ihrem Genotyp aufgelistet:

- MC1061 F⁻ araD119, Δ(ara-leu)7696, ΔlacX74, galU, galK, hsdR2(r_k⁻m_k⁺), mcrB1, rpsL, (Str^r)
- DH5α F⁻ (Φ 80dΔ(lacZ)M15)recA1, endA1, gyrA96, thi1, (r_k⁻m_k⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169
- Top10 F⁻ mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG
- BMH71-18mutS thi, supE, Δ(lac-proAB), [mutS::Tn10][F'proAB, lacI^qZΔM15]

2.2.2 *Clostridium difficile* Stämme

Der *C. difficile* Referenzstamm VPI10463 wurde freundlicherweise von Dr. N. Sullivan (Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, VA, USA) zur Verfügung gestellt. Stamm C34 lieferte Dr. D. E. Mahony (Institute of Microbiology and Immunology, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada), die Stämme 1470 und 42373 stammten von Dr. M. Delmée (Unité de Microbiologie, Université de Louvain, Bruxelles, Belgique) und Stamm 8864 von Dr. E. Falsen (Culture Collection, University of Goetheburg, Sweden). *C. difficile* CD37 wurde von Dr. P. Mullany (Department of Microbiology, Eastman Dental Institute, London, UK) bereitgestellt. Im eigenen Labor wurde gemeinsam mit Herrn S. Frenzel eine 186 Isolate umfassende *C. difficile* Sammlung erstellt (Stämme LPZ1 bis LPZ186), deren Vertreter ursprünglich aus Leipzig stammten.

2.2.3 Vertreter anderer clostridialer Spezies und *Bacillus subtilis*

Der *C. sordellii* Stamm IP82 wurde von Dr. M. R. Popoff (Institute Pasteur, Paris, France) zur Verfügung gestellt, die Stämme *C. barati* RE815, *C. barati* RE855, *C. barati* RE919, *C. barati* RE1139, *C. barati* RE1779, *C. bifermentans* RE681, *C. butyricum* RE1493, *C. histolyticum* RE1468, *C. innoqua* RE1165, *C. irregularis* RE980, *C. limosum* RE1794, *C. litusebureuse* RE447, *C. septicum* RE998, *C. sordellii* RE1522, *C. subterminale* RE519, *C. ramosum* RE1287 und *C. ramosum* RE1296 lieferte Dr. H.-P. Schau (Thüringer Medizinisch-Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt, Erfurt, Deutschland). Der Stamm *C. novyi*

ATCC19402 entstammt der American Type Culture Collection (American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA).

Der *B. subtilis* Stamm BS49 wurde von Dr. P. Mullany (Department of Microbiology, Eastman Dental Institute, London, UK) zur Verfügung gestellt.

2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.3.1 Kulturmedien und Anzucht von Clostridien

Die Anzucht der Clostridien erfolgte auf Schaedler Blutplatten oder bei *C. difficile* alternativ auf Selektivplatten nach George *et al.* [66]. Als Flüssignährmedien kamen Brain Heart Infusion Broth (BHI) und modifiziertes Wilkins-Chalgren Medium zur Anwendung. Alle Anzuchten erfolgten in einem Anaerobier Brutschrank bei 37°C. Für die Präparation Großer Clostridialer Zytotoxine aus den Kulturüberständen von Clostridien wurden die Bakterien in einem Dialyseschlauchsystem nach Sullivan *et al.* angezogen [67]. Der Dialyseschlauch wurde dabei mit 200ml einer 0,9%igen NaCl Lösung gefüllt und in einen 2 Liter Erlenmeyerkolben, der 1350ml 2fach konzentriertes BHI-Medium enthielt, eingebracht. Der Kolben samt Inhalt wurde autoklaviert und im Anschluss daran mit dem gewählten Clostridienstamm in den Dialyseschlauch beimpft. Es folgte eine Inkubationszeit von 3 Tagen bei 37°C im Anaerobier Brutschrank.

Material:

- Schaedler Blutplatten
- *C. difficile* Selektivagar: 40g Proteosepepton, 5g Na₂HPO₄, 1g KH₂PO₄, 2g NaCl, 100mg MgSO₄, 6g D-Fruktose, 20g Bactoagar, 3ml Neutralrot (1%ig in 96% Ethanol) ad 1000ml mit H₂O bidest. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50°C werden 350mg D-Cycloserin, 4mg Cefotaxim und 1mg N-taurocholat zugesetzt und anschliessend die Platten gegossen.
- Brain Heart Infusion Medium (1fach): 37g Brain Heart Infusion ad 1000ml H₂O bidest.
- Wilkins-Chalgren Medium (1fach, modifiziert): 16,5g Wilkins-Chalgren Medium, 1g Glukose, 0,1g NaHCO₃, 6,6ml 1M TrisHCl pH 7,3 ad 485ml H₂O bidest. Pyridoxalchlorhydrat (1g/l) und 5ml Cystein-Chlorhydrat (35g/l) steril zugegeben. Die Lagerung des Mediums erfolgte unter anaeroben Bedingungen.

2.3.2 Kulturmedien und Anzucht von *E. coli* und *B. subtilis*

Die Anzucht von *E. coli* und *B. subtilis* erfolgte in LB-Medium oder auf LB-Platten. Den Medien waren entsprechend den experimentellen Anforderungen zu Selektionszwecken Antibiotika zugesetzt, deren Konzentration sich nach den jeweiligen Erfordernissen richteten. Beide Spezies wurden, soweit nicht anders angegeben, aerob bei 37°C inkubiert.

Material:

- LB-Medium (5fach): 50g Bactotrypton, 25g Hefextrakt, 50g NaCl ad 1000ml H₂O. Das Medium wurde autoklaviert und vor Gebrauch 1:5 mit sterilem H₂O verdünnt (1fache Konzentration).
- LB-Agar: LB 1fach Medium wurden 2% Bactoagar zugesetzt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf etwa 50°C erfolgte, wenn erforderlich, die Antibiotikazugabe und anschliessend das Gießen der Platten. Als Antibiotika wurden den experimentellen Anforderungen entsprechend Ampicillin (100µg/ml), Kanamycin (50µg/ml) und Erythromycin (100µg/ml) eingesetzt.

2.3.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Klonierungen in *E. coli* erfolgten u.a. über die Technik der Elektroporation, deren Durchführung den Einsatz elektrokompenter Zellen voraussetzt. Die Transformation von rekombinanter DNA in *B. subtilis* setzt ebenfalls die Verwendung kompetenter Bakterien voraus.

2.3.3.1 Herstellung von elektrokompenten *E. coli* Zellen

Mit einer 5ml LB-Vorkultur des zu präparierenden Stammes wurden 500ml LB-Medium angeimpft. Die Kultur inkubierte bei 37°C unter starkem Schütteln bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde im Anschluss auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation mit 4000g für 15min bei 4°C geerntet. Um die Zellen zur Elektroporation einsetzen zu können, ist es notwendig, die Ionenstärke der Zellsuspension stark zu reduzieren. Dies wird durch mehrere Waschschrte erreicht. Die Zellen wurden zunächst in 400ml kalten H₂O bidest resuspendiert, wie o.a. abzentrifugiert, in 200ml kalten H₂O bidest resuspendiert, erneut wie o.a. abzentrifugiert und dann in 20ml 10%igen Glycerin aufgenommen. In einem letzten Zentrifugationsschritt (s.o) wurden die Zellen geerntet und in 1ml 10%igen Glycerin aufgenommen. Aliquots zu 42µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

Material:

- LB-Medium (1fach)
- Glycerin 10%

2.3.3.2 Herstellung von kompetenten *B. subtilis* Zellen

In einem 200ml Erlenmeyerkolben wurde zunächst eine Vorkultur angelegt. Hierfür wurden 10ml SPI-Medium in den Kolben gegeben, welches anschliessend mit einem von einer Agarplatte gepickten *B. subtilis* Klon beimpft wurde. Es folgte eine Inkubation unter starkem Schütteln über Nacht bei 30°C. Die Vorkultur wurde am darauffolgenden Tag in einen mit 100ml SPI-Medium versehenen 1l Kolben überführt und unter sehr starkem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit dauerte hier so lange an, bis das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht war. Aufgrund des Umstandes, dass *B. subtilis* von Präparation zu Präparation im Wachstumsverhalten variieren kann, musste alle 30min die OD₆₀₀ gemessen und ein Graph zur Dokumentation des Wachstumsverhaltens erstellt werden. War das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht, wurden 10ml der Kultur entnommen und in einen 1l Kolben überführt, der 90ml auf 37°C vorgewärmtes SPII-Medium enthielt. Es folgte eine Inkubationszeit von 90min unter sehr starkem Schütteln bei 37°C. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 10min bei 4000g und Raumtemperatur zentrifugiert. 9ml des Überstandes wurden entnommen und mit 1ml Glycerin versetzt, der restliche Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde anschliessend in der 10%igen Glycerinlösung resuspendiert und zügig in Aliquots zu 500µl aufgeteilt. Die kompetenten *B. subtilis* Zellen lagerten bis zum Gebrauch bei -70°C.

Material:

- LB-Agar
- SP-Medium (4fach): 0,8g (NH₄)₂SO₄, 5,6g K₂HPO₄, 2,4g KH₂PO₄, 0,4g Tri-Natrium-Citrat*2H₂O, 0,08g MgSO₄*7H₂O, 0,08g Casaminsäuren, 0,4g Hefeextrakt ad 100ml H₂O bidest. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt und die Lösung anschliessend autoklaviert.
- Glukose 20%
- Thymin-Lösung: 80mg Thymin, 22,8ml H₂O bidest.
- HTM-Aminosäure-Lösung: 20mg Histidin, 20mg Threonin, 20mg Methionin, 20ml H₂O bidest.
- SPI-Medium: 25ml SP-Medium 4fach, 2,5ml Glukose 20%, 2,86ml Thymin-Lösung, 5ml HTM-Aminosäure-Lösung ad 100ml H₂O bidest.
- SPII-Medium: 22,5ml SP-Medium 4fach, 2,25ml Glukose 20%, 2,6ml Thymin-Lösung ad 90ml H₂O bidest.
- Glycerin 10%

2.3.4 Transformation in Bakterien

Transformationen rekombinanter DNA in *E. coli* wurden über die Methode der Elektroporation nach einem auf einer Veröffentlichung von Dower *et al.* [68] basierenden

Protokoll durchgeführt oder unter Verwendung eines kommerziellen Klonierkits der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Mit dem Topo TA Cloning Kit wurden PCR-Produkte direkt in den zu dem Kit gehörenden Vektor pCR2.1 kloniert und im Folgeschritt in den mitgelieferten *E. coli* Top10 Stamm transformiert. Die Transformationsprozedur richtete sich exakt nach den Herstellerangaben. Daher wird an dieser Stelle auf eine vertiefende Darstellung verzichtet.

Die Transformation rekombinanter DNA in *B. subtilis* ist die Grundvoraussetzung für den Transfer dieser DNA zu *C. difficile* über Transkonjugation.

2.3.4.1 Transformation in *E. coli* über Elektroporation

E. coli kann in konzentrierter Suspension mit einer kleinen DNA-Menge kurzzeitig einem elektrischen Feld ausgesetzt und auf diese Weise transformiert werden [68]. Hierbei ist es wichtig, dass die Zellsuspension eine geringe elektrische Leitfähigkeit (Ionenstärke) hat. Die zu transformierende DNA aus einer Ligationsreaktion wurde, um die Transformationseffizienz zu erhöhen, für 10min bei 65°C inkubiert. Es kommt so zur Inaktivierung der Ligase [69]. Zur Transformation wurden die elektrokompenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 42µl der Zellen wurden im Anschluss mit 8µl DNA-Lösung (1-3ng DNA) gemischt und sofort in eine auf Eis gekühlte Transformationsküvette überführt. Nach 60sek wurde die Zellsuspension dem Elektroporationspuls (25µF Kapazität, 2,1kV Spannung, 200Ω) ausgesetzt und zügig zu 950µl auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium überführt. Es folgte eine Inkubationszeit von 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln. Zur Selektionierung der positiven Transformanten wurden die Zellen anschliessend auf LB-Agarplatten mit dem erforderlichen Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Material:

- SOC-Medium: LB-Medium (1fach), 10mM MgCl₂, 100mM MgSO₄, 20mM Glukose.
- LB-Agar

2.3.4.2 Transformation in *B. subtilis*

Die für die Transformation benötigten kompetenten *B. subtilis* Zellen wurden zügig bei 37°C aufgetaut und mit etwa 10µg der zu transformierenden DNA versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln. Im Anschluss daran wurden 5ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium (1fach) zugegeben und der Ansatz für 90min bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Jeweils 500µl dieser Suspension wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die zur Selektion das Antibiotikum Erythromycin in einer Konzentration von 100µg/ml enthielten. Der im Rahmen dieser Promotionsarbeit konzipierte

und generierte Vektor pTransfer1 (vgl. 3.4.1) bietet die Selektionsmöglichkeit über dieses Antibiotikum. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C.

Material:

- LB-Medium (1fach)
- LB-Agar (100µg/ml Erythromycin)

2.3.5 Transkonjugation von *B. subtilis* zu *C. difficile*

Bis zum jetzigen Zeitpunkt war es nicht möglich, für *C. difficile* eine der gängigen Transformationsmethoden, wie z.B. Elektrotransformation oder Hitzeschocktransformation, zu etablieren. Nur eine einzige, sehr anspruchsvolle Methode, führt zu stabilen Transformationen in *C. difficile* [70]. Hierbei wird das in *B. subtilis* befindliche konjugative Transposon Tn916 als Vehikel für die zu transformierende DNA benutzt. Die zu transformierende DNA ist über homologe Rekombination in das *tetM*-Gen integriert und damit zum Bestandteil des Transposons Tn916 geworden. Die homologe Rekombination wird durch zu *tetM* komplementäre Sequenzen ermöglicht, welche die zu transformierende DNA beidseitig flankieren. Der Vektor pTransfer1 trägt diesen Erfordernissen genüge (vgl. 3.4.1). Bei der Transkonjugation kommt es zunächst zur Exzission des Transposons Tn916, gefolgt von einer Zirkularisierung des Elements und schliesslich zum Transfer zu dem Rezipienten [71, 72]. Nach dem Transfer findet bei dem Rezipienten *C. difficile* eine Integration von Tn916 in das Bakterienchromosom statt. Diese Integration erfolgt nicht an einer beliebigen Stelle, sondern im Bereich AT-reicher Regionen, die eine limitierte Homologie zu den Transposonenden aufweisen [71, 72]. Für *C. difficile* sind bislang zwei dieser Hot Spots identifiziert, wovon einer näher charakterisiert wurde [73, 74].

Der als Donor fungierende *B. subtilis* Stamm BS49 hatte zuvor über Transformation (vgl. 2.3.4.2) die in *C. difficile* zu transferierende DNA erworben. Der Stamm wurde auf LB-Agar mit 100µg/ml Erythromycin bei 37°C über Nacht angezogen. Es war darauf zu achten, dass die Platte komplett von einem Bakterienrasen bedeckt war. Ebenso wurde der als Rezipient dienende *C. difficile* Stamm CD37 auf einer Schaedler Blutplatte oder auf *C. difficile* Selektivagar über Nacht bei 37°C im Anaerobier Brutschrank angezogen. Hier musste ebenfalls die gesamte Platte bewachsen sein. Die CD37 Klone wurden am Folgetag in 10ml BHI-Medium überführt und über einen Zeitraum von 5h bis zu einer deutlichen Trübung bei 37°C anaerob wachsen gelassen. Die *B. subtilis* BS49 Klone wurden 2h später ebenfalls von der Platte in 10ml BHI-Medium überführt und 3h bei 37°C unter starkem Schütteln aerob inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden beide Kulturen unter anaeroben Bedingungen gepoolt, aus dem Anaerobier Brutschrank ausgeschleust und bei Raumtemperatur und 4000g für 10min zentrifugiert. Der Ansatz wurde wiederum in den Anaerobier Brutschrank eingeschleust und der Überstand dort dekantiert. Das Pellet wurde dann in 1ml BHI-Medium

resuspendiert. Zum Ausplattieren des Bakteriengemischs wurden zuvor BHI-Agarplatten vorbereitet, in deren Mitte ein Nitrocellulose Rundfilter platziert wurde. In Aliquots zu jeweils 100µl wurde dann das Bakteriengemisch auf die Filter aufgebracht und mit einem Einwegspatel sorgfältig ausgebreitet. Die Platten inkubierten 24h bei 37°C im Anaerobier Brutschrank. Innerhalb dieses Zeitfensters vollzieht sich der Transkonjugationsprozess. Am Ende dieser Inkubationszeit wurde jeweils ein Filter von der Platte gelöst und in ein Plastikgefäß mit 1ml BHI-Medium überführt. Durch vortexen konnten die Bakterien vom Filter in das Medium übertragen werden. Es folgte ein Ausplattieren auf Selektivplatten. Dabei handelte es sich um Brucella-Agar mit 5% Schafsblut, dem zwecks Selektion von *C. difficile* Transkonjuganten Rifampicin (25µg/ml) und Erythromycin (75µg/ml) zugesetzt war. Dabei selektioniert Rifampicin auf *C. difficile*, die Erythromycinresistenz wurde über den Vektor pTransfer1 in das transkonjugierte Transposon Tn916 eingebracht (vgl. 3.4.1). Jeweils 6 dieser Platten wurden für einen Filteransatz verwendet. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 72-96h im Anaerobier-Brutschrank bei 37°C konnten transkonjugierte *C. difficile* CD37 Klone identifiziert werden.

Material:

- Nitrocellulose Rundfilter
- LB-Agar (100 µg/ml Erythromycin)
- Schaedler Blutplatten oder *C. difficile* Selektivagar
- BHI-Medium
- BHI-Agar
- Brucella-Blut-Selektivagar: 45g Brucella-Agar ad 950ml H₂O. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 45°C werden 50ml Schafsblut zugegeben, sowie zur Selektion Rifampicin (25µg/ml) und Erythromycin (75µg/ml).

2.4 Arbeiten mit DNA

2.4.1 Präparation von DNA

2.4.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Methode der Mini-Präparation wurde eingesetzt, um Plasmid-DNA aus *E. coli* in kurzer Zeit für Restriktionsanalysen, Transformationen, PCR-Amplifikationen, Klonierungen und Sequenzierungen zur Verfügung zu haben. Die Methode beinhaltet als grundlegende Schritte die Kultur der Bakterien im Verbund mit der Amplifikation des Plasmids,

Zentrifugation und Lyse der Bakterien und schliesslich Reinigung der Plasmid-DNA. Die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, welches im Plasmid Mini Protokoll der Firma Qiagen umgesetzt wurde. Bis auf die Änderung, dass nach dem ersten Zentrifugationsschritt auf die Anionentauscher-Säulen verzichtet und die Plasmid-DNA stattdessen sofort präzipitiert wurde, entsprachen Vorgehen und Materialien exakt den Herstellerangaben. Aus diesem Grund wird auf eine ausführliche Darstellung hier verzichtet.

2.4.1.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Qiagen-tip 100 Kit der Firma Qiagen verwendet. Anwendung und Materialien richteten sich nach den Herstellerangaben. Es konnten auf diese Weise 50-100µg Plasmid-DNA präpariert werden.

Material:

- Qiagen-tip 100 Kit

2.4.1.3 Präparation chromosomaler DNA aus Clostridien

Der zu präparierende Clostridienstamm wurde in einer 50ml Kultur mit modifiziertem Wilkins-Chalgren Medium bis in die frühexponentielle Wachstumsphase wachsen gelassen (OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6). Durch Zentrifugation bei 5000U/min für 10min bei 4°C wurden die Zellen geerntet, anschliessend mit 10ml kaltem Aceton gewaschen und bei -20°C über Nacht gelagert. Das Pellet wurde am Folgetag in 200µl 2mM Essigsäure (pH 4,0) aufgenommen und im Falle von *C. difficile* mit 50 Units Lysostaphin versetzt. Bei anderen clostridialen Spezies wurden 100µl Lysozym (10µg/µl) zugesetzt. Es folgte eine Inkubation für 20min bei 37°C. Nach Zugabe von 500mg Proteinase K inkubierte der Ansatz für weitere 20min bei 37°C. Die Zugabe von 40µl SDS 20%, gefolgt von einer Inkubation von 20min bei 60°C vervollständigte den Zellaufschluss. Die inzwischen klare und hochvisköse Lösung wurde mit 1mg RNase versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Die chromosomale DNA wurde anschliessend mit $\frac{1}{10}$ Volumen 5M NaCl und $2\frac{1}{2}$ Volumen Ethanol 96% auf Eis gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 20min bei 13000U/min wurde die chromosomale DNA kurz getrocknet und in 400µl TE 10/1 gelöst. Anschliessend erfolgte eine Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (25:24). Die präparierte chromosomale DNA wurde dann über gelektrophoretische Auftrennung auf einem 1% Agarosegel auf Degradation hin überprüft, spektrophotometrisch vermessen und bei 4°C gelagert.

Material:

- Wilkins-Chalgren Medium (modifiziert)

- Aceton (-20°C)
- Essigsäure 2mM, pH 4,0
- Lysostaphin (50Units/50µl): 0,5mg Lysostaphin wurden in 1ml 2mM Essigsäure pH 4,0 aufgenommen und in Aliquots zu 50µl bei -20°C gelagert.
- Lysozym (10µg/µl): 10mg Lysozym wurden in 1ml 12,5mM CDTA/12,5mM Tris HCl pH 8,0 aufgenommen und in Aliquots zu 100µl bei -20°C gelagert.
- Proteinase K (250µg/µl): 10mg Proteinase K wurden in 1ml DEPC behandeltem H₂O aufgenommen und in Aliquots zu 25µl bei -20°C gelagert.
- SDS 20%
- RNase (10µg/µl)
- 5M NaCl
- Ethanol 96%
- TE 10/1: 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 7,5
- Phenol/Chloroform (25:24)

2.4.2 Modifikation von DNA

2.4.2.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die die Phosphodiesterbindungen an definierten Erkennungsstellen einer doppelsträngigen DNA spalten. Ihre biologische Funktion ist die Degradation fremder DNA in der Bakterienzelle. Eigene DNA wird durch Methylierung geschützt. Für die Aktivität sind Mg²⁺-Ionen essentiell. Man unterscheidet drei Klassen von Restriktionsendonukleasen, von denen allerdings zumeist nur eine Klasse, die Typ II Endonukleasen, gentechnisch genutzt wird. Hier sind Bindungs- und Schnittstellen identisch.

Für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden 0,5-1µg DNA in einem 30µl Ansatz mit 3-10 Units des ausgewählten Restriktionsenzym versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Ein Restriktionsverdau mit chromosomaler DNA, die in Konzentrationen von 10-20µg eingesetzt wurde, erforderte eine entsprechend höhere Enzymkonzentration. Hier wurden 50-100 Units des ausgewählten Restriktionsenzym dem Ansatz zugesetzt und die Inkubationszeit auf mindestens 3h bei 37°C erhöht. Für die Restriktionsverdaus wurde das vom jeweiligen Hersteller empfohlene Reaktionspuffersystem eingesetzt.

2.4.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Bei der Dephosphorylierung werden 5'-Phosphatgruppen an den DNA-Enden abgespalten. Damit wird die durch die Ligase katalysierte Zirkularisierung linearer, doppelsträngiger DNA verhindert, da hierfür endständige 5'-Phosphatreste notwendig sind. Das dazu eingesetzte Enzym ist die alkalische Phosphatase (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIP).

Die geschnittene und gefällte DNA wurde in einem möglichst geringen Volumen TE 10/1 gelöst, mit 5µl 10X CIP-Puffer versetzt und mit H₂O auf ein Volumen von 48µl aufgefüllt. Es folgte der Zusatz von CIP (0,1Units/pmol 5'-Enden). Bei der Dephosphorylierung von überhängenden 5'-Enden wurde 30min bei 37°C inkubiert, nochmals CIP zupipettiert und wiederum 30min bei 37°C inkubiert. Bei glatten Enden oder 3'-Überhängen wurde je 15min bei 37°C und nachfolgend 15min bei 56°C inkubiert. Diese Arbeitsschritte wurden nach erneuter CIP Zugabe wiederholt. Anschliessend wurden 40µl H₂O, 10µl 10X STE-Puffer und 5µl SDS 10% zugegeben und die CIP inaktiviert, indem der Ansatz für 15min bei 68°C inkubiert wurde. Danach wurde je zweimal mit Phenol/Chloroform (25:24) und Chloroform extrahiert, die wässrige Phase mit ¹/₁₀ Volumen 5M NaCl und 2¹/₂ Volumen Ethanol 96% gefällt, zentrifugiert und nach dem Trocknen die DNA in TE 10/1 aufgenommen.

Material:

- CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
- CIP-Puffer: 10mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 10mM Spermidin, 0,5M Tris-HCl pH 9,0
- STE-Puffer: 1M NaCl, 10mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0
- SDS 10%
- 5M NaCl
- Ethanol 96%
- TE 10/1

2.4.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die in eine Ligrationsreaktion eingebrachten DNA-Konzentrationen waren in einer Größenordnung von 50-500ng. Dabei wurde ein Vektor/Insert Verhältnis von 1:2, 1:3 oder 1:4 eingestellt. Bei sticky-end Ligationen bestand der Reaktionsansatz aus der Vektor/Insert DNA, 1Unit T4-DNA-Ligase in 1X Ligationpuffer A mit 1mM ATP. Es folgte eine Inkubation von 16h bei 4°C. Bei blunt-end Ligationen bestand der Ansatz aus der Vektor/Insert DNA, 5Units T4-DNA-Ligase in 1X Ligationpuffer B mit 1mM ATP. Auch hier wurde 16h bei 4°C inkubiert. Vor der Verwendung für eine Transformation durch Elektroporation wurde die Ligase durch Inkubation bei 65°C für 10min inaktiviert.

Material:

- T4-DNA-Ligase
- Ligationspuffer A (10X): 20mM DDT, 100mM MgCl₂, 250mM Tris-HCl pH 7,8
- Ligationspuffer B (5X): 5mM DDT, 25mM MgCl₂, 25% (w/v) PEG 6000, 250mM Tris-HCl pH 7,6
- 100mM ATP

2.4.2.4 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Anschliessend wurde Ethidiumbromid zugesetzt (Endkonzentration 1µg/ml) und nach Abkühlung auf etwa 50°C wurde die Agarose zur Polymerisation in einen Gelträger mit Auftragskamm gegossen. Die Agarosekonzentration variierte entsprechend den experimentellen Anforderungen zwischen 1% und 3%. Die DNA-Lösungen wurden mit einem Farbmaler (z.B. Bromphenolblau) gemischt. Nachdem der Gelträger in eine mit TAE-Puffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer übertragen wurde, konnten die Proben in die Geltaschen pipettiert werden und nachfolgend die Elektrophorese bei 5-10V/cm für 1-3h durchgeführt werden.

Material:

- Agarose
- TAE-Puffer: 1mM EDTA, 40mM Tris/Acetat pH 8,3

2.4.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode beruht auf der Bindung von DNA an Glasbeads (Glaskügelchen), wobei hier das Protokoll des QIAEX Gel Extraction Kits der Firma Qiagen zur Verwendung kam. Das methodische Vorgehen und die verwendeten Materialien richteten sich nach den vom Hersteller gemachten Angaben.

Material:

- QIAEX Gel Extraction Kit

2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäureabschnitten definierter Länge und definierter Sequenz. Neben der Standard PCR Methode kamen im Rahmen dieser Arbeit auch die Inverse PCR und RT-PCR zur Anwendung. Die

Amplifikationen wurden mit einem Thermocycler der Firma Biorad durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen aller PCR-Amplifikationen sind im Anhang B aufgeführt.

2.4.3.1 Standard PCR

Als Template für eine Standard PCR wurde chromosomale DNA (100ng), Plasmid DNA (10ng) oder von Agarplatten gepickte Klone von Bakterien verwendet. Dem Reaktionsansatz wurden 15pmol eines jeden Primers zugesetzt, 1Unit *Taq* DNA Polymerase zupipettiert und mit einem Standard-Reaktions-Mix auf ein 50µl Gesamtvolumen gebracht.

Material:

- *Taq* DNA Polymerase
- Standard-Reaktions-Mix: 5mM KCl, 3mM MgCl₂, 0,1mg/ml BSA, 0,08% Nonidet P40, 200µM dNTP, 10mM Tris-HCl pH 8,8, H₂O

2.4.3.2 Inverse PCR

Die Inverse PCR kommt zur Anwendung, wenn unbekannte DNA-Sequenzen analysiert werden sollen. Ausgehend von einem bekannten DNA-Abschnitt kann die Sequenz flankierender unbekannter Regionen ermittelt werden.

Es wurden 2-5µg chromosomale DNA über einen Zeitraum von mindestens 2h restriktionsverdaut. Der Verdauansatz wurde mit TE 10/1 auf ein Volumen von 100µl aufgefüllt. Im Anschluss daran erfolgte eine Extraktion mit einem ³/₄ Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Phenolreste wurden über eine darauffolgende Chloroformextraktion vollständig entfernt. Die DNA wurde mit ¹/₂ Volumen Isopropanol und ¹/₁₀ Volumen NaClO₄ gefällt, mit kaltem Ethanol 70% gewaschen und in 50-100µl TE 10/1 aufgenommen. Es folgte eine Zirkularisierung von 0,1µg der verdauten DNA über Selbstligation, gefolgt von einer Wiederholung der beschriebenen Extraktionsschritte. Die zirkuläre DNA wurde in 50µl TE 10/1 aufgenommen. Bei der jetzt folgenden Standard PCR wurden Primer eingesetzt, die komplementär zum gleichen DNA-Strang waren und damit bei linearisierter DNA kein Amplifikat liefern können. Bei Verwendung von zirkulärer DNA als Template erfolgte jedoch die Amplifikation von PCR-Produkten mit flankierenden, unbekanntem Sequenzabschnitten. Die auf diese Weise gewonnenen PCR-Produkte wurden nach Klonierung der Sequenzierung zugeführt.

Material:

- TE 10/1
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
- Chloroform

- Isopropanol
- 5M NaClO₄
- *Taq* DNA Polymerase
- Standard-Reaktions-Mix: 5mM KCl, 3mM MgCl₂, 0,1mg/ml BSA, 0,08% Nonidet P40, 200µM dNTP, 10mM Tris-HCl pH 8,8, H₂O

2.4.3.3 RT-PCR

Bei der RT-PCR wird anstelle von Plasmid-DNA oder chromosomaler DNA cDNA als Template für die PCR-Amplifikation verwendet. Die cDNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert. Dabei muss gewährleistet sein, dass kontaminierende DNA zuvor vollständig entfernt wurde.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RT-PCRs wurde cDNA eingesetzt, deren Synthese eine Reinigung der RNA nach Kedzierski *et al.* vorausging (vgl. 2.5.2 und 2.5.3) [75]. Dem Reaktionsansatz wurden 2µl cDNA zugesetzt, 1Unit *Taq* Polymerase, 15pMol eines jeden Primerpaares sowie der Standard-Reaktions-Mix. Damit entsprach der Ansatz bis auf das Template dem Standard PCR Ansatz.

Material:

- *Taq* DNA Polymerase
- Standard-Reaktions-Mix: 5mM KCl, 3mM MgCl₂, 0,1mg/ml BSA, 0,08% Nonidet P40, 200µM dNTP, 10mM Tris-HCl pH 8,8, H₂O

2.4.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde als Cycle-Sequencing mit Hilfe des Thermo-Sequenase Kits der Firma Amersham und des Sequenzier-Automaten LI-COR DNA-Sequencer Modell 4000L der Firma LI-COR durchgeführt. Im Wesentlichen wurde unter Verwendung der empfohlenen Materialien nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

Für die Sequenzierreaktion war zunächst die Konzentration der Plasmid-DNA einzustellen. Die Richtlinie des Herstellers gab 130ng/kb Plasmid-DNA vor. Die DNA wurde dementsprechend verdünnt, so dass die erforderliche Konzentration in 2,5µl H₂O gelöst war. Bei der Sequenzierreaktion wurden zu 2,5µl Plasmid-DNA, 0,5µl des fluoreszenzgelabelten Primers (1pmol) und 1µl des jeweiligen Nukleotid-Mixes (aus dem Thermo-Sequenase-Kit) gegeben und anschliessend mit Mineralöl überschichtet. Der Nukleotid-Mix enthält bereits alle benötigten dNTPs sowie das jeweilige ddNTP, den Reaktionspuffer und das Enzym Thermo-Sequenase. Die Cycle-Sequencing Reaktion erfolgte in einem Thermocycler der Firma Biorad unter den folgenden Bedingungen: 2min bei 94°C zur initialen Denaturierung,

darauffolgend 30 Zyklen bestehend aus 30sek bei 94°C, 30sek bei einer dem Primer angepassten Annealingtemperatur und 45sek bei 70°C zur Primerextension. Anschliessend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3µl Stop-Mix abgestoppt. Das Sequenziergel bestand aus 7M Harnstoff, TBE (1fach), DMSO 1% sowie aus einer von der Länge des Gels abhängigen Menge des Acrylamid-Mixes Rapid-Gel-XL (40%) der Firma Amersham. Die Polymerisierungsreaktion wurde durch Zugabe von $\frac{1}{1000}$ Volumen APS 10% und $\frac{1}{100}$ Volumen TEMED gestartet. Nach 1-2h war das Sequenziergel verwendungsfähig. Es wurden dann 1-1,5µl der Sequenzierreaktionen pro Spur auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Gellänge von 66cm innerhalb von etwa 20h bei 2200V, 25mA, 50W und 45°C.

Material:

- TBE-Puffer (10fach): 1M Tris-HCl, 0,83M Borsäure, 10mM EDTA
- Harnstoff
- Dimethylsulfoxid (DMSO) 1%
- APS 10%: Amoniumpersulfat
- TEMED: N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
- Stop-Mix: Formamid 95%, 10mM EDTA (pH 7,6), Xylen Cyanol 0,1%, Bromphenolblau 0,1%
- Thermo-Sequenase-Kit

2.4.5 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Einführung von Nukleotid-Austausch Mutationen in DNA-Sequenzen wurde das Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Clontech verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäss den Herstellerangaben und soll hier nur kurz zusammengefasst werden.

Nachdem die doppelsträngige Plasmid-DNA durch kurzzeitiges Kochen im Wasserbad denaturiert war, erfolgte ein Annealing von zwei verschiedenen Primern. Der Selektionsprimer sollte eine Restriktionsschnittstelle zerstören, die nur einmal in dem Plasmid vorkommt. Der Mutageneseprimer sollte die gewünschte Mutation einführen. Anschliessend erfolgte die Zweitstrangsynthese durch eine T4-DNA-Polymerase und die kovalente Verknüpfung der DNA durch die DNA-Ligase. Vor der folgenden Transformation der DNA wurde ein Restriktionsverdau mit der Endonuklease durchgeführt, deren Schnittstelle durch Einführung des Selektionsprimers zerstört wurde. Dieser Schritt, welcher der Selektion der mutierten DNA diente, basiert auf der Feststellung, dass linearisierte DNA mit einer etwa 100fach geringeren Effizienz transformiert wird als zirkuläre DNA [76]. Die Transformation der so vorbereiteten DNA erfolgte durch Elektroporation in den *E. coli* Stamm BMH71-18mutS, der durch eine Defizienz des postreplikativen Mismatch-Reparatur-Systems gekennzeichnet ist. Nach der Präparation der Plasmid-DNA erfolgte ein wiederholter Restriktionsverdau zur Selektion der mutierten DNA und eine zweite Transformation in den

E. coli Stamm BMH71-18mutS oder DH5 α . Von den gewachsenen Klonen wurden einige zur Präparation von Plasmid-DNA ausgewählt, zur Kontrolle einem Restriktionsverdau unterzogen und anschliessend einer Sequenzierung zugeführt.

Material:

- Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit

2.4.6 Southern Hybridisierung

Bei diesem Verfahren werden DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und anschliessend aus der Gelmatrix des Trenngels auf eine geeignete Trägermembran (z.B. Nylon) übertragen und dort immobilisiert. Das Trennmuster der DNA-Fragmente bleibt dabei erhalten. Um spezifische DNA-Fragmente auf der Membran sichtbar zu machen, bedient man sich der Nukleinsäure-Hybridisierung mit markierten Nukleinsäuren, die als Sonde eingesetzt werden. Diese Methode erlaubt es nicht nur die Anwesenheit einer spezifischen DNA-Sequenz nachzuweisen, es ist auch möglich, Aussagen über die Größe der detektierten DNA-Fragmente zu machen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Southern Hybridisierungen wurden alle mit dem Renaissance Kit der Firma DuPont NEN durchgeführt. Als Trägermembran wurde die QIABRANE Nylon Plus Membran der Firma Qiagen verwendet. Die auf einem 1%igen Agarosegel über Gelelektrophorese aufgetrennte DNA wurde vor dem Blotting auf die Membran in 0,25M HCl geschwenkt. Die auf diese Weise bewirkte Depurinierung erleichtert den Transfer von DNA-Fragmenten mit einer Größe von mehr als 10kb. Zum Blotting wurde ein Vacuumblotter verwendet, als Transferpuffer diente 0,4M NaOH. Die Verwendung von NaOH als Transferpuffer führte zu einer Denaturierung der DNA während des Transferprozesses. Die positive Ladung der verwendeten Membran erübrigte weitere Arbeitsschritte zur Immobilisierung der DNA. Anschliessend erfolgte das Markieren der als Sonde vorgesehenen DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein. 1-3 μ g der DNA wurden in die Labeling-Reaktion eingebracht, die den Herstellerangaben entsprechend mit den im Kit enthaltenen Materialien durchgeführt wurde. Die Labeling-Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l 0,1M EDTA pH 8,0 abgestoppt. Die Sonde war damit für die Hybridisierungsreaktion einsatzbereit. Die Membran wurde zunächst in SSC (5fach) angefeuchtet und daraufhin mit Prehybridisierungspuffer (0,1ml/cm² Membranfläche) luftblasenfrei in Folie eingeschweisst. Es folgte eine Inkubation bei leichtem Schütteln und 50°C über einen Zeitraum von 1h. Am Ende der Inkubationszeit wurde der Prehybridisierungspuffer entfernt und die Membran mit Hybridisierungspuffer (0,05-0,1ml/cm² Membranfläche) in eine neue Folie luftblasenfrei eingeschweisst. Dem Hybridisierungspuffer zugesetzt waren die markierte DNA-Sonde (25ng/ml Hybridisierungspuffer) und denaturierte Heringsspermien-DNA (50-100 μ g/ml Hybridisierungspuffer). Es folgte eine Inkubation unter leichtem Schütteln bei 50°C über

Nacht. Die darauffolgenden Stringenz-Waschschritte dienten zur Entfernung der nicht hybridisierten Anteile der DNA-Sonde von der Membran. Es wurde einmal 15min bei 50°C mit 6fach SSC, SDS 1% gewaschen. Im Anschluss daran mit 6fach SSC, SDS 0,1%. Bei der Detektion wurde die dem Kit zugehörige Antifluorescein-HRP-Antikörperlösung entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Die Inkubation der Membran mit dem als Substrat dienenden Chemolumineszenz-Reagenz ermöglichte letztlich die Detektion von spezifischen Signalen. Es folgte eine Filmexposition der Membran von etwa 20min, wobei der BIOMAX MR Film der Firma Kodak verwendet wurde.

Material:

- QIABRANE Nylon Plus Membran
- Renaissance Kit
- 0,25M HCl
- 0,4M NaOH
- 0,1M EDTA pH 8,0
- Heringsspermien DNA
- Prehybridisierungspuffer: SSC 5fach, SDS 0,1%, Blocking Reagenz 0,5%, Dextransulfat 5%.
- Hybridisierungspuffer: Prehybridisierungspuffer mit DNA-Sonde
- Waschpuffer 1: SSC 6fach, SDS 1%
- Waschpuffer 2: SSC 6fach, SDS 0,1%
- BIOMAX MR Film

2.5 Arbeiten mit RNA

2.5.1 RNA-Präparation aus *C. difficile*

Die RNA-Präparation aus *C. difficile* basiert auf einer von Dr. Veit Braun im Labor optimierten und etablierten Methode [77]. Eine 50ml *C. difficile* Anzucht in modifiziertem Wilkins-Chalgren Medium wurde durch Zentrifugation bei 5000U/min für 10min bei 4°C geerntet. Anschliessend erfolgte ein Waschschritt mit 10ml kaltem Aceton. Das Bakterienpellet lagerte dann bei -20°C über Nacht. Das gefrorene Bakterienpellet wurde in 400µl 2mM Essigsäure pH 4,0 aufgenommen und mit 12,5Units Lysostaphin versetzt. Der Ansatz inkubierte 10min bei 37°C und nach der Zugabe von 25µl Proteinase K (250µg) erneut für 10min bei 37°C. Die Zelllyse wurde durch Zugabe von 40µl SDS 20% und 10minütiger Inkubation bei 60°C abgeschlossen. Das Aufschlussgemisch wurde zweimal mit je 400µl 60°C heissem, saurem Phenol extrahiert und die RNA anschliessend mit 40µl 5M NaCl und 1ml Ethanol 96% für 20min in flüssigem Stickstoff gefällt. Es folgte ein

Zentrifugationsschritt und das Trocknen der RNA, welche dann in 95µl DNase-Puffer gelöst wurde. Dem Ansatz wurden 5µl RNase-freie DNase zupipettiert und es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1h. Danach wurde die DNase durch Extraktion mit 100µl Phenol pH 7,0 aus der RNA-Lösung entfernt. Um RNA-Verluste zu minimieren, wurde die organische Phase mit 100µl DNase-Puffer versetzt, der Ansatz gevortext, zentrifugiert und die wässrige Phase abgehoben. Die wässrigen Phasen beider Extraktionsschritte wurden gepoolt, mit 100µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und die RNA mit $\frac{1}{10}$ Volumen 5M NaCl und $2\frac{1}{2}$ Volumen Ethanol 96% gefällt. Die RNA wurde schliesslich in DNase-Puffer aufgenommen und bei -70°C gelagert.

Material:

- Essigsäure 2mM, pH 4,0
- SDS 20%
- Lysostaphin (50Units/50µl): 0,5mg Lysostaphin wurden in 1ml 2mM Essigsäure pH 4,0 aufgenommen und in Aliquots zu 50µl bei -20°C gelagert.
- Proteinase K (250µg/µl): 10mg Proteinase K wurden in 1ml DEPC behandeltem H₂O aufgenommen und in Aliquots zu 25µl bei -20°C gelagert.
- Phenol pH 4,0
- Phenol pH 7,0
- 5M NaCl
- Ethanol 96%
- DNase, RNase-frei
- DNase-Puffer: 6mM MgCl₂, 40mM Tris-HCl pH 7,5

2.5.2 Reinigung der RNA-Präparation

Um Reste verunreinigender DNA zu entfernen, war eine Reinigung der RNA-Präparation nach Kedzierski *et al.* erforderlich [75]. 5µg RNA wurden in 10µl DNase-Puffer mit 10Units DNase für 30min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden 1µl 0,5M EDTA, 20µl 3M Natriumacetat, 170µl TE 10/1 und 300µl Phenol (pH 4,0)/Chloroform (25:24) zupipettiert. Der Ansatz wurde im Anschluss daran gevortext und 10min bei 4°C zentrifugiert. 160µl des Überstandes wurden abgehoben und die gereinigte RNA mit $2\frac{1}{2}$ Volumen Ethanol 96% gefällt. Die RNA wurde in 50µl H₂O aufgenommen und bei -70°C gelagert.

Material:

- DNase-Puffer
- DNase
- 0,5M EDTA
- 3M Natriumacetat
- TE 10/1

- Phenol (pH 4,0)/Chloroform (25:24)
- Ethanol 96%

2.5.3 cDNA-Synthese

Es wurden 12µl gereinigte RNA (~1µg) 5min bei 65°C inkubiert und anschliessend 3min auf Eis gekühlt. Dem Ansatz wurden dann 8µl cDNA-Mix und 1µl Reverse Transkriptase (Negativkontrolle 1µl H₂O) zugegeben, gefolgt von einer 60minütigen Inkubationszeit bei 37°C. Die Reverse Transkriptase wurde dann durch eine 5minütige Inkubation bei 95°C inaktiviert, der Ansatz kurz zentrifugiert und auf Eis schockgekühlt. Bis zu ihrer Verwendung wurde die cDNA bei -70°C gelagert.

Material:

- cDNA-Mix: pro Ansatz 4µl RT-Puffer (5fach), 1µl dNTP-Mix (10mM), 1,5µl Hexanukleotide (100pmol/µl), 0,5µl 0,1M DTT und 1µl RNasin (20Units).
- Superscript Reverse Transkriptase oder H₂O (Negativkontrolle)
- RT-Puffer (5fach): 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 250mM Tris-HCl pH 8,3

2.6 Arbeiten mit Protein

2.6.1 Präparation von *C. difficile* Toxinen

Zunächst erfolgte die unter 2.3.1 beschriebene Anzucht der Bakterien mit einem Dialyseschlauchsystem. Die in dieser Arbeit verwendeten Toxine wurden freundlicherweise von Frau Bettina Kalt an anderer Stelle im Labor präpariert, so dass hier nur ein kurzer, zusammenfassender Überblick präsentiert wird.

Der Kulturüberstand der Flüssigkultur aus dem Dialyseschlauch wurde nach einer Zentrifugation (8000U/min, 20min bei 4°C) von den Bakterien getrennt. Über eine Ammoniumsulfatfällung bei 4°C wurden die Toxine aus dem Kulturüberstand gefällt. Die Fällung war in zwei Teilschritte untergliedert. Die 1. Fällung wurde mit 45% Ammoniumsulfat durchgeführt, was Bedingungen entspricht, unter denen vorwiegend TcdA ausfällt. Die 2. Fällung wurde mit 65% Ammoniumsulfat durchgeführt, was überwiegend zum Ausfallen von TcdB aus dem Kulturüberstand führte. Der Fällung folgte eine Zentrifugation von 30min bei 8000U/min und 4°C. Das Proteinpellet wurde dann in 50mM Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen, über einen Succrosegradienten vorgereinigt und weiterfolgend über Fast-Flow-Liquid-Chromatography (FPLC) mit einer Mono Q-Säule isoliert.

2.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Gelfärbung

Zur Auftrennung der Proteine in der Modifikationsreaktion und zur Darstellung der gereinigten Toxine wurden Minigelkammern (70x50x0,8mm) mit Gelen der Acrylamidkonzentrationen 7,5% benutzt. Zunächst wurde das 7,5% Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen, mit Butanol überschichtet und für mindestens 30min polymerisieren gelassen. Anschliessend wurde das Butanol entfernt, das Gel mit Sammelgel überschichtet und der Auftragskamm eingesetzt. Nach der Polymerisierung des Sammelgels erfolgte der Probenauftrag und die Elektrophorese bei 80-130V im PAGE-Puffer.

Das Färben der Gele erfolgte für etwa 1h unter Schwenken in Coomassie Färbelösung. Die anschliessende Entfärbung der Gele fand über Nacht in einer Entfärbelösung statt.

Material:

- APS 10%: Amoniumpersulfat
- TEMED: N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
- Acylamidstocklösung 30%: 300g Acrylamid, 8g Bisacrylamid in 1l H₂O
- Trenngel: 7,5% Acrylamid, 375mM Tris-HCl (pH 8,8), SDS 0,1%, $\frac{1}{100}$ Volumen APS, $\frac{1}{1000}$ Volumen TEMED, H₂O
- Sammelgel: 3% Acrylamid, 0,08% Bisacrylamid, Tris-HCl (pH 6,8), SDS 0,1%, $\frac{1}{100}$ Volumen APS, $\frac{1}{1000}$ Volumen TEMED
- PAGE-Puffer (5fach): 30g Tris, 144g Glycerin, 5g SDS ad 1l H₂O bidest.
- Färbelösung: Coomassie blue 0,05% (w/v), Essigsäure 10%(v/v), Ethanol in Wasser 50%
- Entfärbelösung: Eisessig 7,5%, Methanol 5%

2.6.3 Proteinbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der in der Glykosylierungsreaktion verwendeten Proteine wurde der Standard Assay nach Bradford eingesetzt [78]. Als Proteinstandard diente BSA in den entsprechenden Konzentrationen.

2.6.4 Glykosylierungsreaktion (Modifikation)

Die Glykosylierung der kleinen G-Proteine durch die LCTs wurde nach veröffentlichten Protokollen durchgeführt [65, 79]. Alle eingesetzten rekombinanten GTPasen standen für die hier beschriebenen Arbeiten zur Verfügung. Zunächst wurden pro Reaktionsansatz 30 μ M (entspricht 0,25 μ Ci) der in einem Ethanol-Wasser Gemisch gelösten [¹⁴C]-UDP-Glukose in Eppendorftubes mit Hilfe einer Speed-Vac eingedampft. In der

Zwischenzeit wurde die rekombinante GTPase (1µg) in einem Gesamtvolumen von 30µl in dem Phosphatpuffer MPBS mit 0,1mM DTT, 5mM GDP, 2mM MgCl₂, 1mM MnCl₂ und BSA (3mg/ml) zusammen mit dem LCT für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration der Toxine TcdA-C34, TcdB-C34, TcdB-1470, TcdB-8864 und TcsL-1522 betrug hierbei 3µg/ml. Die Referenztoxine TcdA-10463 und TcdB-10463 wurden mit 1µg/ml eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschliessend auf die eingedampfte [¹⁴C]-UDP-Glukose pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. Die Glykosylierungsreaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Aufschlusspuffer und Erhitzen auf 95°C für 5min gestoppt. Es folgte die Auftrennung des Modifikationsansatzes auf einem SDS-PAGE (7,5%). Die vakuumgetrockneten Gele wurden einem BIOMAX MR Film (Kodak) für 4-5 Tage exponiert. Alternativ wurden die radioaktiven Banden mit einem Phosphor Imager System (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA) dargestellt.

Material:

- MPBS (1fach): 150mM NaCl, 16mM Na₂HPO₄, 4mM NaH₂PO₄ (pH 7)
- Laemmli-Aufschlusspuffer: SDS 2%, 0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 25% Glycerin/H₂O 50%, β-Mercaptoethanol 5% und eine Spatelspitze Bromphenolblau.

2.6.5 CAT Rapid Assay

Dieser Schnelltest ermöglicht den Nachweis des Enzyms Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) über die Enzymaktivität [80]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Test eingesetzt, um die CAT-Aktivität bei *C. difficile* Isolaten nachzuweisen, die das Gen über Transkonjugation (vgl. 2.3.5) erworben hatten. Die antibiotische Wirkung von Chloramphenicol beruht auf der Bindung an die ribosomale Peptidyltransferase bei Bakterien. Dadurch wird die Proteinbiosynthese blockiert. Die Resistenz entsteht durch eine kovalente Modifikation des Antibiotikums: Das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase überträgt eine Acetyl-Gruppe von Acetyl-Coenzym A auf die primäre Hydroxylgruppe an C6 des Chloramphenicol. Damit ist es dem Antibiotikum nicht mehr möglich an Ribosomen zu binden. Entstandenes CoenzymA kann durch die Reaktion mit dem Farbreagenz 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) nachgewiesen werden [80, 81]. Die Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität bewirkt eine Färbung des Testansatzes von blassgelb bis tiefgelb. Der in der Fachliteratur beschriebene Rapid CAT Assay wurde mit *Haemophilus influenzae* etabliert, daher musste die Methodik zunächst an *C. difficile* angepasst werden.

Von einer Selektivplatte wurden *C. difficile* Klone mit einer Impföse in zwei Eppendorftubes überführt und dort in jeweils 200µl Suspensionslösung aufgenommen. Es folgte die Zugabe von jeweils 50µl Lysozym (10µg/µl) und eine Inkubation für 30min bei 37°C. In jedes Eppendorftube wurden darauffolgend 200µl Reaktionslösung pipettiert. Zu dem als Testansatz ausgewählten Eppendorftube wurden dann 200µl 5mM Chloramphenicol

pipettiert, zu dem als Kontrollansatz vorgesehenen Eppendorftube 200µl H₂O. Es folgte eine Inkubation von 15min bei 37°C. Ein einfacher Farbvergleich des Testansatzes mit dem Kontrollansatz ermöglichte es nun eine Enzymaktivität zu belegen.

Material:

- Suspensionslösung: 1M NaCl, 0,01M EDTA, SDS 0,05%
- Lysozym (10µg/µl)
- Reaktionslösung: 2 Volumen Tris-HCl pH 8,0, 2 Volumen 5mM Acetyl-CoenzymA, 1 Volumen 10mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
- 5mM Chloramphenicol oder H₂O

2.7 PC-Analytik und Software

2.7.1 DNA-Analyse

Die Verarbeitung der vom Sequenziergerät LI-COR DNA-Sequencer Modell 4000L gelieferten Daten erfolgte mit Programmen, die der Hersteller LI-COR mit dem Gerät gemeinsam auslieferte. Das Tool Data Collection V2.31 steuerte das Sequenziergerät und sammelte die Daten. Mit dem Programm Image Analysis V4.20 wurden die Rohdaten in primäre Sequenzdaten umgewandelt. Die weitere Verarbeitung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programmpaket LaserGene der Firma DNASTAR. Dabei wurden mit dem Tool EditSeq V3.99 die DNA-Sequenzen finalisiert. Für weiterführende Auswertungen und Darstellungen standen die Tools MapDraw V3.14, MegAlign V3.17 und SeqMan V3.60 zur Verfügung.

2.7.2 RNA-Analyse

Die Aufklärung von RNA-Sekundärstrukturen erfolgte mit Hilfe des Programmes MFOLD V3.1 von Professor Michael Zuker, welches online ausgeführt wird und unter der Internetadresse <http://bioinfo.math.rpi.edu/~zukerm/> allgemein zugänglich ist. Alternativ wurde das Programm RNAstructure 3.6 von David H. Mathews verwendet, das auf den Zuker Algorithmen basiert und auch offline auf Windows Rechnern einsetzbar ist. Die Software wird unter <http://rna.chem.rochester.edu> kostenlos zur Verfügung gestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Der Stamm *Clostridium difficile* C34 als Wirt von CdISt1

3.1.1 Der Pathogenitätslokus und die Toxine von *C. difficile* C34

Der Pathogenitätslokus (PaLoc) repräsentiert ein distinktes genetisches Element toxinogener *C. difficile* Isolate [77, 82]. Eine auf PCR-Reaktionen basierende Analyse des PaLocs mit seiner Integrationsstelle kann zu einer ersten Charakterisierung varianter *C. difficile* Stämme beitragen [83]. Dabei werden neun überlappende PCR-Fragmente generiert und mit den korrespondierenden Fragmenten des Referenzstamms *C. difficile* VPI10463 verglichen. Alle im Verlauf dieser Arbeit eingesetzten Primer sind im Anhang A tabellarisch aufgelistet. Die PCR-Analyse lieferte bei zweien der neun PCR-Fragmente von Stamm C34 ein vom Referenztyp abweichendes Größenbild. Das PL2-Fragment dieses Stammes ist um etwa 150 bp größer (Abb. 3.1A). Ein PL2-Fragment dieser Größe ist bei zahlreichen *C. difficile* Stämmen vorzufinden, unter anderem auch bei den varianten Isolaten 1470 und 8864 [83, 84]. Von großer Bedeutung ist die Entdeckung, dass Fragment A1 (toxische Domäne von TcdA) bei Stamm C34 um etwa 2000 bp größer ist als das entsprechende A1-Fragment des Referenzstammes (Abb. 3.1A). Hiermit wurde erstmals eine Vergrößerung im *tcdA*-Gen nachgewiesen.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der gereinigten Toxine des Stammes C34 zeigte, dass TcdA-C34 mit einer Molekülmasse von 308 kDa und TcdB-C34 mit einer Molekülmasse von 270 kDa der Molekülmasse der Referenztoxine TcdA-10463 und TcdB-10463 entsprechen (Abb. 3.1B).

Es ist bekannt, dass Große Clostridiale Zytotoxine Glykosyltransferasen sind, die einen Glukoserest auf kleine G-Proteine übertragen und diese somit inaktivieren [2, 6-9]. Um nachzuweisen, dass TcdA-C34 und TcdB-C34 funktionelle Glykosyltransferasen sind, wurde deren katalytisches Potential mit einer Auswahl von kleinen G-Proteinen der Ras- und Rho-Subfamilie getestet. Dabei konnten die kleinen G-Proteine Rho, Rac, Cdc42 und Rap als Substrate von TcdA-C34 identifiziert werden (Abb. 3.1C). Substrate von TcdB-C34 waren die kleinen G-Proteine Rho, Rac, Cdc42, Rap und Ral (Abb. 3.1C). Damit entspricht das Modifikationsmuster von TcdA-C34 dem des Referenztoxins TcdA-10463 [2, 8, 13], wohingegen das Modifikationsmuster von TcdB-C34 keinem der bislang bekannten Muster zugeordnet werden konnte. Einzelheiten hierzu wurden separat publiziert [85].

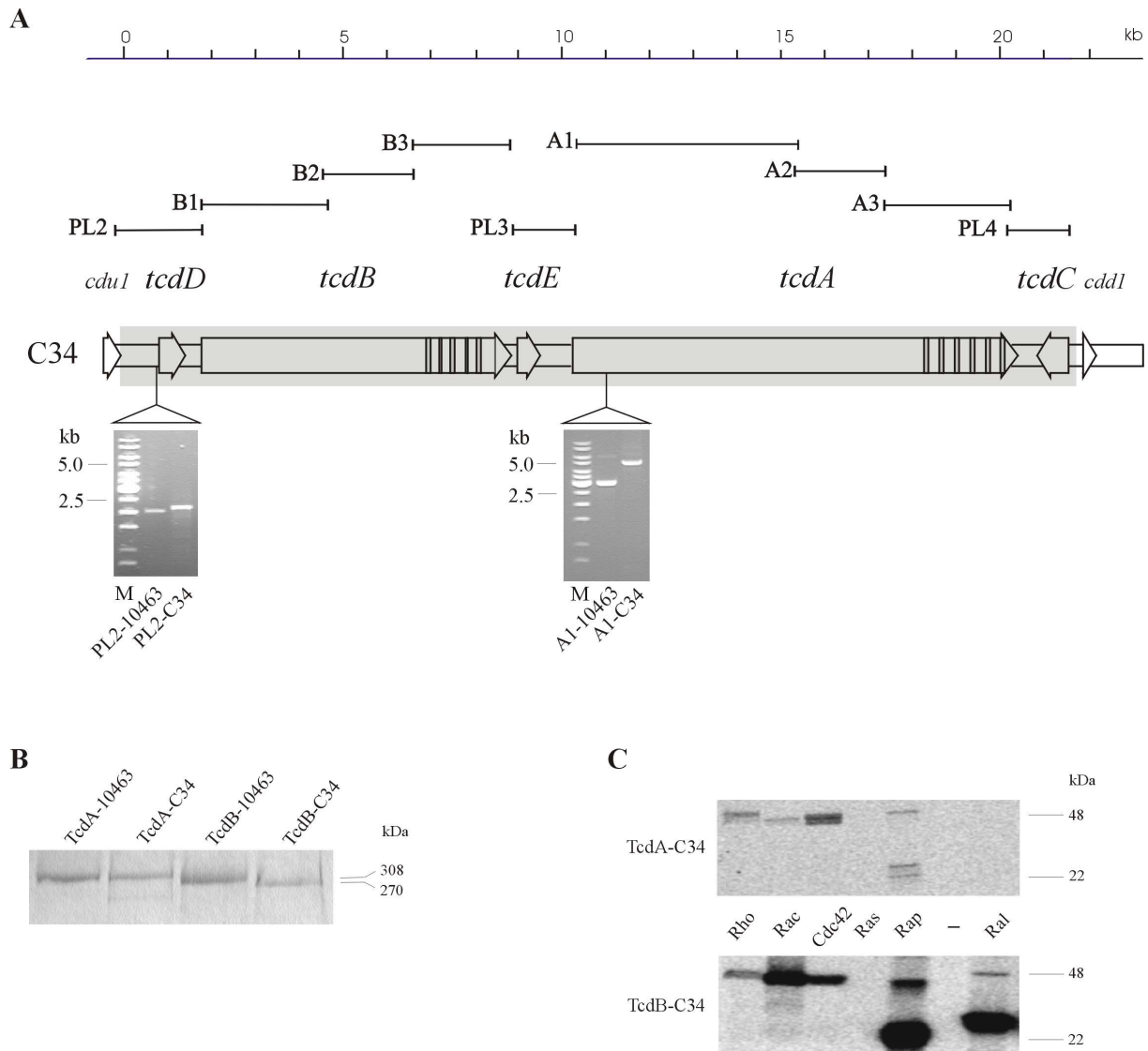


Abb. 3.1: Darstellung des Pathogenitätslokus (PaLoc) von *C. difficile* C34, Größenvergleich der Toxine mit den Referenztoxinen und Dokumentation ihrer katalytischen Eigenschaften. **A:** Der PaLoc. Am 5'- und 3'-Ende des PaLocs befinden sich die flankierenden ORFs *cdul* und *cdd1*. Die Gene *tcdDBEAC* liegen im grau schattierten PaLoc, die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung der jeweiligen Gene wieder. Über der Schemazeichnung befinden sich die den PaLoc umspannenden PCR-Amplifikate gemäss ihrer relativen Position. Unter der Schemazeichnung befinden sich die Abbildungen zweier 1% Agarosegele. Hier wurden die vom Referenztyp abweichenden PCR-Fragmente aufgetragen. Das linke Gel zeigt einen Vergleich der PL2-Fragmente, das rechte Gel zeigt den Vergleich der A1-Fragmente. Als Größenmarker diente die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75 kb. **B:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit über Fast-Flow-Liquid-Chromatography (FPLC) gereinigten Toxinen von *C. difficile* VPI10463 (je 2 µg) und *C. difficile* C34 (je 1 µg). Der Auftrag erfolgte auf einem 7,5% Gel, welches im Anschluss mit Coomassie Blau gefärbt wurde. **C:** Darstellung der Glykosyltransferase Aktivität der Toxine TcdA-C34 und TcdB-C34. Als Substrate wurden die kleinen G-Proteine Rho, Rac, Cdc42, Ras, Rap und Ral angeboten. Das Labeling erfolgte mit radioaktiver [¹⁴C] Glukose, die nach kovalenter Modifikation der kleinen G-Proteine mittels Phospho Imager Analyse zu detektieren ist.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass TcdA-C34 trotz Vergrößerung des Gens keinen Größenunterschied zu TcdA-10463 aufweist (Abb. 3.1B) und auch vom katalytischen Potential her sich dem Referenztoxin konform verhält (Abb. 3.1C). Damit trat an dieser Stelle ein Widerspruch auf, den es zu klären galt. Es erfolgte eine Sequenzanalyse des in den pCR2.1-Vektor des TopoTA Cloning Kits klonierten A1-Fragments von Stamm C34. Hierbei gelang es, die Vergrößerung zu lokalisieren. Sie befindet sich 498 bp downstream des Startcodons von *tcdA*-C34 und hat eine Größe von 1975 bp. Die auf die Vergrößerung folgende Sequenz ist wieder hoch homolog zur *tcdA*-Sequenz des Referenzstammes VPI10463. Die Sequenzierung von drei voneinander unabhängigen Klonen sicherte die erhaltenen Resultate ab. Die Vergrößerung konnte an dieser Stelle als Insertion identifiziert werden, die im weiteren Verlauf als *CdIS1* bezeichnet wird.

3.2 Die Charakterisierung von *CdIS1*

3.2.1 Darstellung des Aufbaus und der Sekundärstruktur von *CdIS1*

Die Nukleotidsequenz der Insertion *CdIS1* wurde auf ihre strukturellen Merkmale hin untersucht. Überraschenderweise konnten der Insertion Merkmale von Gruppe I Introns und von IS Elementen zugewiesen werden.

Die Fähigkeit von Gruppe I Introns zur Durchführung einer autokatalytischen Spleißreaktion liegt in ihrer stark konservierten RNA-Sekundär- und -Tertiärstruktur begründet [31-33, 53]. Trotz des Umstandes, dass verschiedene Gruppe I Introns nur geringe Sequenzhomologien aufweisen, sind vier distinkte Sequenzabschnitte hoch konserviert. Diese Sequenzabschnitte werden mit P, Q, R und S bezeichnet [31-33, 53]. Obligatorisch für Gruppe I Introns sind des weiteren die konservierten Nukleotide U und G an der potentiellen 5'- bzw. 3'-Spleißstelle, die somit die Introngrenzen definieren [31-33, 53]. Alle angesprochenen Sequenzmerkmale lassen sich in der Insertion *CdIS1* wiederfinden. Die Sekundärstruktur von Gruppe I Introns definiert sich über die Ausbildung einer Abfolge von Basenpaarungen, die als Pairings P1-P9 bezeichnet werden [31-33, 53]. Unter Verwendung der von Professor Michael Zuker programmierten Software MFOLD 3.1 konnte für *CdIS1* eine für Gruppe I Introns charakteristische Sekundärstruktur zugewiesen werden (Abb. 3.2A). Die Familie der Gruppe I Introns lässt sich anhand der Sekundärstrukturmerkmale in die vier Untergruppen IA bis ID unterteilen [53]. Auch innerhalb dieser Untergruppen kann über Strukturmerkmale eine weiterfolgende Differenzierung vorgenommen werden [53].



Abb. 3.2: Vergleichende Darstellung der RNA-Sekundärstruktur von *CdIS1* mit Gruppe I Introns des Subtyps IA2. **A:** RNA-Sekundärstruktur des Introns *CdIS1*. Die zu dem Intron gehörenden Nukleotide sind in Großbuchstaben dargestellt, zum Exon gehörende Nukleotide in Kleinbuchstaben. Für Gruppe I Introns sind stark konservierte Nukleotide beschrieben worden [54]. In dieser Abbildung sind sie in Form von orangen Großbuchstaben aufgeführt. Die charakteristischen Nukleotidpaarungen sind als P1-P9 (grau) bezeichnet, die 5'-Spleißstelle ist im P1 Pairing enthalten. Dabei handelt es sich um das stark konservierte Uridin-Guanosin Nukleotidpaar (u-G), welches in orange gekennzeichnet ist. Die Internal Guide Sequence (IGS) ist blau gekennzeichnet und beinhaltet auch Sequenzen des 5'-Exons. Die Domänen P4-P6 und P3-P7-P8 bilden das katalytische Zentrum von Gruppe I Introns aus [53]. Bei den P, Q, R und S Sequenzen handelt es sich um konservierte Regionen des katalytischen Zentrums. Die lila Linie parallel zur Nukleotidsequenz kennzeichnet diese Sequenzen für *CdIS1*. 3' des P9.2 Pairings befinden sich, im Abstand von 192 Nukleotiden, zwei ORFs, die für die potentiellen Transposasen *TlpA* und *TlpB* kodieren. Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung wieder. Das 3' terminale Nukleotid ist ein stark konserviertes Guanosin (orange). Ein 30 Nukleotide umfassender Sequenzabschnitt im 5' Bereich von *CdIS1* weist hohe Homologien zu einem entsprechenden Abschnitt bei dem Insertionselement *IS8301* auf. Anfang und Ende dieses Sequenzabschnitts sind mit einem grünen Stern versehen. **B:** Schemazeichnung des sunY Introns des Phagen T4. Die Zeichnung nach Jaeger und Michel [53] gibt die charakteristische Sekundärstruktur für Gruppe I Introns des Subtyps IA2 wieder.

Ein Vergleich von *CdIS1* mit diesen Untergruppen ergab, dass *CdIS1* die größte Ähnlichkeit mit Introns der Untergruppe IA2 hat (Abb. 3.2B).

Der Sequenzbereich 3' der P9 Domäne von *CdIS1* weist zwei offene Leseraster auf. Das kleinere offene Leseraster erstreckt sich über 105 bp (Position 631-738 von *CdIS1*), das nur durch ein Nukleotid getrennt davon folgende längere offene Leseraster hat eine Größe von 1116 bp (Position 740-1858 von *CdIS1*). Die Leserichtung ist bei beiden offenen Leserastern gleich orientiert. Das größere offene Leseraster beginnt mit dem alternativen Startcodon GTG. Eine mögliche kleinere Variante dieses offenen Leserasters kann 33 bp weiter downstream mit einem ATG Startcodon initiieren. Eine Homologiesuche mit der Aminosäuresequenz der offenen Leseraster wies beiden eine hohe Homologie zu Transposasen zu. Aus diesem Grund wurden die offenen Leseraster als *tlpA* und *tlpB* (transposase-like protein) benannt. Transposasen sind zentraler Bestandteil von IS Elementen. Im Zusammenhang mit Introns sind diese Proteine bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht beschrieben worden. Zudem besitzen Gruppe I Introns nicht notwendigerweise immer ein offenes Leseraster. Nachfolgend wird im Rahmen der Diskussion unter 4.1.2 die Bedeutung der potentiellen Transposasen erörtert.

3.2.2 Funktionelle Analyse von *CdIS1*

Der bei Punkt 3.1.1 angesprochene Widerspruch bezüglich der Größe des Toxins TcdA-C34 und der Größe des korrespondierenden Gens *tcdA*-C34 lässt sich über eine mögliche Spleißaktivität von *CdIS1* aufklären. Da Gruppe I Introns zusammen mit Gruppe II Introns zu den selbstspleißenden Introns zählen ist davon auszugehen, dass Wirtsproteine für die katalytische Aktivität nicht essentiell sind. Daher ist eine Untersuchung der Spleißaktivität von *CdIS1* über die Methode der RT-PCR möglich. Da der Spleißvorgang auf Ebene der RNA abläuft, wurde die Gesamt-RNA von *C. difficile* C34 zur cDNA-Synthese verwendet und diese als Template für die RT-PCR Analysen eingesetzt. Über die Primerpaare ICheck1/ICheck2 und ICheck3/ICheck4 gelang ein Transkriptionsnachweis der 5'- bzw. 3'-Übergänge des *tcdA*-C34 Gens und *CdIS1* (Abb. 3.3A). Damit ist belegt, dass keine RNA-Strukturen ausgebildet werden, die zu einer Termination der Transkription führen könnten.

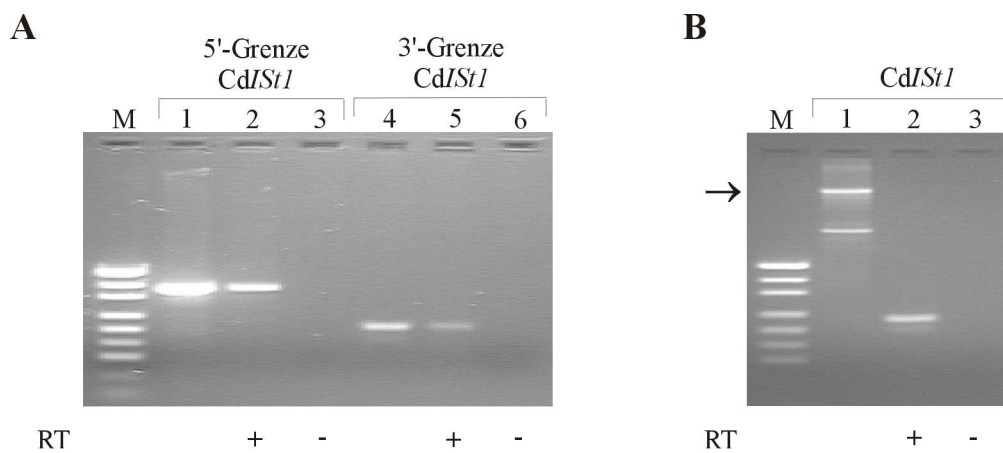


Abb. 3.3: RT-PCR Analyse mit *CdIS1* zum Nachweis des Spleißvorganges. **A:** Der 5'-Exon-Intron Übergang wurde mit dem Primerpaar ICheck1/ICheck2 amplifiziert, der 3' Übergang mit dem Primerpaar ICheck3/ICheck4. Als Template diente chromosomale DNA des Stammes C34 (Spur 1 und Spur 4), cDNA (Spur 2 und Spur 5) und deren Kontrollen (Spur 3 und Spur 6). Bei den Kontrollen wurde die cDNA Synthesereaktion ohne Zusatz von Reverser Transkriptase durchgeführt. Auf diese Weise konnten Kontaminationen mit chromosomaler DNA ausgeschlossen werden. Den generierten Fragmenten der Spuren 2 und 5 liegt demnach RNA zugrunde und nicht eine DNA-Kontamination. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3% Agarosegel. Die Bandengrößen des Markers sind (von oben nach unten): 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111 und 110 bp. Die kalkulierte Größe der PCR-Produkte in den Spuren 1 und 2 ist 397 bp, in den Spuren 4 und 5 199 bp. **B:** Das Primerpaar ICheck1/ICheck4 amplifiziert aus chromosomaler DNA des Stammes C34 das komplette Intron *CdIS1* mit Teilbereichen der angrenzenden Exons (Spur 1, durch Pfeil gekennzeichnetes 2200 bp Fragment) oder mit cDNA als Template aufgrund des Spleißvorganges nur die ligierten Exonanteile (Spur 2, 225 bp Fragment). Die zweite Bande kleinerer Größe in Spur 1 ist ein unspezifisches PCR-Produkt, in Spur 3 ist die Negativkontrolle (cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3% Agarosegel, der Größenmarker ist zu Teilabbildung A identisch.

Die Transkription des Gens wird durch die Insertion von *CdIS1* nicht gestoppt. Amplifikationen mit dem Primerpaar ICheck1/ICheck4 liefern mit chromosomaler DNA von *C. difficile* C34 ein 2200 bp großes Produkt, wohingegen bei Einsatz von cDNA als Template ein 225 bp großes Fragment generiert wird (Abb. 3.3B). Die Differenz von 1975 bp entspricht genau der Größe von *CdIS1* und zeigt, dass das Intron aus dem primären Transkript ausgespleißt ist. Die Sequenzierung der in den Vektor pCR2.1 des Topo-TA Cloning Kits klonierten RT-PCR Produkte belegte die gewonnenen Erkenntnisse eindeutig.

Ausgespleißte Gruppe I Introns können über eine zusätzliche Transesterifizierung zyklisieren [31-33]. Auf diese Weise könnte das Gleichgewicht der reversiblen Spleißreaktion hin zum ausgespleißten Produkt verschoben werden [32]. Eine RT-PCR Analyse diesbezüglich mit dem Primerpaar ICheck2/ICheck3 lieferte zwei PCR-Produkte, die einer zyklischen Variante von *CdIS1* entsprechen konnten (Abb. 3.4A). Beide Fragmente wurden in den pCR2.1 Vektor des Topo TA Cloning Kits kloniert und sequenziert. Als Ergebnis konnten zwei Zyklisierungsstellen identifiziert werden (Abb. 3.4B). Die Zyklisierung des Introns erfolgt über eine Transesterifizierung an Position 2 oder 94 der *CdIS1* Sequenz (Abb. 3.4B).



Abb. 3.4: Zyklisierungsnachweis des Introns *CdIS1*. **A:** Das Primerpaar ICheck2/ICheck3 wurde mit cDNA von Stamm C34 als Template dazu verwendet, um eine bei vielen Gruppe I Introns stattfindende intramolekulare Zyklisierung des gespleißten Introns nachzuweisen. Spur 1 des 3% Agarosegels zeigt zwei als I und II gekennzeichnete Fragmente, womit auf zwei verschiedene Zyklisierungsstellen geschlossen werden kann. In Spur 2 ist die Negativkontrolle der PCR-Reaktion aufgetragen (cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase). Die Markergrößen sind (von oben nach unten): 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111 und 110 bp. **B:** Die RT-PCR-Produkte I und II wurden kloniert und sequenziert. Dabei bestätigten sich zwei verschiedene Zyklisierungsstellen. Eine Zyklisierung erfolgt durch Angriff des terminalen Guanosins (orange) auf das Adenosin an Position 2 (grün) von *CdIS1* (Zyklisierungsstelle I). Die zweite mögliche Zyklisierung erfolgt durch Angriff des terminalen Guanosins (orange) auf das Adenosin an Position 94 (grün) von *CdIS1* (Zyklisierungsstelle II).

Der Umstand, dass die 3'-Spleißstelle mehr als 1500 bp weit von den Pairings P9.2 entfernt ist (Abb. 3.2A), verhindert nicht das Spleißen von *CdIS1* aus Vorläufer mRNA *in vivo* (Abb. 3.3B). An anderer Stelle im Labor wurde mit Hilfe eines *in vitro* Selbstspleiß-Assays die Effizienz des Spleißvorganges untersucht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die ligierten Exons das Hauptprodukt des Spleißens von *CdIS1* sind [86].

3.3 *CdIS1*-verwandte Sequenzen im Genom von *Clostridium difficile*

3.3.1 PCR-Screening von *C. difficile* Stämmen

Ein spannender Aspekt war die Klärung der Frage, inwieweit *CdIS1* ein spezifisches Merkmal für den Stamm *C. difficile* C34 ist. Um diese Fragestellung anzugehen wurde, ein Primerpaar konzipiert, dessen Einsatz zur Generierung *CdIS1*-spezifischer PCR-Produkte führt. Mit dem Primerpaar TransCheck1/TransCheck2 wird ein 587 bp großes PCR-Produkt generiert, vorausgesetzt dass die *CdIS1* Sequenz oder eine nur geringfügig variierende Sequenz im Genom des zu untersuchendem Isolates vorhanden ist. Es wurden für die Versuchsreihe mehr als 200 *C. difficile* Stämme in das PCR-Screening eingesetzt sowie eine Auswahl von weiteren clostridialen Spezies. Überraschend war, dass bei jedem getesteten *C. difficile* Isolat das entsprechende PCR-Produkt gebildet wurde, wohingegen bei allen anderen überprüften Angehörigen der Gattung *Clostridium* das Ergebnis negativ blieb. Abb. 3.5 dokumentiert dieses Resultat anhand von ausgewählten Beispielen. Hier zeigen der Referenzstamm *C. difficile* VPI10463, *C. difficile* C34, *C. difficile* 1470, *C. difficile* 8864 und der atoxinogen Stamm *C. difficile* 42373 das spezifische PCR-Fragment, die Isolate *C. bifermentans* RE681, *C. sordellii* IP82 und *C. ramosum* RE1296 sind negativ (Abb. 3.5). Insgesamt wurden Vertreter folgender clostridialen Spezies als negativ getestet: *C. barati*, *C. butyricum*, *C. histolyticum*, *C. innoqua*, *C. irregularis*, *C. limosum*, *C. litusebureuse*, *C. novyi*, *C. septicum* und *C. subterminale* (Daten nicht dargestellt). Das Ergebnis belegt, dass *CdIS1* nicht spezifisch für *C. difficile* C34 ist, sondern in dieser, oder einer nah verwandten Form, in allen getesteten *C. difficile* Isolaten vorkommt. Da bei *C. difficile* 8864 und *C. difficile* 42373 das *tcdA*-Gen nicht vorhanden ist und *tcdA*-10463 das Intron nicht beinhaltet, ist der Integrationsort nicht auf das *tcdA*-Gen beschränkt.

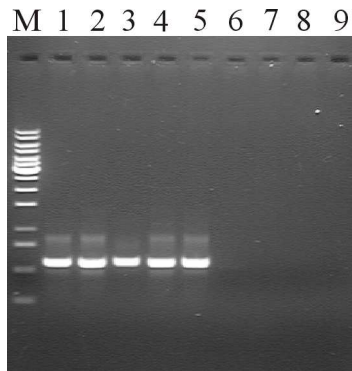


Abb. 3.5: PCR zur Detektion einer *CdISt1*-spezifischen Sequenz. Das Primerpaar TransCheck1/TransCheck2 wurde eingesetzt, um ein spezifisches, 587 bp großes, PCR-Fragment zu generieren. Die Abbildung zeigt ausgewählte Beispiele eines umfassenden PCR-Screenings. Als Template diente chromosomale DNA folgender *C. difficile* Stämme: Referenzstamm VPI10463 (Spur 1), Stamm C34 (Spur 2), die varianten Stämmen 1470 (Spur 3) und 8864 (Spur 4) sowie der atoxinogene Stamm 42373 (Spur 5). Zusätzlich wurde chromosomale DNA von Vertretern weiterer clostridialer Spezies als Template für die PCR eingesetzt: *C. bifermentans* RE681 (Spur 6), *C. sordellii* IP82 (Spur 7) und *C. ramosum* RE1296 (Spur 8). Wasser diente als Negativkontrolle (Spur 9). Alle *C. difficile* Isolate zeigen das spezifische Fragment, die anderen clostridialen Spezies sind in dieser PCR negativ. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel, als Größenmarker diente die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75 kb.

3.3.2 Southern Hybridisierung mit einer *CdISt1*-Sonde

Das PCR-Screening kann über die Kopienzahl von *CdISt1* oder von varianten Formen des Introns im Genom des getesteten Isolats keine Auskunft geben. Beim PCR-Screening wird die Bindung des Primerpaares an die Zielsequenz vorausgesetzt. Falls variante Formen des Introns *CdISt1* im Genom einer Spezies vorhanden sein sollten, könnten geringfügige Sequenzabweichungen dazu führen, dass einer oder beide Primer nicht binden und somit bei der PCR kein Produkt amplifiziert werden kann. Aus diesen Gründen wurde eine Southern Hybridisierung durchgeführt, bei der als Sonde ein 575 bp großes Fragment des 5'-Bereichs von *CdISt1* (Nt Position 5-580) verwendet wurde. Chromosomale DNA von *C. difficile* VPI10463, *C. difficile* C34, *C. difficile* 42373, *C. bifermentans* RE681, *C. sordellii* IP82 und *C. ramosum* RE1296 wurden mit den Restriktionsenzymen *HincII* und *HindIII* verdaut (Abb. 3.6A). Der Verdau wurde mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt, dadurch wird eine Vergleichsmöglichkeit für die Ermittlung der Kopienzahl erreicht. Innerhalb des Introns *CdISt1* gibt es Zielsequenzen für beide Enzyme (*HincII* bei Position 776, *HindIII* bei Position 1115), die 3' der eingesetzten DNA-Sonde liegen. Daher muss jedes Hybridisierungssignal einer Kopie des Introns entsprechen und die durch die Southern Hybridisierung ermittelte Kopienzahl muss bei beiden Restriktionsverdau gleich sein.

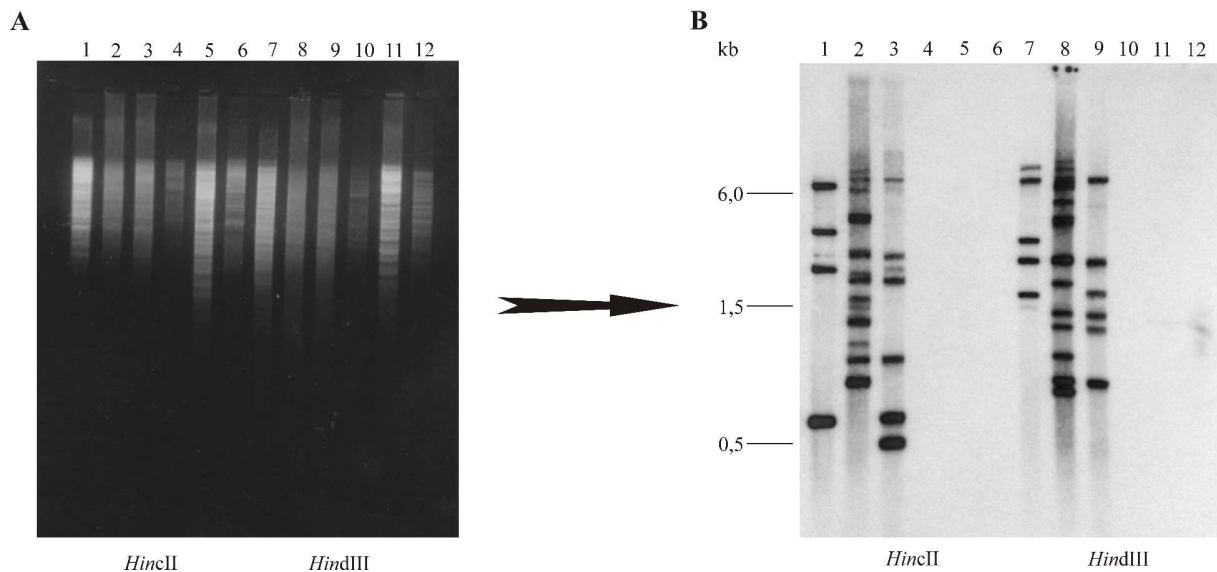


Abb. 3.6: Detektion von *CdISt1*-verwandten Sequenzen über eine Southern Hybridisierung. **A:** Verdauerserie mit den Restriktionsenzymen *HincII* (Spuren 1-6) und *HindIII* (Spuren 7-12). In die Restriktionsverdaus wurden zwischen 10 und 15 μ g chromosomale DNA verschiedener *C. difficile* Isolate und anderer clostridialer Spezies eingesetzt. Die verdaute DNA wurde wie folgt auf dem 1% Agarosegel aufgetragen: Spuren 1 und 7 *C. difficile* VPI10463, Spuren 2 und 8 *C. difficile* C34, Spuren 3 und 9 *C. difficile* 42373, Spuren 4 und 10 *C. bifermentans* RE681, Spuren 5 und 11 *C. sordellii* IP82, Spuren 6 und 12 *C. ramosum* RE1296. **B:** Die Southern Hybridisierung mit einer *CdISt1*-spezifischen Sonde (Nt Position 5-585 in *CdISt1*) führt ausschliesslich bei den *C. difficile* Isolaten zu detektierbaren Banden. Die Bedingungen waren derart gewählt, dass jeweils eine Bande einer Kopie des Introns bzw. einer varianten Form des Introns entsprach. Teilabbildung B zeigt auch, dass die Vergleichbarkeit der zwei verschiedenen Restriktionsverdaus gegeben ist. Die Anzahl der detektierten Banden variiert nur geringfügig. In *C. difficile* VPI10463 lassen sich 4 Banden über die Hybridisierung detektieren (Spuren 1 und 7). Die größte Bande in Spur 7 ist sehr wahrscheinlich auf einen unvollständigen Verdau der chromosomalen DNA zurückzuführen. Die Hybridisierung mit *C. difficile* C34 ergibt mindestens 11 Banden (Spuren 2 und 8), im atoxinogenen Stamm *C. difficile* 42373 lassen sich bei der Hybridisierung 6 Kopien nachweisen (Spuren 3 und 9).

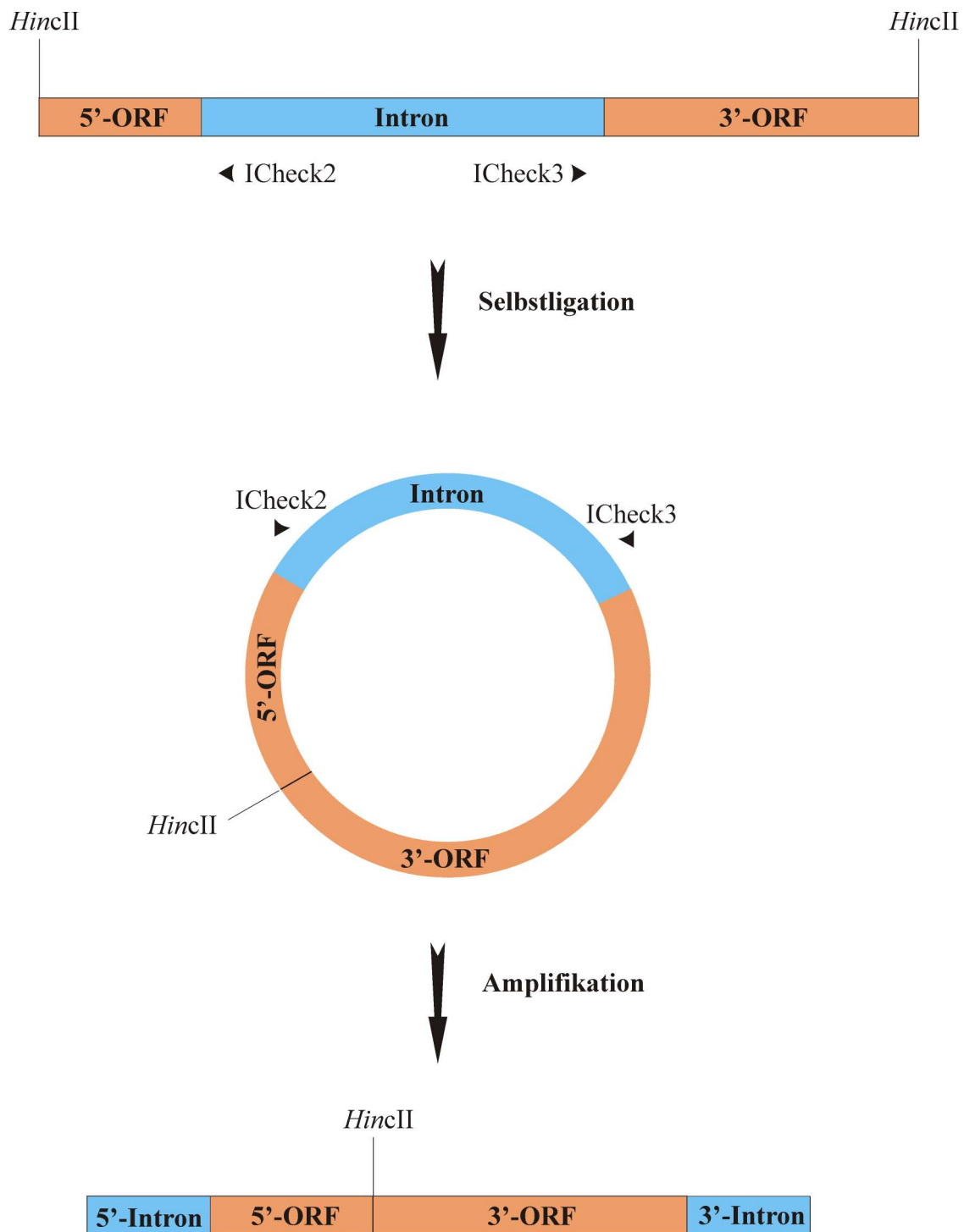
Im Ergebnis entsprach die Southern Hybridisierung diesen Anforderungen (Abb. 3.6B). Wie schon beim PCR-Screening beobachtet, liefern auch bei der Southern Hybridisierung nur die *C. difficile* Stämme Signale, *C. bifermentans* RE681, *C. sordellii* IP82 und *C. ramosum* RE1296 sind eindeutig negativ (Abb. 3.6B). Das Muster der Hybridisierungssignale bei den *C. difficile* Stämmen war in dieser Form ein unerwartetes Resultat. Das Vorkommen von zumindest einer Kopie des Introns *CdISt1* oder einer varianten Form in jedem *C. difficile* Isolat war durch das PCR-Screening belegt. Die Southern Hybridisierung zeigt, dass Stamm C34 mindestens 11 Kopien des Introns besitzt, der atoxinogene Stamm 42373 besitzt 6 Kopien und der Referenzstamm VPI10463 weist 4

Kopien auf (Abb. 3.6B). Die Vielfalt, was die Kopienzahl als solche angeht, und die Unterschiede bezüglich der Verteilung von *CdIS1* oder einer varianten Form im Genom verschiedener *C. difficile* Isolate war nicht vorhersehbar. Die Analyse weiterer Kopien von *CdIS1* bzw. varianter Formen des Introns und die Identifikation weiterer Integrationsstellen waren damit als Ziel für nachfolgende Experimente definiert.

3.3.3 Charakterisierung von *CdIS1*-Varianten in Stamm C34

Um die Integrationsstellen der *CdIS1* Kopien zu bestimmen, wurden inverse PCRs (iPCRs) mit dem Primerpaar ICheck2/ICheck3 durchgeführt. Die genaue Vorgehensweise ist anhand eines Ablaufschemas dargestellt (Abb. 3.7). Als Template diente mit den Restriktionsenzymen *HincII*, *HindIII*, *EcoRV*, *PstI* oder *XbaI* verdaute chromosomale DNA, die religiert wurde. Die iPCR-Produkte wurden in den pCR2.1-Vektor des TopoTA Cloning Kits kloniert und anschliessend sequenziert. Die an das Intron angrenzenden Sequenzen des offenen Leserasters wurden zur Konzeption von Primern herangezogen, mit deren Hilfe das jeweilige Intron komplett aus chromosomaler DNA amplifiziert werden konnte (Abb. 3.8). Auf diese Weise konnten insgesamt 11 Intronvarianten aus Stamm C34 identifiziert werden (Abb. 3.8). Alle Varianten wurden in den pCR2.1-Vektor kloniert und einer Sequenzierung zugeführt. Darüber hinaus konnten die Integrationsstellen der Intronvarianten bestimmt werden. Das spezifische Pentanukleotid TTGAT ist allen Integrationsstellen gemeinsam. Von allen Intronvarianten wurde die Integrationsphase, d.h. die Stelle im Kodon, in die das Intron inseriert ist, bestimmt. Phase 0 Introns sind vor dem ersten Nukleotid des Triplets inseriert, Phase 1 Introns nach dem ersten Nukleotid und Phase 2 Introns nach dem zweiten Nukleotid. Bei neun der zwölf Introns handelt es sich um Phase 0 Introns, drei Introns sind Phase 1 Introns. Phase 2 Introns sind nicht vorhanden. Die Nukleotidsequenzen der Intronvarianten wurden mit *CdIS1* verglichen, ebenso die Aminosäuresequenzen der Transposasen. Dies war bei *TlpA* nicht durchgehend möglich, da nicht alle Varianten über die kleinere Transposase verfügen. In Tabelle 3.1 sind diese Ergebnisse zusammengefasst.

Die Intronvarianten lassen sich in zwei verschiedene Typen gruppieren (Abb. 3.9). Typus I, dem auch das „ursprüngliche“ Intron *CdIS1* angehört, kennzeichnet der Besitz des potentiellen Transposasogens *tlpA*. Hierzu zählen die Varianten *CdIS1b*, *CdIS1e*, *CdIS1f*, *CdIS1g* und *CdIS1k*. Bei Typus II ist das *tlpA*-Gen deletiert. Dieser Gruppe gehören die Varianten *CdIS1a*, *CdIS1c*, *CdIS1d*, *CdIS1h*, *CdIS1i* und *CdIS1j* an. Der Sequenzvergleich zwischen Typus I und Typus II Introns im Bereich der Deletion liefert interessante Details. Beide Typen sind bis zu der Nukleotidfolge TGAT (Position 561-564 bezogen auf *CdIS1*) hoch homolog zueinander. Dieser Sequenz folgt eine Deletion von 79 bp (*CdIS1c*), von 89 bp (*CdIS1d*, *CdIS1h*, *CdIS1i* und *CdIS1j*) oder von 91 bp (*CdIS1a*).



- ➡➡ Klonierung des iPCR-Produkts
- ➡➡ Sequenzanalyse des iPCR-Produkts
- ➡➡ Identifikation der Integrationsstelle
- ➡➡ Identifikation des ORF
- ➡➡ Amplifikation des Introns aus dem ORF
- ➡➡ Klonierung und Sequenzanalyse des Introns



Abb. 3.7: Ablaufschema der inversen PCR (iPCR). Der hier dargestellten iPCR liegt ein *HincII* Restriktionsverdau mit chromosomaler DNA zugrunde, weitere Ansätze für iPCRs wurden mit *HindIII*, *EcoRV*, *PstI* und *XbaI* Restriktionsverdau von chromosomaler DNA hergestellt. Die Verwendung der Primer ICheck2 und ICheck3 setzt voraus, dass die DNA-Sequenz der Intronvarianten im 5'- und 3'-Bereich dem bekannten Intron *CdIS1* gleicht, so dass eine Bindung der Primer möglich ist. Durch die Selbstligation wird erreicht, dass die ursprünglich entgegengesetzt zueinander orientierten Primer ICheck2 und ICheck3 jetzt ein funktionelles Primerpaar bilden und eine PCR-Amplifikation möglich ist. Das PCR-Produkt kann nachfolgend kloniert und einer Sequenzanalyse zugeführt werden. Das weitere Vorgehen ist stichpunktartig unter dem Schema aufgeführt.

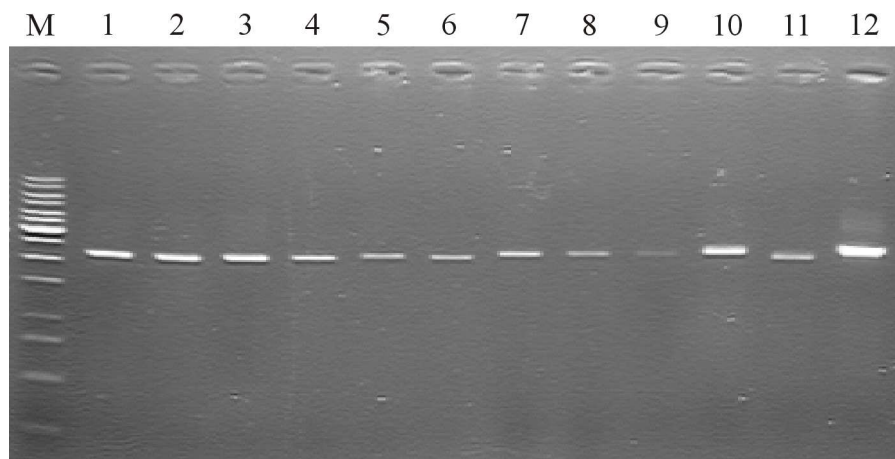


Abb. 3.8: Darstellung der in *C. difficile* C34 identifizierten *CdIS1*-Varianten. Die für die PCR verwendeten Primerpaare sind tabellarisch im Anhang A aufgeführt, die PCR-Bedingungen sind Anhang B zu entnehmen. Spur 1 zeigt das Intron *CdIS1*, Spur 2 *CdIS1a*, Spur 3 *CdIS1b*, Spur 4 *CdIS1c*, Spur 5 *CdIS1d*, Spur 6 *CdIS1e*, Spur 7 *CdIS1f*, Spur 8 *CdIS1g*, Spur 9 *CdIS1h*, Spur 10 *CdIS1i*, Spur 11 *CdIS1j* und Spur 12 *CdIS1k*. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel, als Größenmarker diente die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75 kb.

Bezeichnung	Größe (in Nt)	Typus ^a	Identität (in %)				Integrationsstelle ^f	Integrationsphase ^g
			Gesamt ^b	Intron-Komponente ^c	TlpA ^d	TlpB ^e		
CdIS1	1975	I	100	100	100	100	TTGAT↓	0
CdIS1a	1882	II	93,6	97,7	Δ	94,4	TTGAT↓	0
CdIS1b	1975	I	97,9	99,5	97,1	96,2	TTGAT↓	0
CdIS1c	1894	II	93,2	98,6	Δ	94,6	TTGAT↓	1
CdIS1d	1884	II	93,9	99,1	Δ	94,6	TTGAT↓	0
CdIS1e	1975	I	97,9	98,2	97,1	96,8	TTGAT↓	0
CdIS1f	1976	I	97,7	98,9	91,4	95,4	TTGAT↓	0
CdIS1g	1976	I	97,4	98,9	97,1	94,6	TTGAT↓	0
CdIS1h	1884	II	93,5	98,2	Δ	95,4	TTGAT↓	1
CdIS1i	1884	II	93,1	97,5	Δ	94,6	TTGAT↓	1
CdIS1j	1884	II	93,8	98,6	Δ	95,7	TTGAT↓	0
CdIS1k	1974	I	97,6	98,9	97,1	96,1	TTGAT↓	0

^a Die Zuordnung zum Typus I bzw. Typus II beruht auf dem Besitz des Gens *tlpA* (vgl. Abb. 3.9)

^b Die Identität der Nukleotidsequenz im Vergleich zu CdIS1

^c Die Identität der Nukleotidsequenz der Intron-Komponente (nt 1-440) im Vergleich zu CdIS1

^d Die Identität der Aminosäuresequenz von TlpA im Vergleich zu TlpA von CdIS1

^e Die Identität der Aminosäuresequenz von TlpB im Vergleich zu TlpB von CdIS1

^f Der Pfeil kennzeichnet die Integrationsstelle von CdIS1x 3' zur Sequenz TTGAT

^g Die Integrationsphase gibt die Insertionsposition des Introns im Kodon an

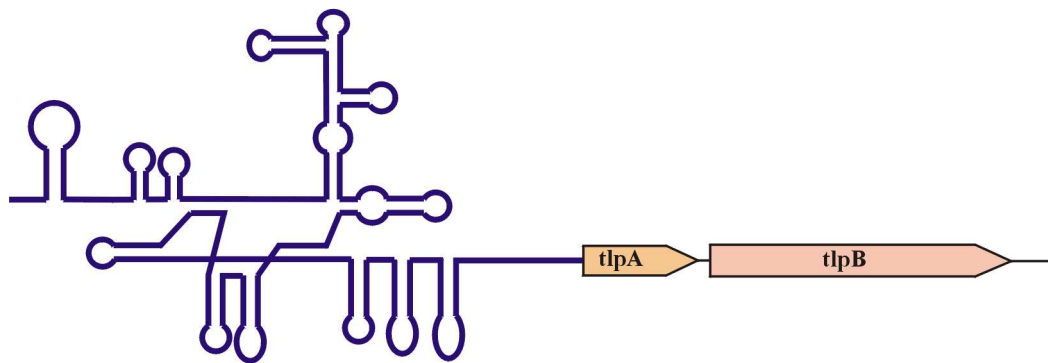
Δ: deletiert

Tab. 3.1: Charakteristika von CdIS1-Varianten.

Die der Deletion folgende Sequenz ist zunächst jedoch nicht wieder homolog zu der Sequenz von Typus I Introns. Erst nach der Basenfolge CAG (Position 718-720 bezogen auf CdIS1) sind die Sequenzen von Typus I und Typus II Introns wieder hoch homolog. Die Randsequenzen des hoch homologen Bereiches, im 5'-Bereich TGAT und im 3'-Bereich CAG, gleichen damit fast vollständig den die Introngrenzen definierenden Sequenzen TTGAT als 5' Insertionsstelle und CAG als 3'-Spleißstelle. Der dazwischenliegende Sequenzbereich ist bei den Typus II Intronvarianten durch eine Deletion und einen nicht homologen Sequenzabschnitt gekennzeichnet. Allen Varianten gemeinsam ist die Zielsequenz TTGAT ihrer Integrationsstelle, die in allen Fällen ein offenes Leseraster ist. Dieser Sachverhalt ist

einmalig. Gruppe I Introns wurden bis zu diesem Zeitpunkt nicht in eubakteriellen offenen Leserastern gefunden. *CdIS1* und seine Varianten scheinen hingegen geradezu auf eine Integration in offene Leseraster spezialisiert zu sein, oder zumindest mit starker Präferenz an diesen Stellen zu integrieren. Im Rahmen der Diskussion werden weitere Einzelheiten zu den betroffenen offenen Leserastern erörtert (vgl. 4.1.1).

CdIS1-Varianten Typus I:



CdIS1-Varianten Typus II:

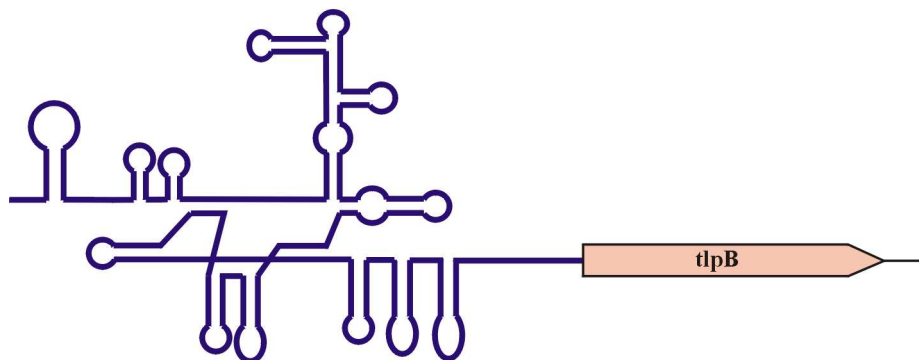


Abb. 3.9: Unterteilung der *CdIS1*-Varianten in zwei Typen. Typus I, zu dem auch das ursprünglich entdeckte Gruppe I Intron *CdIS1* gehört, besitzt neben dem Transposasegen *tIpB* auch das 5' davon gelegene *tIpA*-Gen. *CdIS1*-Varianten vom Typus II kennzeichnet der Verlust des *tIpA*-Gens.

3.3.4 Funktionelle Analyse der *CdIS1*-Varianten

Die Integration einer *CdIS1*-Variante in ein offenes Leseraster erfordert ein funktionelles Spleißen, wenn dem Wirt dadurch kein Nachteil entstehen soll. Über eine RT-PCR Analyse wurde dementsprechend wie schon unter Punkt 3.2.2 dargelegt die Spleißaktivität der *CdIS1*-Varianten untersucht. Als Template wurde cDNA von *C. difficile* C34 verwendet, als Primer dienten die für die jeweilige *CdIS1*-Variante konzipierten Oligonukleotide (siehe Anhang A und B). Für alle untersuchten Varianten konnten über die RT-PCR die gespleißten Produkte generiert werden. Abb. 3.10 zeigt dieses Ergebnis beispielhaft für die Varianten *CdIS1a*, *CdIS1b* und *CdIS1c*. Zusätzlich durchgeführte Sequenzierungen der in pCR2.1 klonierten RT-PCR Produkte bewiesen, dass die Exons nach dem Spleißvorgang in frame waren.

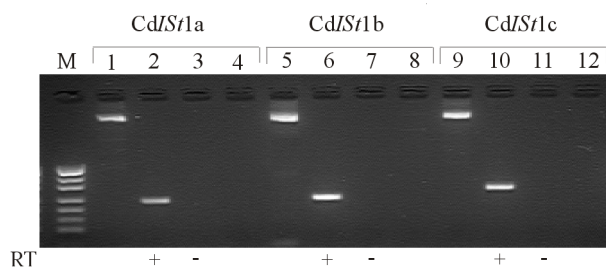


Abb. 3.10: Nachweis des Spleißens über RT-PCR bei ausgewählten *CdIS1*-Varianten. Als Template eingesetzt wurde chromosomale DNA des Stammes C34 (Spuren 1, 5, und 9), cDNA (Spuren 2, 6 und 10) und deren Kontrollen (Spuren 3, 7 und 11) und als Negativkontrolle Wasser (Spuren 4, 8 und 12). Bei den cDNA-Kontrollen wurde das Enzym Reverse Transkriptase nicht dem Reaktionsansatz zugesetzt. Die fehlenden Amplifikate in den Spuren 3, 7 und 11 beweisen, dass die Banden in den Spuren 2, 6, und 10 auf gespleißte RNA zurückzuführen sind und nicht auf mögliche DNA-Kontaminationen. Die Abbildung ist beispielhaft für alle *CdIS1*-Varianten. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3% Agarosegel. Die Bandengrößen des Markers sind (von oben nach unten): 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111 und 110 bp.

3.4 Evaluation eines möglichen Einflusses von *CdISt1* auf die Evolution clostridialer Proteine

3.4.1 Generierung eines Vektorsystems für Transformationen in *C. difficile*

Eine *in vivo* Analyse mit rekombinanter DNA in *C. difficile* setzt eine stabile Transformation voraus. Gängige Transformationsmethoden, wie etwa die Elektrottransformation, konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht für *C. difficile* etabliert werden. Die einzige Möglichkeit, rekombinante DNA in *C. difficile* einzuschleusen, führt über ein konjugatives Transposon in *Bacillus subtilis* [27, 70]. Die DNA wird bei dieser Methode über homologe Rekombination in das Transposon, in diesem Fall handelt es sich um Tn916, integriert und nachfolgend durch Konjugation auf *C. difficile* übertragen. In *C. difficile* integriert das Transposon in das Bakterienchromosom. Bislang sind zwei Hot Spots für die Integration beschrieben worden [73, 74]. Allerdings wurde nur einer der Hot Spots eingehender charakterisiert [74].

Das in Abb. 3.11 dargestellte Schema verdeutlicht den Ablauf der an dieser Stelle anstehenden Experimente. Für die Folgeversuche war zunächst die Generierung eines Vektorkonstruktes erforderlich, über das rekombinante DNA in *C. difficile* eingebracht werden kann. Als Grundgerüst dieses, im weiteren Verlauf als pTransfer1 bezeichneten Vektors, diente das Plasmid pUC18. Der Polylinker von pUC18 wurde über die Klonierung des *tetM*-Gens ersetzt. Das Gen ist in *B. subtilis* die Voraussetzung für die homologe Rekombination in das Transposon Tn916. Als selektierbarer Marker wurde im Folgeschritt das *ermBP*-Gen in *tetM* einkloniert. Durch die Klonierung wurden 503 bp von *tetM* deletiert, für eine homologe Rekombination ist die verbleibende *tetM* Sequenz im 5'-Bereich (884 bp) und 3'-Bereich (533 bp) ausreichend. Abschliessend wurde als neue Multiple Cloning Site der Polylinker eines im Rahmen anderer Laborarbeiten modifizierten pQE Plasmids, pQE11a18, direkt 5' des *ermBP*-Gens in pTransfer1 umkloniert. Dieser Polylinker beinhaltet die Restriktionsschnittstellen des pUC18-Polylinkers, gefolgt von einer DNA-Sequenz, die als Transkriptionsterminator wirkt. Der Terminator und die entgegengesetzte Orientierung der Leserichtung von *ermBP* sollen polare Effekte auf Transkriptionsebene ausschliessen. Der 5317 bp umfassende Vektor pTransfer1 ist in Abb. 3.12 dargestellt. Die Nukleotidsequenz von pTransfer1 ist im Anhang C aufgeführt.

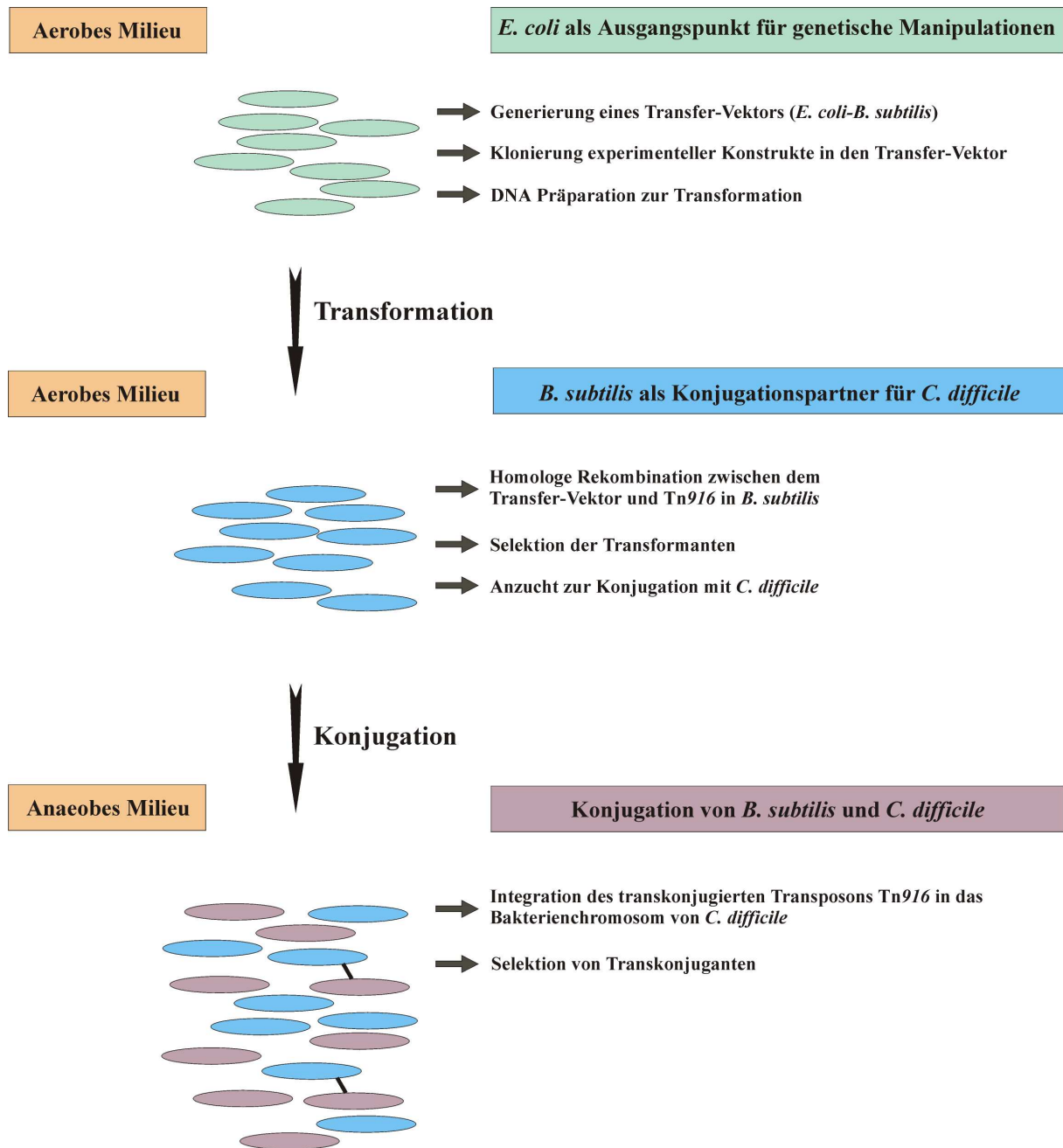


Abb. 3.11: Ablaufschema zum Transfer von rekombinanter DNA zu *C. difficile* über Konjugation. Der für den Transfer benötigte Vektor wird im Wirt *E. coli* (grün) generiert. Die zu transferierende DNA wird in den Vektor kloniert und in *B. subtilis* (blau) transformiert. Dort erfolgt über homologe Rekombination die Integration der rekombinanten DNA in das konjugative Transposon Tn916. *B. subtilis* (blau) und *C. difficile* (lila) werden zur Konjugation zusammengebracht, das konjugierte Transposon Tn916 integriert in das Bakterienchromosom von *C. difficile*.

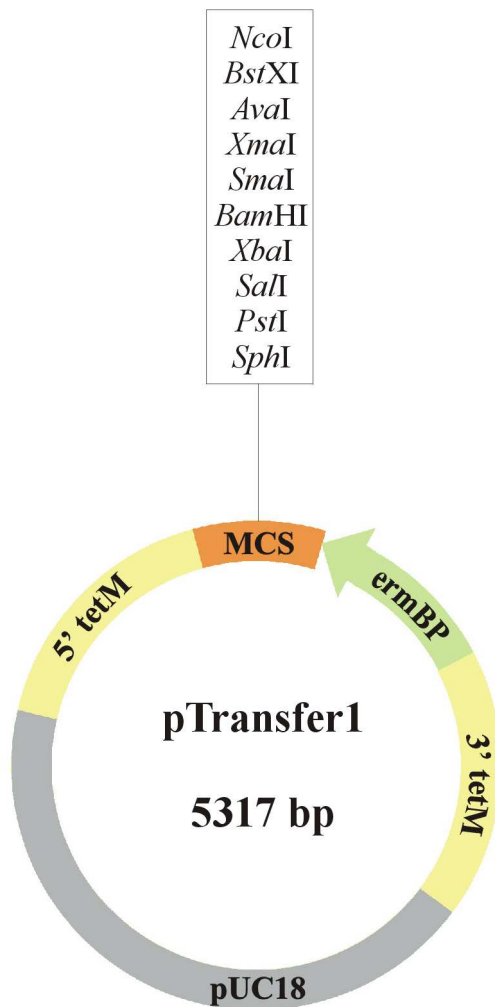


Abb. 3.12: Darstellung des Vektors pTransfer1. Die Generierung des Vektors ist im Text beschrieben. Die zu Klonierungszwecken zur Verfügung stehenden singulären Restriktionsschnittstellen sind oberhalb des 5317 bp großen Vektors aufgeführt. Als selektierbarer Marker wird durch den Vektor eine Erythromycinresistenz eingeführt. Die Nukleotidsequenz ist im Anhang C aufgeführt.

3.4.2 Konzeption eines Modellsystems zur Generierung alternativer Protein-Spezies

Bei anderen Arbeiten der Gruppe konnte gezeigt werden, dass nicht nur die reguläre 3'-Spleißstelle von *CdIS1* zum Spleißen genutzt wird, sondern auch eine Reihe weiterer, sekundärer Spleißstellen im Intron und im 3'-Exon vorzufinden sind (unveröffentlichte Daten). Unter Ausnutzung der konventionellen 5'-Spleißstelle entstehen bei diesem alternativen Spleißen neue mRNA-Spezies, deren Translation zu einem modifizierten Protein führen kann. Dieser Mechanismus zur Variation von Proteinen würde auf eine mögliche Beteiligung von *CdIS1* an der Evolution der Wirtspoteine hinweisen, weil der Wirt von veränderten Proteineigenschaften profitieren könnte. Da das konventionelle Spleißprodukt

jedoch das Hauptprodukt darstellt [86], ist durch alternatives Spleißen kein gravierender Nachteil für den Wirt gegeben.

Die Aufgabenstellung, durch alternatives Spleißen generierte Proteine *in vivo* im originären Wirt *C. difficile* nachzuweisen, führte zur Konzeption des in Abb. 3.13 gezeigten Modellsystems. In diesem System wird ein Reporter gen 3' einer alternativen Spleißstelle eingeführt, so dass bei alternativem Spleißen ein detektierbares Fusionsprotein generiert wird. Als für dieses Modell günstige alternative Spleißstelle zur Klonierung des Reportergens bietet sich das CAG-Triplett direkt upstream der Transposase TlpA an (Position 624-626 in *CdIS11*).

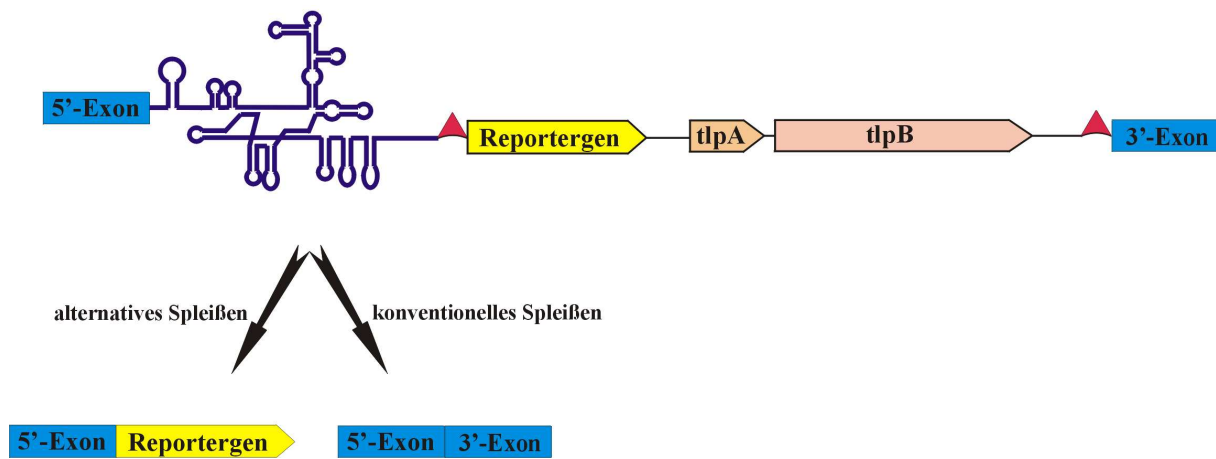


Abb. 3.13: Modellsystem zur Detektion von auf alternativem Spleißen beruhenden Proteinen. Eine sekundäre und die konventionelle 3'-Spleißstelle sind als rotes Dreieck dargestellt. Bei Klonierung eines Reportergens direkt hinter die sekundäre Spleißstelle erfolgt durch die alternative Spleißreaktion eine Ligation von 5'-Exon und Reporter gen. Konventionelles Spleißen führt zur Ligation des 5'-Exon mit dem 3'-Exon. Die Wirkung des auf alternativem Spleißen beruhenden Fusionsproteins kann über geeignete Selektionsbedingungen nachgewiesen werden.

3.4.3 Umsetzung des Modellsystems

3.4.3.1 Generierung des Konstruktes zur Detektion von alternativem Spleißen

Abb. 3.14A zeigt die Umsetzung des Modellsystems als linearisiertes Konstrukt. Als Grundgerüst wurde der Vektor pQE11a18 gewählt, als Reporter gen kam die Chloramphenicol-Acetyltransferase (*catP*) aus *C. perfringens* zum Einsatz. Dem durch PCR generierten Gen wurde das ATG-Startcodon entfernt um zu gewährleisten, dass

ausschliesslich das Fusionsprotein einen detektierbaren Effekt herbeiführt. Des weiteren musste über eine *in vitro* Mutagenese in *CdIS1* eine Punktmutation 5' der Klonierungsstelle gesetzt werden. Das Triplet TCA (Position 609-611) wurde in TAA geändert. Auf diese Weise wurde ein Stopcodon eingeführt, um eine mögliche Initiation der Transkription des *catP*-Gens aufgrund eines internen Startcodons zu verhindern. *CatP* wurde im Folgeschritt in das mutagenisierte Intron direkt 3' der ausgewählten sekundären Spleißstelle kloniert, so dass bei alternativem Spleißen ein Fusionsprotein mit dem 5'-Exon gebildet werden kann. Als Promotorstruktur für die Transkription des *tcdA*-C34 Gens wurde die *tcdB*-Promotorsequenz ausgewählt, gemeinsam mit dem potentiellen positiven Regulator *tcdD* und dessen Promotorsequenz. Ziel war die Generierung einer in *C. difficile* aktiven Transkriptionseinheit. Ein aus diesen Komponenten bestehendes PCR-Fragment wurde 5' des *tcdA*-Gens kloniert. Das konventionelle Spleißen sollte über ein TcdA-EGFP-Fusionsprotein dokumentiert werden. Hierfür wurde das EGFP-Gen in den Anteil des *tcdA*-Gens downstream der primären 3'-Spleißstelle kloniert. Leider erwies sich im Verlauf später folgender Experimente das EGFP-Fusionsprotein als nicht funktionell. Über negative Erfahrungen mit dem EGFP-Fusionsprotein im anaeroben Milieu berichtete die in einer Kooperation stehende Arbeitsgruppe um P. Mullany (pers. Mitteilung). Aus diesem Grund wurden Folgeexperimente mit EGFP nicht mehr durchgeführt.

3.4.3.2 Generierung der Positivkontrolle

Alternatives Spleißen findet im Vergleich zu konventionellem Spleißen in einem deutlich geringeren Umfang statt. Ein auf konventionellem Spleißen beruhendes Chloramphenicol-Acetyltransferase-Fusionsprotein wird daher in einer wesentlich größeren Menge gebildet als ein auf alternatives Spleißen zurückzuführendes Fusionsprotein. Die Resistenz gegenüber Chloramphenicol, die auf das Fusionsprotein zurückzuführen ist, muss daher bei einem auf konventionellem Spleißen beruhenden Cat-Fusionsprotein deutlicher ausgeprägt sein. Über die Generierung einer Positivkontrolle sollten die Ergebnisse für das durch alternatives Spleißen generierte TcdA-CatP-Fusionsprotein (Abb. 3.14A) verifiziert werden. Bei dieser Positivkontrolle muss das TcdA-CatP-Fusionsprotein entsprechend aufgrund einer konventionellen Spleißreaktion gebildet werden. Aus diesem Grund wurde das *catP*-Gen anstelle des EGFP-Gens in frame in den 3' Anteil von *tcdA* kloniert (Abb. 3.14B). Über dieses Konstrukt ist damit maximal zu erwartende Resistenz gegen Chloramphenicol abschätzbar.

3.4.3.3 Generierung der Negativkontrolle

Neben der maximal zu erwartenden Resistenz gegenüber Chloramphenicol musste auch der Minimalwert über eine Negativkontrolle definierbar gemacht werden (Abb. 3.14C). Da es durch die Konstrukte vorgegeben war, dass die Spleißaktivität des Introns *CdIS1* die Grundlage für die Resistenz darstellt, bot sich hier ein Ansatzpunkt für eine Negativkontrolle. Dem in Abb. 3.14A dargestellten Konstrukt wurde die Intron-Komponente durch einen Restriktionsverdau entfernt. Das religierte Konstrukt konnte in den Folgeexperimenten als Negativkontrolle genutzt werden, da eine Spleißreaktion bei diesem Konstrukt unmöglich stattfinden kann (Abb. 3.14C). Infolgedessen muss bei dem Empfängerstamm eine mit dem Wildtyp vergleichbare Sensivität gegenüber Chloramphenicol vorliegen.

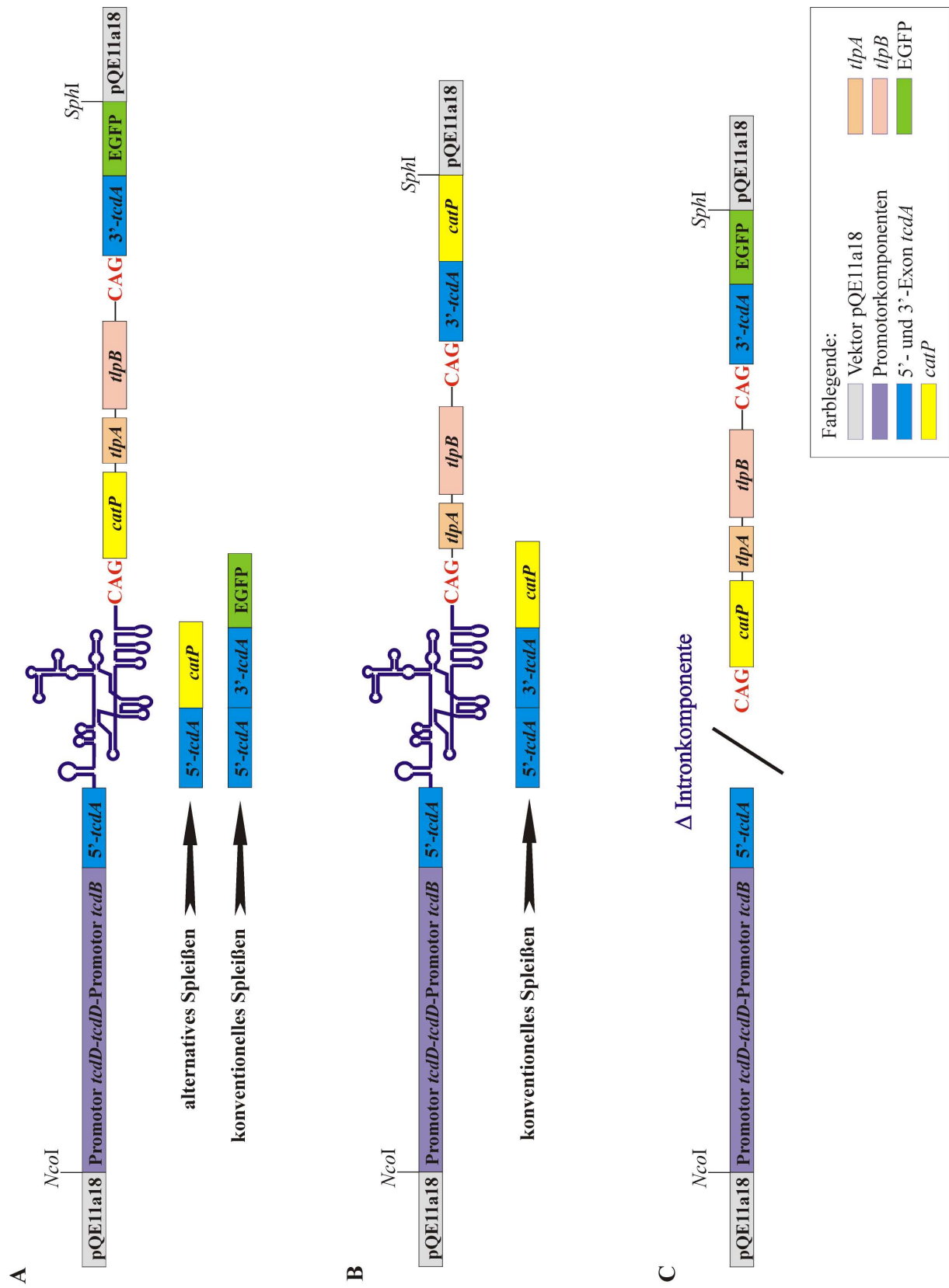




Abb. 3.14: Darstellung der experimentellen Konstrukte zur *in vivo* Analyse von alternativem und konventionellem Spleißen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Konstrukte in linearisierter Form abgebildet. Die für die Umklonierung in den Vektor pTransfer1 entscheidenden singulären Schnittstellen *NcoI* und *SphI* sind in den Konstrukten eingezeichnet. Die Farblegende ist für jedes der drei Konstrukte gültig. **A:** Als Grundgerüst für die Generierung des Konstruktes zur Analyse von alternativem Spleißen wurde der Vektor pQE11a18 (grau) verwendet. Das als Reportergen ausgewählte *catP*-Gen (gelb) wurde direkt 3' der ausgewählten sekundäre Spleißstelle kloniert. Die Transkription wird von einem Promotorelement (lila) gesteuert, das sich aus der *tcdB*-Promotorsequenz zuzüglich des potentiellen positiven Regulators *tcdD* und dessen Promotorsequenz zusammensetzt. Um konventionelles Spleißen dokumentieren zu können, befindet sich das EGFP-Gen (grün) in frame kloniert zum 3'-*tcdA*-Exon (blau). **B:** Positivkontrolle zur Ermittlung der maximal zu erwartenden Chloramphenicol-Resistenz. Hier ist das *catP*-Gen (gelb) anstelle von EGFP in frame in das 3'-Exon *tcdA* (blau) kloniert, so dass bei konventionellem Spleißen ein resistenzvermittelndes Fusionsprotein entstehen muss. Da konventionelles Spleißen weitaus häufiger stattfindet als alternatives Spleißen, ist über dieses Konstrukt die maximal zu erwartende Chloramphenicol-Resistenz ermittelbar. **C:** Die hier gezeigte Negativkontrolle entspricht bis auf die fehlende Intron-Komponente dem Konstrukt in Teilabbildung A. Der über einen Restriktionsverdau entfernte Intron-Anteil ist essentiell für den Spleißvorgang, der durch das Fehlen dieses Anteils entsprechend komplett unterbunden wird. Als Folge muss eine Chloramphenicol-Sensitivität bestehen.

3.4.3.4 Verifizierung der Konstrukte

Um die Funktionalität der Konstrukte sicherzustellen, wurden über Sequenzanalysen die Klonierungsschritte verifiziert. Abb. 3.15 zeigt bei jedem der drei Konstrukte ein PCR-Fragment, welches sich vom Promotoranteil bis zum *catP*-Gen erstreckt. Das PCR-Produkt wurde mit dem Primerpaar *tcdDBProm1.1/catRT-PCR2* generiert und hat bei dem in Abb. 3.14A dargestellten Konstrukt eine Fragmentgröße von 2140 bp (Abb. 3.15A Spur 2 und Abb. 3.15C). Das Amplifikat der Positivkontrolle (Abb. 3.14B) hat eine Größe von 4905 bp (Abb. 3.15A Spur 3 und Abb. 3.15D), das der Negativkontrolle (Abb. 3.14C) ist 1442 bp groß (Abb. 3.15A Spur 1 und Abb. 3.15B). Sequenzfehler konnten über die durchgeführten Sequenzierungen ausgeschlossen werden, insbesondere was die Übergänge der einzelnen klonierten Komponenten der Konstrukte angeht (Abb. 3.15B-D).

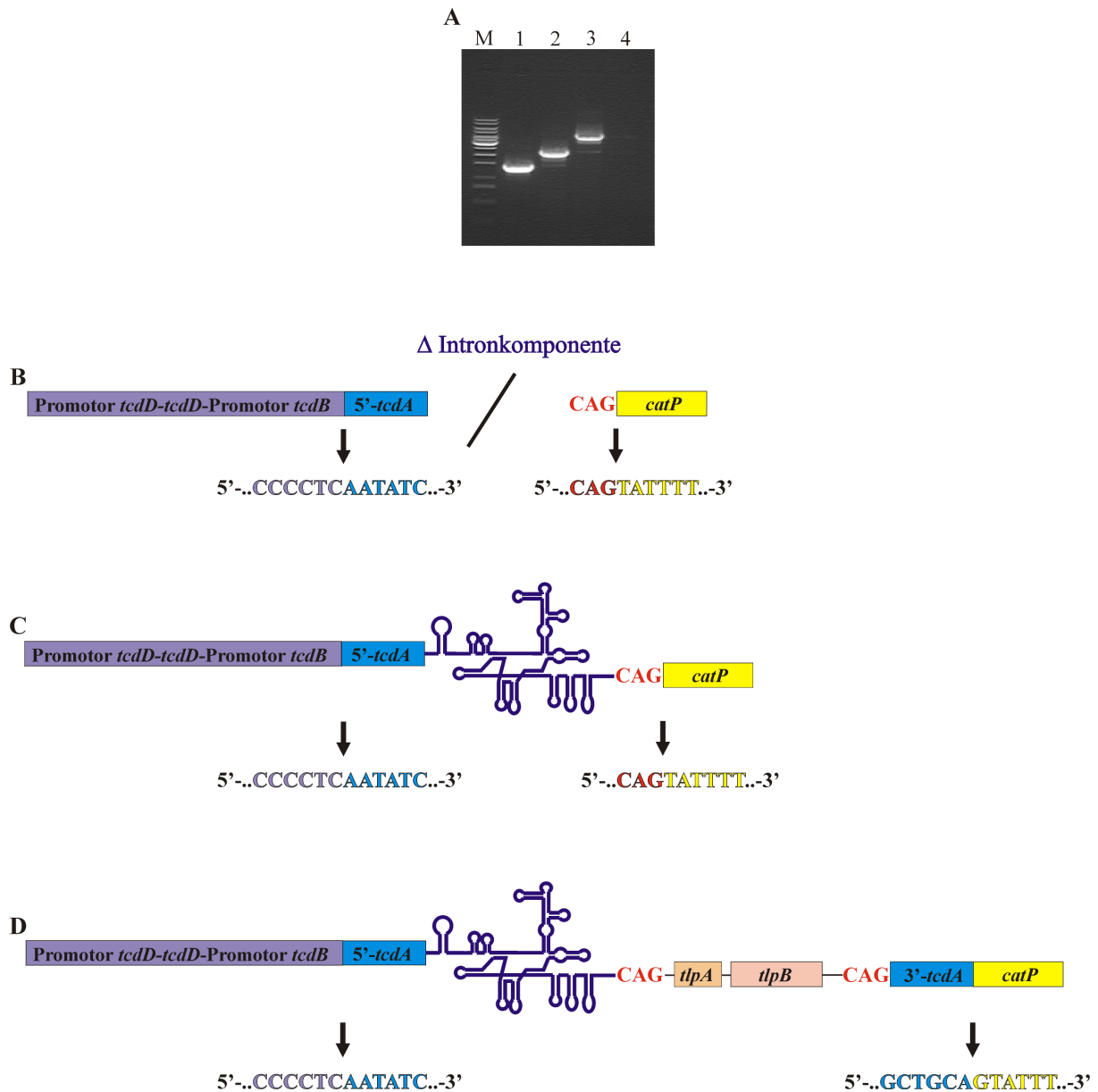


Abb. 3.15: Kontroll-PCRs und Sequenzierungen zur Verifizierung der experimentellen Konstrukte. Die Farbgebung der Schemazeichnungen entspricht der Farblegende von Abb. 3.14. **A:** Der Primer *tcdDBProm1.1* bindet im Promotoranteil der Konstrukte, der Primer *catRT-PCR2* bindet im *catP*-Gen. Da das Gen an unterschiedlichen Positionen in den Konstrukten kloniert ist, führt eine PCR mit diesem Primerpaar zur Generierung unterschiedlich großer Fragmente. Spur 1 zeigt das Resultat mit DNA der Negativkontrolle als Template. Das Template für den PCR-Ansatz in Spur 2 war DNA des Konstrukts zur Analyse des alternativen Spleißens. In Spur 3 ist die Positivkontrolle aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel, als Größenmarker diente die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75 kb. **B:** Schematische Darstellungen des Amplifikats der Negativkontrolle (vgl. Abb. 3.15A Spur 1). Die unterhalb der Zeichnungen dargestellten Nukleotidfolgen zeigen die sequenzierten Übergänge zwischen den klonierten Einzelkomponenten. **C:** Schemazeichnung des Konstruktes zur Detektion von alternativem Spleißens (vgl. Abb. 3.15A Spur 2). Die Sequenzübergänge sind korrekt und entsprechen den Vorgaben. **D:** Das Amplifikat der Positivkontrolle (vgl. Abb. 3.15A Spur 3) und dessen Sequenzen sind ebenfalls verifiziert.

3.4.4 Transfer der Konstrukte in den Rezipient *C. difficile* CD37

3.4.4.1 Transformation der Konstrukte in *B. subtilis* BS49

Die in Abb. 3.14 dargestellten Konstrukte wurden zunächst über einen *NcoI/SphI*-Doppelverdau mobilisiert und in den entsprechend vorbereiteten pTransfer1 Vektor (Abb. 3.12) umkloniert. Über die im Vektor enthaltenen 5'- und 3'-Sequenzen des *tetM*-Gens kann in *B. subtilis* eine homologe Rekombination mit *tetM* des Transposons Tn916 erfolgen. Die homologe Rekombination stellt eine unabdingbare Voraussetzung für den Transfer zu *C. difficile* dar. Transformanten können über die durch den Vektor pTransfer1 zur Verfügung gestellte Erythromycin-Resistenz durch entsprechende Selektionsbedingungen identifiziert werden.

Der in dieser Methodik vielfach bewährte Stamm *B. subtilis* BS49 wurde für die folgenden Versuche ausgewählt. Der Stamm enthält zwei Kopien des Transposons Tn916, womit sich die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Transformation entsprechend verdoppelt. Die Transformationsbedingungen für Stamm BS49 mussten an dieser Stelle angepasst werden. Bei bislang in der Literatur beschriebenen Transformationsexperimenten kam Mini- oder Midi-Prep DNA in einer Konzentration von 0,5-1 µg zum Einsatz [70, 73]. Bei Transformationsversuchen mit der entsprechenden DNA-Menge konnten wiederholt keine BS49 Transformanten identifiziert werden. Erst der Einsatz von 10µg Mini-Prep DNA in die Transformation führte zu positiven Resultaten. Für alle drei Konstrukte konnten unter diesen Bedingungen zahlreiche BS49 Transformanten durch Erythromycinselektion identifiziert werden. Die Komplexität der vorliegenden Konstrukte verringert hier möglicherweise die Transformationseffizienz.

3.4.4.2 Kontrolle der *B. subtilis* BS49 Transformanten

Mittels einer Kontroll-PCR mit Klonen potentieller Transformanten wurde die korrekte Integration der Konstrukte in das Transposon Tn916 verifiziert (Abb. 3.16A-C). Der 5'-Bereich der Integration wurde mittels einer PCR mit dem Primerpaar TransfoCheck1/TransfoCheck2 überprüft. Primer TransfoCheck1 bindet in Tn916 5' von *tetM*, Primer TransfoCheck2 bindet im jeweiligen Konstrukt 3' von *tetM*. Die Generierung eines PCR-Produkts von 885 bp Größe belegt die Integration im 5'-Bereich (Abb. 3.16B). Analog hierzu wurde der 3'-Bereich mit dem Primerpaar TransfoCheck3/TransfoCheck4 überprüft. TransfoCheck3 bindet im Bereich des jeweiligen Konstruktes, TransfoCheck4 in

Tn916, so dass das amplifizierte 630 bp Fragment die Integration im 3'-Bereich bestätigt (Abb. 3.16C).

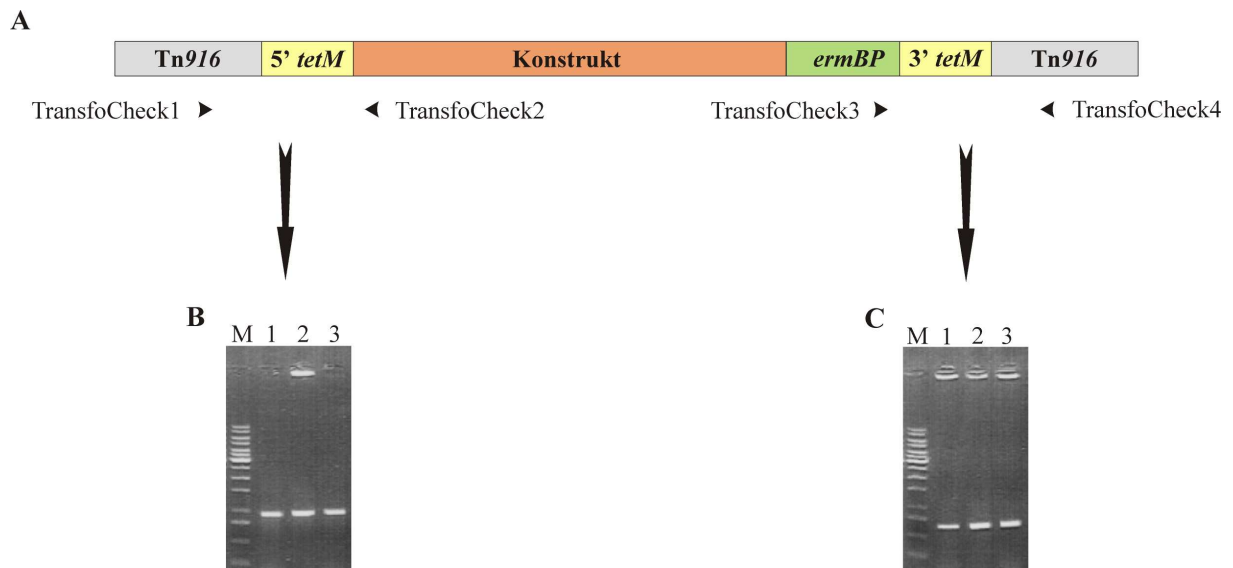


Abb. 3.16: PCR-Nachweis der Integration der Konstrukte in das konjugative Transposon Tn916. Die Integration in Tn916 ist die Grundvoraussetzung für eine nachfolgende Transkonjugation mit *C. difficile*. **A:** Die Schemazeichnung steht stellvertretend für alle drei Konstrukte. Unter der Zeichnung sind die für die PCRs verwendeten Primer gemäss ihrer relativen Position eingezeichnet. **B:** Die Integration im 5'-Bereich wurde durch eine PCR mit dem Primerpaar TransfoCheck1/TransfoCheck2 überprüft. Die Primer sind derart konzipiert, dass ein Amplifikat nur bei erfolgreicher Integration durch homologe Rekombination generiert werden kann. Teilabbildung B zeigt diesbezüglich ein positives Ergebnis für die Negativkontrolle (Spur 1), das Konstrukt zur Analyse alternativen Spleißens (Spur 2) und für die Positivkontrolle (Spur 3). Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1% Agarosegel, der Größenmarker ist die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5 kb. **C:** Die Integration der Konstrukte in Tn916 im 3'-Bereich wird mit Hilfe des Primerpaares TransfoCheck3/TransfoCheck4 nachgewiesen. Teilabbildung C zeigt das positive Resultat für alle drei Konstrukte, die Reihenfolge auf dem Gel entspricht dem in Teilabbildung B beschriebenen Gelauftrag. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte ebenfalls auf einem 1% Agarosegel, als Größenmarker wurde die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter verwendet.

3.4.4.3 Transkonjugation von *B. subtilis* BS49 und *C. difficile* CD37

Als Empfängerstamm bei der Transkonjugation zwischen *B. subtilis* und *C. difficile* eignet sich der atoxinogene Stamm *C. difficile* CD37. Das Isolat hat sich bei vergleichbaren

Anwendungen an anderer Stelle schon vielfach bewährt [70, 73]. Auch bei den Transkonjugationsexperimenten waren Optimierungsarbeiten erforderlich, die mutmasslich auf die Komplexität der Konstrukte zurückzuführen sind. Davon war in erster Linie die Auswahl des Nährmediums betroffen. Bislang kam bei Transkonjugationen BHI-Agar, versehen mit den als Selektionskomponenten verwendeten Antibiotika zum Einsatz [70, 73]. In diesem Fall führte die Verwendung von BHI-Agar, mit Rifampicin (25 µg/ml) und Erythromycin (75µg/ml) versehen, allerdings zu keinem Resultat. Es konnten keine *C. difficile* CD37 Transkonjuganten identifiziert werden. Erst der Umstieg von BHI-Agar auf Brucella-Blut-Agar mit den Selektionskomponenten in der o.a. Konzentration ermöglichte potentiellen *C. difficile* Transkonjuganten das Wachstum. Damit bestätigten sich Erfahrungen bei anderen Arbeiten im Labor, wo Brucella-Blut-Agar sich als exzellenter Nährboden für *C. difficile* herausstellte. Für jedes der drei Konstrukte konnten zwischen vier und sechs potentielle Transkonjuganten auf diese Weise gewonnen werden.

3.4.4.4 Kontrolle der *C. difficile* CD37 Transkonjuganten über PCR

Zur weiteren Untersuchung wurde die chromosomale DNA von Klonen der Transkonjuganten präpariert und PCR-Analysen zugeführt. Zielsetzung war es hierbei zu zeigen, dass a) die Transkonjuganten vom atoxinogenen Empfängerstamm *C. difficile* CD37 stammen und nicht ein anderer im Laborgebrauch befindlicher toxinogener *C. difficile* Stamm als Kontamination vorliegt, b) rekombinante DNA in den Empfängerstamm CD37 durch Transkonjugation eingebracht wurde und c) das *CdIS1* Bestandteil der rekombinanten DNA ist.

Mit Hilfe des Primerpaares Lok3/Lok1 konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Transkonjuganten um Klone des atoxinogenen Stammes *C. difficile* CD37 handelt und keine Kontamination mit den im Labor gebräuchlichen toxinogenen Stämmen *C. difficile* C34 oder *C. difficile* VPI10463 vorliegt. Die Primer flankieren den Pathogenitätsloкус von *C. difficile* (vgl. Abb. 3.1A). Atoxinogenen Stämmen fehlt dieses 19,6 kb große genetische Element, so dass bei dieser PCR ein Amplifikat von 700 bp Größe generiert werden kann (Abb. 3.17A).

Da CD37 als atoxinogener Stamm keine Sequenzen des *tcdA*-Gens besitzt, über die Transkonjugation jedoch eben solche Sequenzen mit eingeführt wurden, bot sich hier ein Ansatzpunkt, das Transkonjugationsereignis über PCR zu verifizieren. Mit dem Primerpaar C34A1Sonde1/C34A1Sonde2 wird der 5' des Introns gelegene *tcdA*-Anteil der Konstrukte amplifiziert, wobei im Falle der Negativkontrolle der Primer C34A1Sonde2 wegen der fehlenden Bindungsstelle ersetzt werden musste.

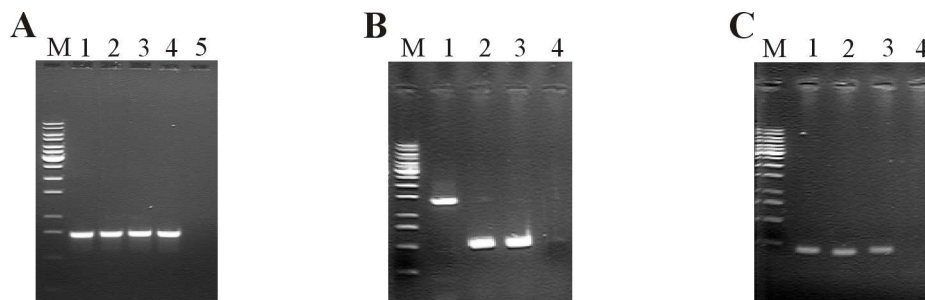


Abb. 3.17: PCR-Analysen zum Transkonjugationsnachweis der drei Konstrukte in den Empfängerstamm *C. difficile* CD37. Als Template für die PCR-Reaktionen wurde chromosomale DNA verwendet. Die Auftrennung erfolgte auf 1% Agarosegelen, als Größenmarker diente die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (von oben nach unten): 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5 kb. **A:** Der Empfängerstamm CD37 ist ein atoxinogener Stamm. Die PCR stellt hier sicher, dass keine Kontamination mit einem im Laborgebrauch befindlichen toxischen *C. difficile* Isolat vorliegt. Die Auftragsreihenfolge der PCR-Ansätze ist wie folgt: CD37 Wildtyp (Spur 1), CD37 Konstrukt Negativkontrolle (Spur 2), CD37 Konstrukt alternatives Spleißen (Spur 3), CD37 Konstrukt Positivkontrolle (Spur 4) und die PCR-Negativkontrolle ohne Template (Spur 5). Alle Templates liefern bei der Amplifikation mit dem Primerpaar Lok3/Lok1 die erwartete Bande. **B:** Durch die Transkonjugation ist dem atoxinogenen Empfängerstamm CD37 ein Anteil des *tcdA*-Gens übertragen worden. Dadurch ergibt sich eine Möglichkeit, die Transkonjuganten mittels einer *tcdA*-spezifischen PCR zu überprüfen. Für die PCR der CD37 Negativkontrolle (Spur 1) wurde das Primerpaar C34A1Sonde1/ICheck8 verwendet, das Primerpaar C34A1Sonde1/C34A1Sonde2 wurde bei CD37 Konstrukt alternatives Spleißen (Spur 2) und CD37 Konstrukt Positivkontrolle (Spur 3) verwendet. Als Negativkontrolle für die PCR wurde in Spur 4 ein PCR-Ansatz ohne Template aufgetragen. Die in den Spuren 1, 2 und 3 detektierten Fragmente zeigen die zu erwartenden Bandengrößen. **C:** Mit dem Primerpaar ICheck3/ICheck4 wird der Übergang des Introns *CdIS1* zum 3'-*tcdA*-Exon amplifiziert. Die PCR wurde hier eingesetzt, um diesen Anteil des transkonjugierten Konstruktes zu überprüfen. Die Reihenfolge auf dem Agarosegel entspricht der in Teilabbildung B beschriebenen. Bei allen Transkonjuganten wurde das spezifische PCR-Produkt generiert.

Hier kam die Primerkombination C34A1Sonde1/ICheck8 zur Anwendung um den 5' des Introns gelegenen *tcdA*-Anteil zu amplifizieren. Abb. 3.17B zeigt für alle Konstrukte ein positives Resultat und bestätigt damit das Transkonjugationsereignis.

Ein zusätzlicher Nachweis für den Transfer rekombinanter DNA durch Konjugation lieferte die PCR mit dem Primerpaar ICheck3/ICheck4 (vgl. 3.2.2). Der Primer ICheck3 bindet im 3'-Bereich des Introns *CdIS1*, ICheck4 bindet im 5'-Bereich von *tcdA*. Unter diesen Bedingungen kann nur bei Transkonjuganten ein Amplifikat generiert werden. Abb. 3.17C weist für jedes der Konstrukte die entsprechende Bande nach.

3.4.4.5 Verifizierung der Integrität der transkonjugierten Konstrukte über eine Southern Hybridisierung

Neben den PCR-Analysen zur Absicherung der Transkonjugationsereignisse wurde auch eine Southern Hybridisierung vorgenommen. Hier war das Ziel die Integrität der drei Konstrukte sicherzustellen und nachzuweisen, dass keine homologe Rekombination mit *CdIS1*-Varianten des Empfängerstammes CD37 stattgefunden hat. Als Sonde wurde ein mit dem Primerpaar C34A1Sonde1/C34A1Sonde2 generiertes 509 bp *tcdA*-Fragment eingesetzt. Die chromosomale DNA der drei Transkonjuganten und des CD37 Wildtyps als Negativkontrolle wurde mit den Restriktionsenzymen *HincII* und *HindIII* verdaut (Abb. 3.18A). Da die Schnittstellen der Restriktionsenzyme in den Konstrukten bekannt ist, muss eine Hybridisierung Banden definierter Größe ergeben, wenn das Konstrukt unversehrt ist und auch keine homologe Rekombinationen mit *CdIS1*-Varianten stattgefunden haben. Das Ergebnis der Hybridisierung *HincII*-verdauter chromosomaler DNA zeigt Abb. 3.18B. Die detektierten Banden entsprechen hier der erwarteten Größe. Als Größenmarker wurde ein über QIAEX gereinigtes 509 bp DNA-Fragment aufgetragen, das der verwendeten Sonde entsprach. Rückstände der QIAEX-Matrix führten zu einem kompletten schwarzen Verschmieren dieser Spur. Das Ergebnis der *HincII*-verdauten chromosomalen DNA in der benachbarten Spur (Negativkontrolle CD37 Wildtyp) wurde dadurch ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen (Abb. 3.18B). Eine distinkte Bande war trotz dieser Beeinträchtigung nicht auszumachen. Das Resultat wurde zusätzlich über die Southern Hybridisierung mit *HindIII* verdauter chromosomaler DNA bestätigt (Abb. 3.18C). Auch hier waren nur die kalkulierten Banden detektierbar. Die Negativkontrolle ist ebenfalls der Erwartung entsprechend.

Die Experimente stellten sicher, dass die in Abb. 3.14A-C dargestellten Konstrukte unversehrt und als Einheit in *C. difficile* CD37 übertragen wurden. Damit waren die Grundlagen für funktionelle Analysen geschaffen.

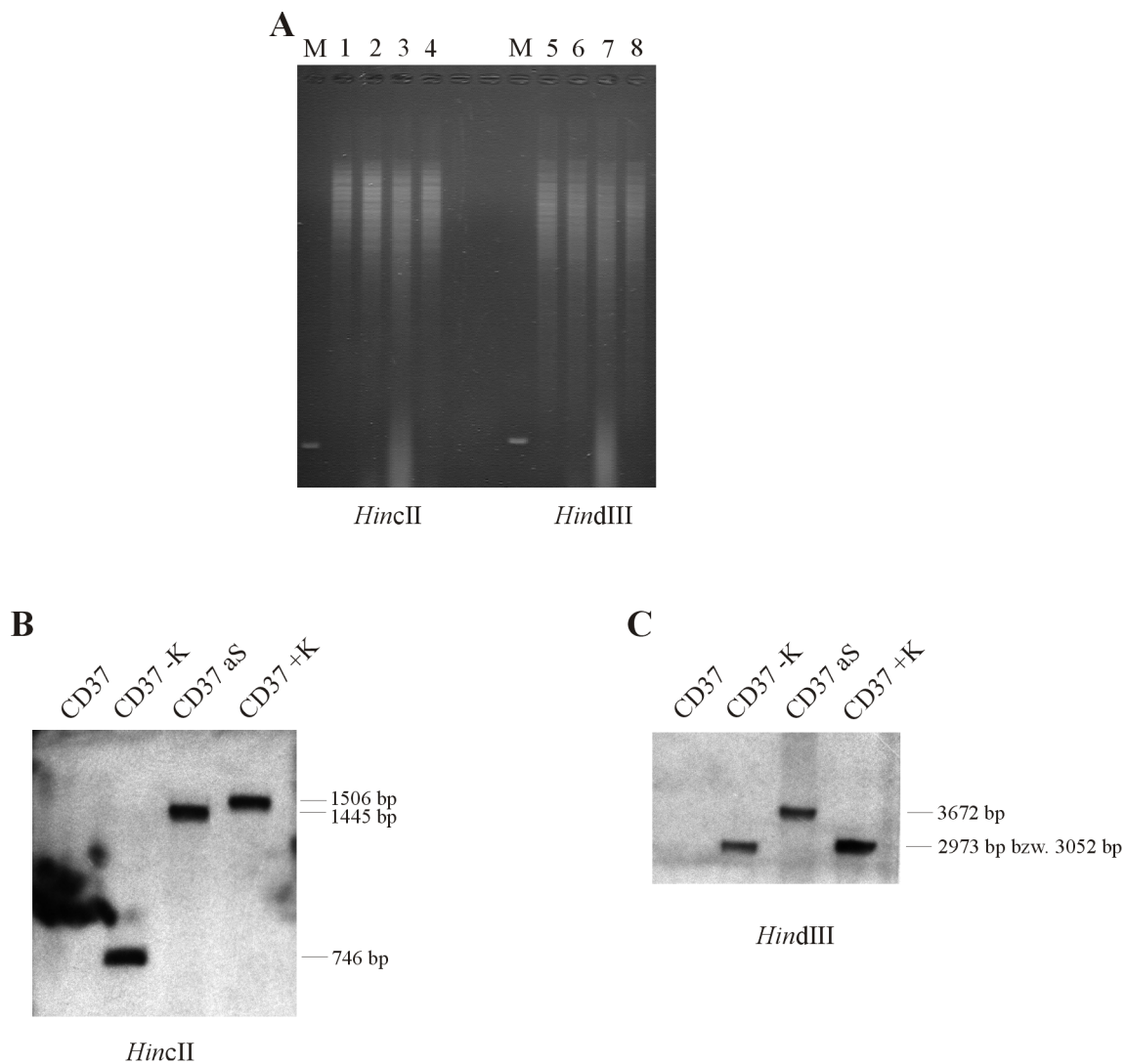


Abb. 3.18: Southern Hybridisierung mit einer *tcdA*-Sonde. **A:** Restriktionsverdau chromosomaler DNA (jeweils 10 µg) mit den Enzymen *HincII* und *HindIII*. Zur Gelelektrophorese wurde ein 1% Agarosegel verwendet. In Spur 1 und Spur 5 wurde der Verdauansatz des CD37 Wildtyps aufgetragen, in den Spuren 2 und 6 CD37 Konstrukt Negativkontrolle, in Spur 3 und Spur 7 CD37 Konstrukt alternatives Spleißen und in den Spuren 4 und 8 CD37 Konstrukt Positivkontrolle. Als Marker wurde QIAEX gereinigte DNA der *tcdA*-Sonde aufgetragen. **B:** Die Hybridisierung der *tcdA*-Sonde mit *HincII*-verdauter chromosomaler DNA führt im Fall von CD37 Konstrukt Negativkontrolle zur Detektion einer 746 bp großen Bande, bei CD37 Konstrukt alternatives Spleißen ist eine 1445 bp große Bande zu sehen und CD37 Konstrukt Positivkontrolle weist ein 1506 bp großes Fragment auf. Die als Größenmarker vorgesehene Spur mit DNA der *tcdA*-Sonde ist aufgrund von Rückständen der QIAEX-Matrix komplett geschwärzt. Davon betroffen ist auch die direkt benachbarte Spur des CD37 Wildtyps. Da der CD37-Wildtyp als atoxinogener Stamm keine *tcdA*-Sequenzen besitzt, darf hier keine Bande detektierbar sein. Hier muss auf Teilabbildung C verwiesen werden. **C:** Die Hybridisierung der *tcdA*-Sonde mit *HindIII*-verdauter chromosomaler DNA führt durchweg zur Detektion von Banden der zu erwartenden Größe. Der CD37 Wildtyp erweist sich als negativ. Die detektierten Banden mit einer Größe von 2973 bp (CD37 Konstrukt Negativkontrolle), 3672 bp (CD37 Konstrukt alternatives Spleißen) und 3052 bp (CD37 Konstrukt Positivkontrolle) sind der Vorgabe entsprechend.

3.4.5 Ermittlung der minimalen Hemmstoff-Konzentration

3.4.5.1 Wachstumskontrolle auf Selektivplatten

Die als Reporter gen verwendete Chloramphenicol-Acetyltransferase ermöglichte über eine Chloramphenicol-Selektion eine erste funktionelle Überprüfung der Konstrukte. Der Wirkmechanismus von Chloramphenicol beruht auf der Diffusion durch die bakterielle Plasmamembran und Bindung an die ribosomale 50S-Untereinheit. Es kommt zur Blockade der Aminoacyl-tRNA Akzeptorstelle und damit zur Blockade der Proteinbiosynthese. Das Antibiotikum kann sowohl bakteriostatisch als auch bakterizid wirken. Für *C. difficile* sind bislang diesbezüglich keine Daten veröffentlicht, wohl aber für *C. perfringens*. Einer Studie zu Folge wirkt bei *C. perfringens* ATCC 13124 Chloramphenicol ab einer Konzentration von 1,5 µg/ml bakteriostatisch und ab einer Konzentration von 3,1 µg/ml bakterizid [87]. *C. difficile* Stämme betreffend belegen Literaturdaten für Chloramphenicol-sensitive Stämmen eine minimale Hemmstoff-Konzentration (MHK), d.h. die Konzentration, bei der gerade kein Wachstum erfolgt, von 4 µg/ml Chloramphenicol [88]. Bei Chloramphenicol-resistenten Stämmen reicht das Spektrum der MHK-Werte von 24-48 µg/ml Chloramphenicol [88]. Die MHK-Werte wurden durch Inkubation von Übernachtskulturen der Keime auf Selektivplatten ermittelt. Die Versuchsbedingungen zur Ermittlung der MHK-Werte für die *C. difficile* Transkonjuganten richteten sich nach diesen Vorgaben. Die MHK-Werte des Wildtyps von *C. difficile* CD37 und der CD37 Negativkontrolle sollten in einem Konzentrationsbereich von 4 µg/ml liegen. Für die beiden anderen Konstrukte ist ein Wachstum des Empfängerstammes bei höheren Chloramphenicol-Konzentrationen zu erwarten. Aus einer in der stationären Wachstumsphase befindlichen Vorkultur wurden jeweils 10^4 Zellen in einer Verdünnungsreihe auf Brain Heart Infusion-Chloramphenicolplatten ausgebracht. Tabelle 3.2 zeigt das Ergebnis nach 96 Stunden Wachstum. Längere Inkubationszeiten führten zu keinem von diesem Resultat abweichenden Ergebnis. Die MHK liegt demnach für den Wildtyp und die Negativkontrolle bei 5 µg/ml. Diese Werte entsprechen somit den in der Literatur veröffentlichten Werten für Chloramphenicol-sensitive *C. difficile* Isolate [88]. Die ermittelten Werte für das Konstrukt zum alternativen Spleißen und für die Positivkontrolle liegen höher. Bei ersterem ist erst ab einer Konzentration von 8 µg/ml kein Wachstum mehr erkennbar, bei der Positivkontrolle liegt der Wert bei 9 µg/ml. Hierbei ist noch zu erwähnen, dass über den gesamten Beobachtungszeitraum Kolonien der Positivkontrolle am schnellsten und zahlreichsten auf den Selektivplatten gewachsen sind.

Chloramphenicol-Konz. ($\mu\text{g/ml}$)	CD37 Wildtyp	CD37 Konstrukt Negativkontrolle	CD37 Konstrukt alternatives Spleißen	CD37 Konstrukt Positivkontrolle
2	++	++	++	++
3	++	++	++	++
4	++	++	++	++
5	-	-	++	++
6	-	-	++	++
7	-	-	+	++
8	-	-	-	+
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
15	-	-	-	-

-: kein sichtbares Wachstum

+: bis zu 25 Klone

++: mehr als 25 Klone

Tab. 3.2: Wachstumskontrolle nach 96 h zur Ermittlung der minimalen Hemmstoff-Konzentration.

3.4.5.2 Interpretation der MHK-Werte in Bezug zu den Literaturdaten

Die hier durchgeführten Versuche zur Ermittlung des MHK-Wertes zeigen, dass die Konstrukte im Rahmen ihrer Vorgaben funktionell sind. Wildtyp und Negativkontrolle liegen in einem Bereich ähnlich der bekannten Literaturwerte [88]. Das alternative Spleißen ermöglicht dem Empfängerstamm ein Wachstum bei höheren Chloramphenicol-Konzentrationen, die Positivkontrolle liefert hier den Maximalwert. Beide Werte liegen deutlich unter den für resistente *C. difficile* Stämme beschriebenen MHK-Werten. Da es sich bei diesen Isolaten jedoch um Wildtyp Stämme handelt, deren *cat*-Gen unter Kontrolle des eigenen Promotors steht, ist die Differenz der MHK-Werte erklärbar. Erstaunlich ist der Umstand, dass die Differenz zwischen der Positivkontrolle, gleichbedeutend mit dem konventionellen Spleißen, und dem alternativen Spleißen nicht deutlicher ausfällt. Hierfür kann in der Fachliteratur eine Erklärungsmöglichkeit gefunden werden. Bei *Bacillus subtilis* ist die Sekretion einer von *E. coli* stammenden Chloramphenicol-Acetyltransferase in den Kulturüberstand beschrieben worden [89]. Eine Sekretion des TcdA-CAT-Fusionsproteins ins Medium ist bei *C. difficile* ebenfalls denkbar. Die ins Medium abgegebene Chloramphenicol-Acetyltransferase kann dort Chloramphenicol inaktivieren und für ein Angleichen der MHK-Werte sorgen.

An dieser Stelle ergab sich die Notwendigkeit zur Durchführung weiterer Analysen, um sicherzustellen, dass die Chloramphenicolresistenz wirklich eindeutig auf die Spleißreaktionen zurückzuführen ist.

3.4.6 Detektion konventioneller und alternativer mRNA-Spezies

3.4.6.1 Auswahlkriterien für die Anzuchtsbedingungen zur RNA-Präparation

Die Grundlage für die Chloramphenicol-Resistenz der *C. difficile* CD37 Empfängerstämme liefert die Transkription der Gene für die Chloramphenicol-Acetyltransferase Fusionsproteine. Als methodischer Zugang für eine Transkriptionsanalyse zum mRNA-Nachweis wurde die RT-PCR gewählt. Die Anzucht des CD37 Empfängerstammes mit dem Konstrukt zur Analyse von alternativem Spleißen und der Positivkontrolle für die erforderliche RNA-Präparation erfolgte in BHI-Flüssigkulturen mit zwei verschiedenen Chloramphenicol-Konzentrationen. Ausgewählt wurde eine Konzentration von 1 µg/ml und 6 µg/ml Chloramphenicol, wobei auf mögliche Unterschiede in der späteren RT-PCR-Analyse spekuliert wurde. Dem lag die Annahme zugrunde, dass eine Anzucht bei einer höheren Chloramphenicol-Konzentration zu einem verstärkten alternativen Spleißen führen kann, da damit ein Selektionsvorteil verbunden ist. Die Gesamt-RNA wurde präpariert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. Anschliessend fand die cDNA als Template in der RT-PCR Verwendung. Untersucht wurde jeweils konventionelles und alternatives Spleißen, Abb. 3.19A-B zeigt das Ergebnis.

3.4.6.2 Primerpaare zum Nachweis von alternativem und konventionellem Spleißen

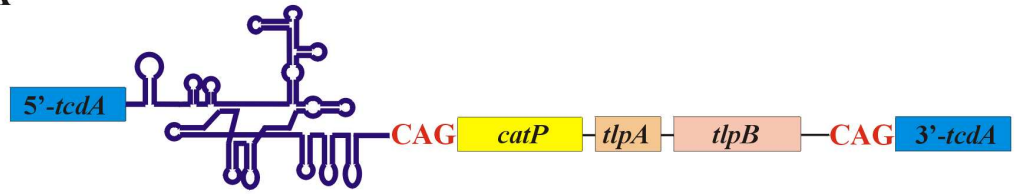
Das Primerpaar zum Nachweis des durch alternatives Spleißen generierten Fusionsproteins war ICheck1/catRT-PCR2 beim Konstrukt zur Detektion von alternativem Spleißen. Der ICheck1-Primer bindet in *tcdA* 5' des Intron-Anteils, catRT-PCR2 bindet im klonierten *catP*-Gen. Die alternative Spleißstelle ohne das klonierte *catP*-Gen wurde in der Positivkontrolle mit dem Primerpaar ICheck1/ICheck5 untersucht. Der Primer ICheck5 bindet entsprechend 3' dieser Spleißstelle. Zum Nachweis für durch konventionelles Spleißen generierte mRNA wurden die Primerpaare ICheck1/ICheck4 (Konstrukt alternatives Spleißen) und ICheck1/cat-RT-PCR2 (Konstrukt Positivkontrolle) eingesetzt. Die relative Position der Primer ist in Abb. 3.19A-B dargestellt.

3.4.6.3 Ergebnis der RT-PCRs

Die Spuren 1-8 in Abb. 3.19A zeigen die Resultate der RT-PCR für das Konstrukt zum Nachweis von alternativem Spleißen. Die PCR Produkte in Spur 1 und Spur 5 sind auf alternatives Spleißen zurückzuführen, die weißen Pfeile deuten auf die Fragmente, die der kalkulierten Bandengröße entsprechen. Spur 3 und Spur 7 dokumentieren die auf konventionellem Spleißen basierenden Amplifikate. Zunächst ist hier festzuhalten, dass es zwischen der 1 µg/ml Chloramphenicol Anzuchtvariante (Spur 1) und der 6 µg/ml Chloramphenicol Anzuchtvariante (Spur 5) keine deutlichen Unterschiede gibt. Zwar ist das gewünschte Amplifikat in Spur 5 deutlicher zu erkennen, da die übrigen Nebenprodukte dort jedoch ebenfalls stärker amplifiziert wurden, liegt der Grund hierfür in einer qualitativ besseren RNA-Präparation und/oder cDNA-Synthese. Das auf konventionelles Spleißen zurückzuführende Amplifikat ist in den Spuren 3 und 7 dargestellt. Die Signalstärken dieser Banden belegen eindeutig, dass konventionelles Spleißen im Vergleich zum alternativen Spleißen stark bevorzugt abläuft.

Die RT-PCRs der Positivkontrolle sind in Abb. 3.19B Spur 1 bis Spur 8 dargestellt. Die Spuren 1 und 5 zeigen Amplifikate, die auf konventionelles Spleißen zurückzuführen sind, den RT-PCR Produkten der Spuren 3 und 7 liegt alternatives Spleißen zugrunde. Da hier ebenfalls Nebenprodukte amplifiziert wurden, sind auch hier die korrekten Amplifikate mit einem weißen Pfeil markiert. Anhand der Signalstärke ist das auf konventionellem Spleißen basierende Amplifikat eindeutig als Hauptprodukt zu identifizieren.

A



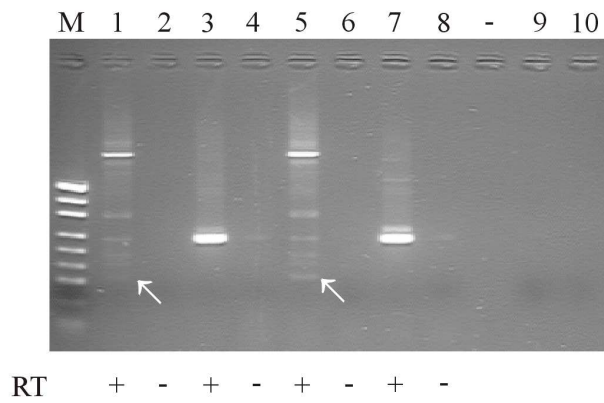
ICheck1 ►

◄ catRT-PCR2

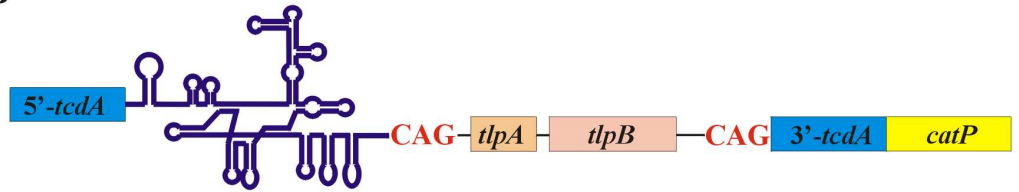
◄ ICheck4

►► ICheck1-catRT-PCR2: alternatives Spleißen

►► ICheck1-ICheck4: konventionelles Spleißen



B



ICheck1 ►

◄ ICheck5

◄ catRT-PCR2

►► ICheck1-ICheck5: alternatives Spleißen

►► ICheck1-catRT-PCR2: konventionelles Spleißen

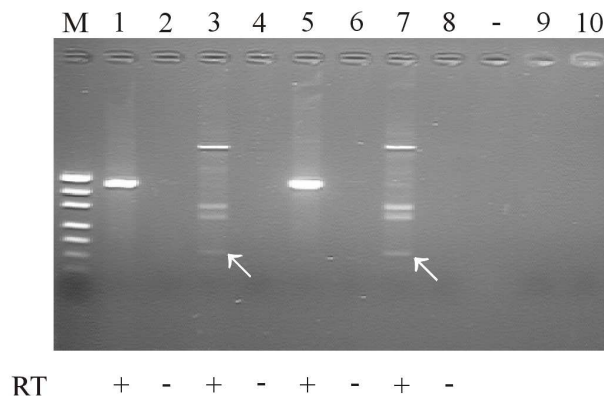




Abb. 3.19: RT-PCRs zum Vergleich von alternativem und konventionellem Spleißen. Die relative Position der verwendeten Primer ist den Schemazeichnungen zu entnehmen. Die Farbgebung der Schemazeichnungen richtet sich nach der Farblegende aus Abb. 3.14. **A:** Teilabbildung A zeigt die RT-PCRs mit cDNA von CD37 Konstrukt alternatives Spleißen. Zur RNA-Präparation wurden zwei verschiedene Anzuchtbedingungen gewählt, den RT-PCRs der Spuren 1-4 liegt eine Anzucht der Bakterien mit 1 µg/ml Chloramphenicol zugrunde, die Spuren 5-8 betreffend erfolgte die Anzucht bei 6 µg/ml Chloramphenicol. Alternatives Spleißen wurde über das Primerpaar ICheck1/catRT-PCR2 abgefragt (Spur 1 und Spur 5), konventionelles Spleißen über das Primerpaar ICheck1/ICheck4 (Spur 3 und Spur 7). Als Negativkontrollen für die RT-PCRs wurde bei der cDNA-Synthese keine Reverse Transkriptase zugesetzt. Diese Templates wurden in den Spuren 2, 4, 6, und 8 eingesetzt. In den Spuren 9 (Primerpaar ICheck1/catRT-PCR2) und 10 (Primerpaar ICheck1/ICheck4) ist die Negativkontrolle für die jeweilige PCR aufgetragen, bei der kein Template eingesetzt wurde. Die weißen Pfeile deuten auf die für alternatives Spleißen relevanten Banden hin (Spur 1 und Spur 5), die übrigen Amplifikate sind Nebenprodukte. **B:** Die RT-PCRs der Teilabbildung B wurden mit cDNA von CD37 Konstrukt Positivkontrolle durchgeführt. Die Präparation der für die cDNA-Synthese eingesetzte RNA wurde ebenfalls aus zwei unterschiedlichen Anzuchten vorgenommen. Der als Template eingesetzten cDNA der Spuren 1-4 liegt eine Anzucht bei 1 µg/ml Chloramphenicol zugrunde. Der cDNA, die in den Spuren 5-8 als Template diente, liegt eine Anzucht bei 6 µg/ml Chloramphenicol zugrunde. Zum Nachweis von konventionellem Spleißen wurde das Primerpaar ICheck1/catRT-PCR2 eingesetzt (Spur 1 und Spur 5). Alternatives Spleißen konnte mit dem Primerpaar ICheck1/ICheck5 nachgewiesen werden (Spur 3 und Spur 7). Zur Unterscheidung von den Nebenprodukten deuten hier ebenfalls weiße Pfeile auf die korrekten Banden. Die Negativkontrollen sind entsprechend der Teilabbildung A.

3.4.6.4 Absicherung der Ergebnisse der RT-PCR durch Sequenzanalysen

Ein funktionelles Fusionsprotein setzt voraus, dass über den Spleißvorgang das 5'-Exon (hier das *tcdA*-Gen) und das 3'-Exon (hier der resistenzvermittelnde Anteil) ligiert werden, ohne dass Punktmutationen oder eine Frameshift-Mutation stattfinden. Um sicherzustellen, dass die Spleißreaktionen im Kontext derart komplexer Konstrukte korrekt ablaufen, war es erforderlich die RT-PCR Produkte über eine Sequenzierung zu überprüfen. Zunächst wurden die Amplifikate in den pCR2.1 Vektor des TopoTA Cloning Kits kloniert und anschließend der Sequenzanalyse zugeführt. Im Ergebnis wurde die in der Theorie vorgegebene Sequenz der Fusionsproteine, sowohl des auf alternativem Spleißen beruhendem als auch des auf konventionellem Spleißen beruhenden Fusionsproteins, bestätigt. Die Nebenprodukte erwiesen sich als unspezifische PCR Produkte oder als aufgrund anderer sekundärer Spleißstellen generierte Fragmente.

Die Ergebnisse der RT-PCRs und der Sequenzanalyse liefern den Beweis, dass durch das Intron *CdIS1* alternative RNA-Spezies gebildet werden können. Damit ist die Voraussetzung für die Generierung modifizierter Proteine geschaffen. Dieser Sachverhalt konnte hier erstmals *in vivo*, im natürlichen Wirt des Introns, gezeigt werden.

3.4.7 Direkter Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität

Einen Beleg dafür, dass die Voraussetzungen für die Expression eines resistenzvermittelnden Fusionsproteins vorhanden sind, lieferten die durchgeführten RT-PCRs und Sequenzanalysen. Einen indirekten Beweis für die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase erbrachten die Untersuchungen zur Ermittlung der minimalen Hemmstoffkonzentration gegenüber Chloramphenicol. Ein einfacher und schneller Nachweis für die enzymatische Aktivität des Proteins ist in der Fachliteratur dokumentiert. Es handelt sich hierbei um einen Schnelltest, der als Rapid CAT Assay bezeichnet wird [80]. Dem Test liegt der Wirkmechanismus der Chloramphenicol-Acetyltransferase zugrunde. Das Enzym überträgt eine Acetyl-Gruppe von Acetyl-Coenzym A auf die primäre Hydroxylgruppe an C6 des Chloramphenicol. Das kovalent modifizierte Antibiotikum bindet nicht mehr an Ribosomen, die Proteinbiosynthese ist damit nicht mehr blockiert. Entstandenes CoenzymA kann durch die Reaktion mit dem Farbreagenz 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) nachgewiesen werden [80, 81]. Die Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität bewirkt eine sichtbare Intensivierung der Gelbfärbung im Vergleich zur Kontrolle.

Da der Rapid CAT Assay mit *Haemophilus influenzae* etabliert wurde, mussten die Bedingungen an *C. difficile* angepasst werden. Zunächst wurden die zu überprüfenden *C. difficile* CD37 Isolate, die Negativkontrolle, die Positivkontrolle und der das Konstrukt zur Analyse von alternativem Spleißen enthaltende Stamm auf BHI-Agar-Platten angezogen und nachfolgend in den Test eingesetzt. Von jedem Isolat wurden zwei Proben dafür herangezogen, eine für die Testreaktion, die andere als Kontrolle. Über einen Vergleich der Gelbfärbung zwischen der Testreaktion und der Kontrolle war ein Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität möglich. Das Ergebnis des Rapid CAT Assays ist in Abb. 3.20A-D dargestellt. Die Negativkontrolle zeigte keinerlei Farbunterschied zwischen der Testreaktion und der Kontrolle (Abb. 3.20B). In Abwesenheit des Enzyms Chloramphenicol-Acetyltransferase war dieses Ergebnis auch zu erwarten. Bei dem auf alternativem Spleißen beruhenden Chloramphenicol-Acetyltransferase Fusionsprotein ist zwischen der Testreaktion und der Kontrolle ein Farbunterschied erkennbar (Abb. 3.20C). Am stärksten ist dieser Unterschied allerdings bei der Positivkontrolle ausgeprägt (Abb. 3.20D). In beiden Fällen ist damit die Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität nachgewiesen und damit letztlich auch das Enzym selbst.

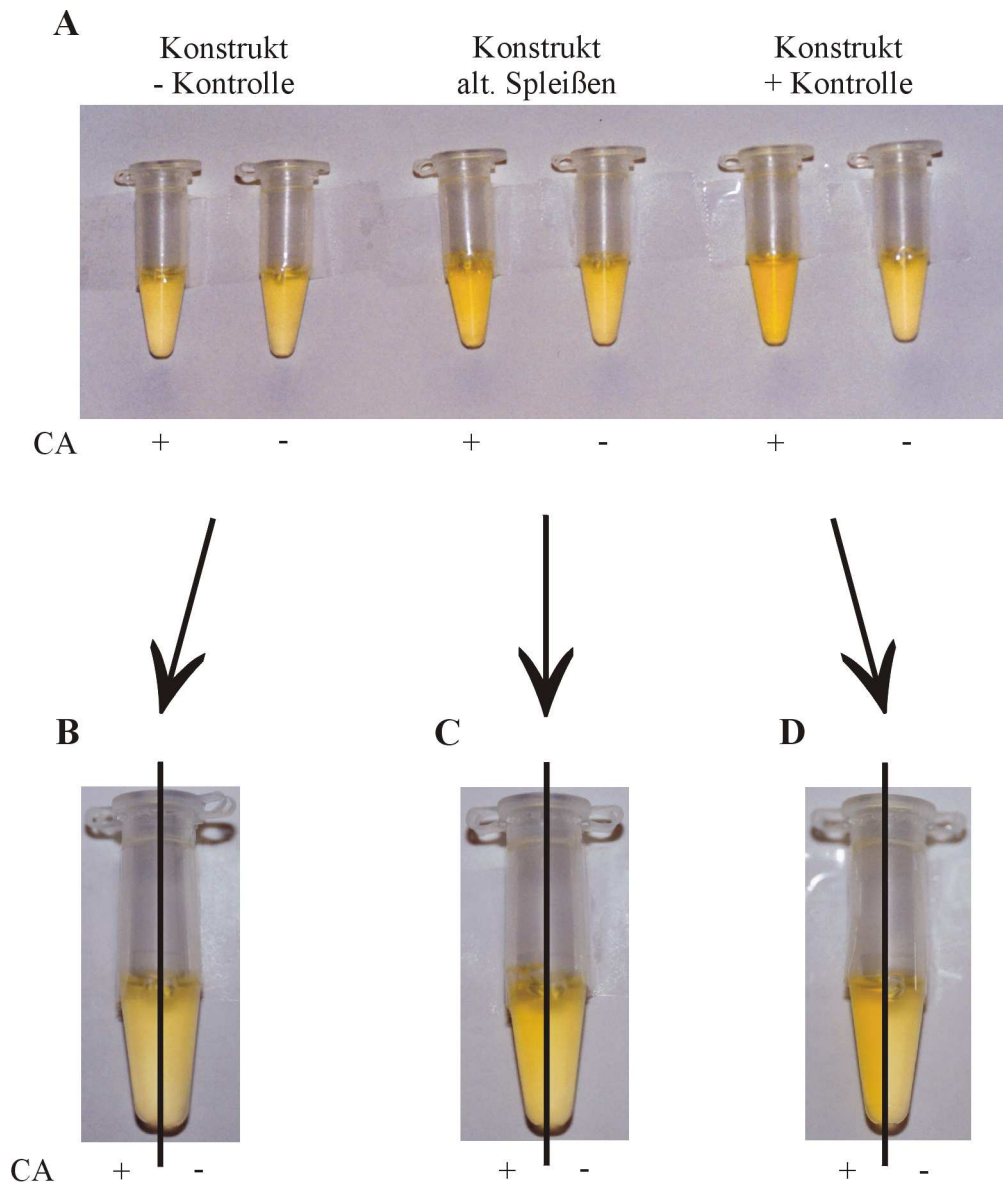


Abb. 3.20: Rapid CAT Assay nach Azemun *et al.* [80]. **A:** Teilabbildung A bietet einen Gesamtüberblick über das Testergebnis bei allen drei Konstrukten. **B:** Der Ansatz CD37 Konstrukt Negativkontrolle zeigt keinerlei Farbunterschied zwischen Testreaktion und Kontrollreaktion. **C:** Die Probe CD37 Konstrukt alternatives Spleißen zeigt in der Testreaktion eine stärker ausgeprägte Gelbfärbung als in der Kontrollreaktion. Damit ist eine Aktivität der Enzyms Chloramphenicol-Acetyltransferase nachgewiesen. **D:** Der Test mit CD37 Konstrukt Positivkontrolle liefert ein sehr deutliches Resultat. Die Gelbfärbung der Testreaktion ist hier wesentlich stärker ausgeprägt als bei der Kontrollreaktion. Hier ist die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase eindeutig nachgewiesen.

4 DISKUSSION

4.1 CdISt1 als Prototyp für ein auf eubakterielle Gene adaptiertes Gruppe I Intron

4.1.1 Die Fundorte des Gruppe I Introns CdISt1

Eine Reihe von ungewöhnlichen Eigenschaften kennzeichnen den Stamm *C. difficile* C34 als exponiertes Isolat der Spezies *C. difficile*. So führte die Applikation von TcdB-C34 zu Kulturzellen nicht zu einem für *C. difficile* Toxine typischen D-Typ zytopathischen Effekt (CPE), sondern zu einem für das *C. sordellii* Toxin TcsL typischen S-Typ CPE [85]. Mit dieser Beobachtung im Einklang steht die aussergewöhnliche enzymatische Aktivität des Toxins [85]. Eine weitere bedeutende Entdeckung war die Feststellung einer Variation im PaLoc von *C. difficile* C34. Hier ist eine Insertion von 1975 bp im *tcdA*-Gen vorzufinden, die als Gruppe I Intron identifiziert werden konnte (Abb. 3.1A und Abb. 3.2A). Damit handelt es sich um das erste in einem eubakteriellen Gen vorgefundene Gruppe I Intron. Im Stamm C34 konnten 11 weitere Varianten des Introns identifiziert werden, die ausschliesslich in eubakterielle Gene inseriert sind (Abb. 3.8). Ein ausgedehntes PCR-Screening mit intronspezifischen Primern (vgl. 3.3.1) und eine Southern Hybridisierung mit einer CdISt1-Sonde (vgl. 3.3.2) führte bei allen getesteten *C. difficile* Isolaten zum Nachweis des Introns bzw. seiner Varianten. Einigen dieser offenen Leseraster konnten bei einer Datenbanksuche Homologien zu bekannten bakteriellen Proteinen nachgewiesen werden. Die entsprechenden Daten sind Tabelle 4.1 zu entnehmen. Die Resultate bei Vertretern anderer clostridialer Spezies waren sowohl beim PCR-Screening als auch bei der Southern Hybridisierung durchweg negativ, so dass das Gruppe I Intron als spezifisches Merkmal für *C. difficile* angesehen werden kann.

CdISt1-Variante	Homologer ORF - Spezies	Acc. No
CdISt1a	Alkohol Dehydrogenase – <i>Thermogota maritima</i>	AAD35205
CdISt1c	Virulenzfaktor – <i>Escherichia coli</i>	P75932
CdISt1d	potentieller AraC-Typ Regulator – <i>Ruminococcus flavefaci</i>	CAB51935
CdISt1e	Aspartat Racemase – <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2649148
CdISt1f	potentieller Transkriptionsregulator – <i>Mycobacterium leprae</i>	CAA18564
CdISt1g	Potentiell integrales Membranprotein – <i>Streptomyces coelicolor</i>	CAB52363
CdISt1i	16S Pseudouridylat Synthase – <i>Thermotoga maritima</i>	AAD35352
CdISt1j	Pyruvat-Format Lyase-aktivierendes Enzym – <i>Clostridium pasteurianum</i>	CAA63749

Tab. 4.1: Integrationsstellen von ausgesuchten CdISt1-Varianten.

4.1.2 Die zwei Komponenten von *CdIS1*

Aus der RNA-Sekundärstruktur von *CdIS1* ist erkennbar, dass dieses Gruppe I Intron sich in einer Reihe von Merkmalen von bislang beschriebenen Gruppe I Introns unterscheidet (Abb. 3.2A). Die größte Ähnlichkeit besteht zu Gruppe I Introns des IA2 Subtyps, der sich durch die Ausbildung der Pairings P7.1 und P7.2 kennzeichnet und zudem wie *CdIS1* über die Pairings P9, P9.1 und P9.2 verfügt [53]. Die ausgedehnte P5 Domäne von *CdIS1* ist allerdings nicht in Gruppe IA2 Introns vorzufinden, in diesem Bereich ähnelt *CdIS1* eher Introns des Subtyps IC [53]. Den Subgruppen-spezifischen Strukturen wird eine den katalytischen Kern des Ribozyms stabilisierende Funktion zugewiesen [53, 90]. Es ist des weiteren anzumerken, dass *CdIS1* kein P10 Pairing zugeordnet werden kann. Dieses Pairing beinhaltet Sequenzen des 3'-Exons und wird als funktionell nicht unbedingt notwendig erachtet [33, 91].

CdIS1 grenzt sich in einem weiteren Punkt sehr deutlich von anderen Gruppe I Introns ab. Als Hauptunterschied zu den bislang beschriebenen Gruppe I Introns muss der Sequenzbereich 3' der P9 Domäne von *CdIS1* angeführt werden. Innerhalb dieses Sequenzbereiches sind zwei offene Leseraster lokalisiert, die sich über 105 bp (Position 631-788 von *CdIS1*) bzw. 1116 bp (Position 740-1858 von *CdIS1*) erstrecken und die gleiche Orientierung der Leserichtung besitzen (Abb. 3.2A). Das größere offene Leseraster beginnt mit dem alternativen Startcodon GTG. Eine mögliche kleinere Variante dieses offenen Leserasters kann 33 bp weiter downstream mit einem ATG Startcodon initiieren. Die Lokalisation der offenen Leseraster ist atypisch für bislang beschriebene Gruppe I Introns. In der Regel sind ORFs in peripheren Loops verschiedener Pairings (z.B. P1, P2 oder P9) vorzufinden [31]. Im Falle von *CdIS1* befinden sich die zwei offenen Leseraster allerdings abseits der eigentlichen Intronstruktur 3' der P9 Pairings (Abb. 3.2A). Wie bereits unter 3.2.1 angeführt, wies eine Homologiesuche mit der Aminosäuresequenz der offenen Leseraster Beiden eine hohe Homologie zu Transposasen zu. Aus diesem Grund wurden die offenen Leseraster *tlpA* und *tlpB* benannt (transposase-like protein). Transposasen sind Bestandteil von IS Elementen [92]. Im Zusammenhang mit Introns sind diese Proteine bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht beschrieben worden. Gruppe I Introns müssen nicht notwendigerweise ORFs enthalten. Die bislang in der Literatur erwähnten offenen Leseraster konnten Maturasen oder Endonukleasen zugeordnet werden, die sich anhand charakteristischer Sequenzmotive in vier Familien unterteilen lassen (H-N-H-, GIY-YIG-, LAGLIDADG-Motiv und His-Cys-Box) [36]. Einen Überblick über die zu TlpA und TlpB homologen Transposasen bietet Tabelle 4.2. Hier wird dokumentiert, dass TlpA Homologien zu Transposasen der IS200 Familie besitzt. Diese Homologie bezieht sich auf das C-terminale Ende der IS200 Transposasen, die alle wesentlich größer sind als das nur 35 Aminosäuren große TlpA. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass TlpA das Überbleibsel einer ursprünglich größeren IS200 homologen Transposase ist. TlpB besitzt Homologien zu Transposasen der IS1341 Familie und ist

offensichtlich als komplette potentielle Transposase erhalten. Die bei *CdIS1* vorliegende aufeinanderfolgende Organisation zweier Transposasen ist kennzeichnend für Insertionselemente der IS605 Familie. Zumeist ist bei dieser Familie allerdings die Transkriptionsrichtung der Transposasegene entgegengesetzt zueinander [93]. Die in Tabelle 4.2 dargestellten Daten belegen die Homologie der Transposasen von *CdIS1* zu den Transposasen TnpB und TnpA der Insertionselemente IS605 und IS606 von *Helicobacter pylori*. Anhand der Tabelle 4.2 und Abb. 4.1A ist zu ersehen, dass TlpA und TlpB die größten Homologien zu den Transposasen TnpB und TnpC von *Deinococcus radiodurans* aufweisen. Diese Transposasen sind Bestandteil des Insertionselements IS8301 (Accession Number AB016803), welches ebenfalls in die IS605 Familie gruppierbar ist. Wie bei den Transposasegenen von *CdIS1* ist bei *tnpB* und *tnpC* die Leserichtung beider Gene gleich. Darüber hinaus ist bei den Transposasen TlpB (*CdIS1*) und TnpC (IS8301) ein DDE-Sequenzmotiv vorhanden (Abb. 4.1B). Bei dieser Triade ist die Reihenfolge Asparaginsäure-Asparaginsäure-Glutaminsäure (in Kurzform DDE) so angeordnet, dass diesem Motiv eine direkte Beteiligung an der katalytischen Aktivität von Transposasen zugeschrieben werden kann [94]. Die Aminosäuren des DDE-Motivs koordinieren vermutlich divalente Metallionen, insbesondere Mg^{2+} [94]. Eine weitere auffällige Gemeinsamkeit von *CdIS1* und IS8301 lieferte der Vergleich beider Gesamtsequenzen miteinander. Ein sich über 30 bp erstreckender hochkonservierter DNA-Abschnitt, der bei den beiden Elementen zu 93% identisch ist, befindet sich in ähnlicher Lage am 5'-Ende von *CdIS1* bzw. IS8301 (Abb. 4.2). Der Anfang und das Ende dieses Sequenzabschnitts sind in Abb. 3.2A jeweils mit einem grünen Stern gekennzeichnet. Für den Transpositionsvorgang ist es erforderlich, dass Transposasen Sequenzfolgen im endständigen Bereich erkennen und binden [94]. Die hohe Homologie des 30 bp Abschnitts in *CdIS1* zu einer entsprechenden Sequenzfolge in IS8301 legt die Schlussfolgerung nahe, dass dieser Sequenzabschnitt für die Mobilität des Elements von Bedeutung ist. Die Zielsequenzen für die Integration von IS Elementen in potentielle Insertionsstellen und die Genauigkeit mit der diese Sequenzen erkannt werden, variieren je nach Element beträchtlich [92]. Beiden Elementen ist gemeinsam, dass ihr 5'-Ende direkt nach einer konservierten TTGAT Nukleotidfolge inseriert ist (Abb. 4.2). Konservierte Pentanukleotide sind als Zielsequenzen für die Integration von Insertionselementen der IS605 (TTTAA) und IS606 Familie (TTTAT) bekannt [93]. Insertionselemente dieser Familien haben des weiteren die charakteristische Eigenschaft, dass sie im Gegensatz zur Mehrheit der Insertionselemente, bei der Integration ihre Zielsequenz nicht duplizieren oder deletieren [92]. Die *tcdA*-Sequenz von *C. difficile* C34 als Integrationsort von *CdIS1* weist ebenfalls keine Sequenzduplikation auf, so dass in Anbetracht aller Gemeinsamkeiten von *CdIS1* zu IS8301, der IS605 und der IS606 Familie auf ähnliche Mechanismen zur Mobilität geschlossen werden kann.

Spezies ^a	Bezeichnung	Familie	Lokalisierung	Größe ^b (in AS)	Aminosäuren		Acc. No. ^f
					Identität ^c (in %)	konservativ ersetzt ^d (in %)	
<i>Clostridium difficile</i>	TlpA	IS200 homolog	Cd/Sr1	35	100	100	
<i>Deinococcus radiodurans</i>	TnpB	IS200 homolog	IS8301	140	62	79	BAA32389
<i>Wolbachia</i> sp.	transposase	IS200 homolog	ISW1	144	43	58	BAA73610
<i>Helicobacter pylori</i>	TnpA	IS200 homolog	IS606	64	40	63	AAD06404
<i>Helicobacter pylori</i>	TnpA	IS200 homolog	IS605	138	40	63	AAD11513
<i>Vibrio cholerae</i>	TnpA	IS200 homolog	IS1004	145	46	61	CAA91526
<i>Clostridium difficile</i>	TlpB	IS1341 homolog	Cd/Sr1	372	100	100	
<i>Deinococcus radiodurans</i>	TnpC	IS1341 homolog	IS8301	408	48	63	BAA32390
<i>Thermophilic bacterium</i> PS3	transposase like protein of PS3IS	IS1341	IS1341	369	40	59	BAA07634
<i>Dichelobacter nodosus</i>	ORF375	IS1341 homolog	IS1253	375	41	55	AAB12365
<i>Borrelia burgdorferi</i>	transposase like protein	IS1341 homolog	n.d.	355	39	58	AAC97568
<i>Escherichia coli</i>	hypothetical transposase	IS1341 homolog	Collb-P9	391	36	55	CAB41498
<i>Shigella sonnei</i>	transposase	IS1341 homolog	Collb-P9	393	36	55	BAA75131
<i>Synechocystis</i> sp.	transposase	IS1341 homolog	n.b.	400	37	55	BAA17870
<i>Helicobacter pylori</i>	TnpB	IS1341 homolog	IS605	427	38	57	AAC44690
<i>Helicobacter pylori</i>	TnpB	IS1341 homolog	IS606	442	28	44	AAD06403

^a Auflistung der Spezies gemäss ihrer Zuordnungsmöglichkeit zu TlpA oder TlpB

^b Gesamtgröße des zur Accession Number gehörigen Open Reading Frames

^c Mit TlpA bzw. TlpB identische Aminosäuren

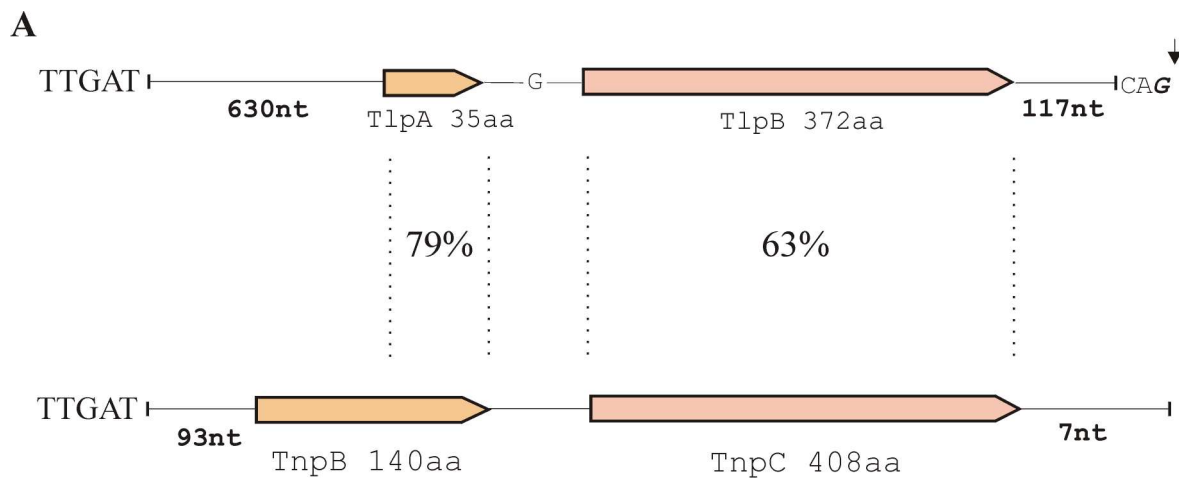
^d Konservativ substituierte Aminosäuren

^e Anzahl der Aminosäuren in der Sequenz, die bei der Computeranalyse überlappen

^f Accession Number der Sequenz in der Datenbank

n.b. nicht bestimmt

Tab. 4.2: Transposasen mit Homologie zu TlpA und TlpB.

**B****TlpB**

GL**D**LGIKEFCI- (52) -NQRN**D**FLQKLST- (27) -SISDVSWSEFIRQL**E**YKANWYGR
 |*|*||*|* |*| || ||*| |||| | ||||| | ||| ||||
 GV**D**VGIKDFAI- (55) -NKRQ**D**FLHKLTT- (27) -SISDAGWGEFIRQL**E**YKAAWYGR

TnpC

Abb. 4.1: Homologievergleich der Transposasen von *CdISt1* und *IS830I* und das DDE-Sequenzmotiv. **A:** Die durch punktierte Linien eingegrenzten Bereiche zeigen die relevanten Abschnitte der Transposasen. Die Aminosäuresequenz von TlpA (*CdISt1*) weist in diesem Abschnitt zu 79% ähnliche Aminosäuren auf wie TnpB (*IS830I*). Die Ähnlichkeit zwischen TlpB (*CdISt1*) und TnpC (*IS830I*) beträgt 63%. Das Pentanukleotid 5' beider Elemente ist von identischer Sequenz. **B:** Sowohl TlpB (*CdISt1*), als auch TnpC (*IS830I*) besitzen das für Transposasen charakteristische DDE-Motiv. Die Abstände zwischen den namensgebenden Aminosäuren des Motivs sind in Klammern angegeben, identische Aminosäuren sind über einen vertikalen Strich verbunden, konservativ substituierte mit einem Stern gekennzeichnet.

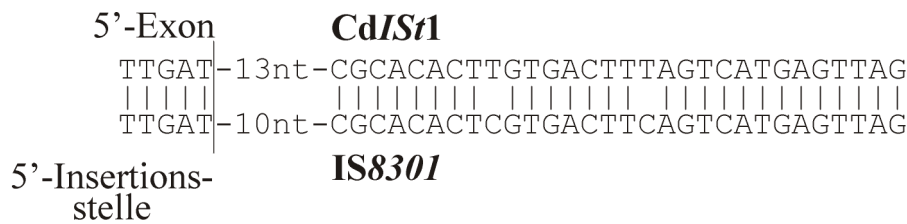


Abb. 4.2: Sequenzvergleich zwischen *CdIS1* und *IS8301*. Sequenzvergleich des konservierten 30 Nukleotide Abschnitts im 5'-Bereich der beiden Elemente und der 5'-Integrationsstelle. Der 30 Nukleotide umfassende Abschnitt ist bis auf zwei Ausnahmen absolut identisch. Gleiches gilt auch für das Pentanukleotid der 5'-Integrationsstelle.

Der hier dargestellte chimäre Aufbau von *CdIS1*, bestehend aus einem Intron-Anteil und einem IS Element-Anteil, muss als das charakteristische Merkmal dieses genetischen Elements definiert werden.

4.1.3 Hypothese zur Entstehung von *CdIS1*

Der als charakteristisches Merkmal definierte chimäre Aufbau von *CdIS1* legt die Vermutung nahe, dass das Ribozym sich aus zwei Vorläuferkomponenten entwickelt hat. Zum einen aus einem Gruppe I Intron Vorläufer und zum anderen aus einem IS Element Vorläufer (Abb. 4.3). Der Gruppe I Intron Vorfahre könnte in das *tlpA*-Gen des IS Element Vorläufers inseriert sein und über die Ausbildung einer stabilen P9.0 Paarung (Abb. 3.2A) könnte sich dann das chimäre Gruppe I Intron *CdIS1* manifestiert haben. Vorstellbar ist auch eine homologe Rekombination zwischen beiden Vorfahren, welche das chimäre Ribozym zum Ergebnis hat. Da in *C. difficile* bislang weder die Vorläuferelemente noch rudimentäre Fragmente von ihnen detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass das Intron *CdIS1* über horizontalen Gentransfer zu dem heutigen Wirt gelangt ist. Der Versuch den möglichen Ursprungs-Wirt über eine Datenbanksuche mit *CdIS1*-Sequenzen zu identifizieren, führte zu keinem Ergebnis, so dass dessen Identität bis auf weiteres nicht aufgeklärt werden kann.

Unter den der Hypothese zugrundeliegenden Gesichtspunkten kann nicht davon ausgegangen werden, dass bei dem Entstehungsvorgang von *CdIS1* beide Vorläuferkomponenten gleichberechtigt beteiligt waren. Im Ergebnis besteht *CdIS1* aus einer vollständigen Intron-Komponente und einer unvollständigen IS Element-Komponente. Der ursprüngliche Aufbau des IS Elements ist bei der Entstehung des chimären Ribozyms zerstört worden.

Gruppe I Intron Vorfahre

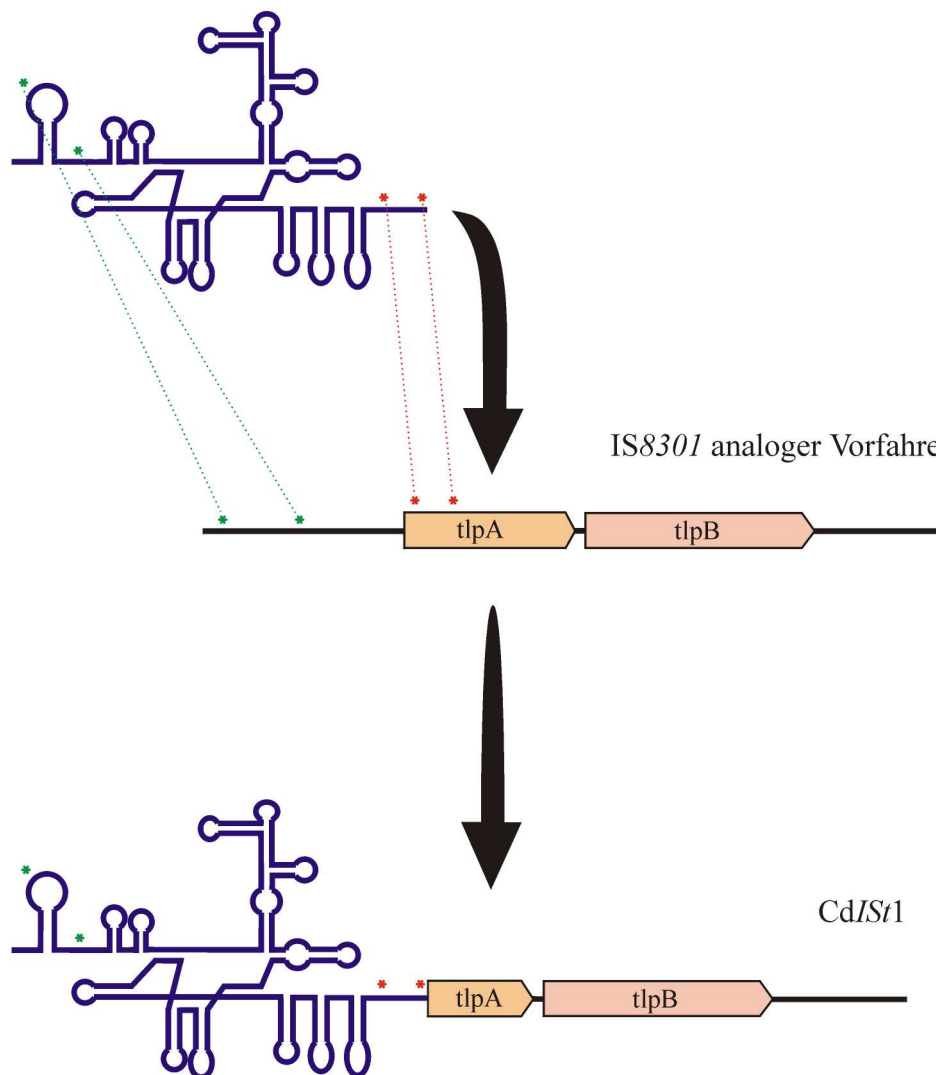


Abb. 4.3: Modellvorstellung zur Entstehung von *CdIS1*. Die chimäre Struktur des Gruppe I Introns ist möglicherweise auf eine Integration des Intron Vorfahren in das Gen der potentiellen Transposase TlpA des IS Element Vorfahren zurückzuführen. Vorstellbar ist auch eine homologe Rekombination zwischen gleichen Sequenzabschnitten, die hier mit grünen bzw. roten Sternen gekennzeichnet sind. Im 5'-Bereich (grüne Sterne) sind Sequenzhomologien zwischen der Intron-Komponente von *CdIS1* und *IS8301* belegt (vgl. Abb. 4.2), für den mit roten Sternen markierten, weiter 3' gelegenen Sequenzbereich sind allerdings keine signifikanten Sequenzhomologien nachweisbar. Trotz dieses Sachverhalts könnten die Vorläuferelemente von *CdIS1* in dem betreffenden 3' gelegenen Bereich die für eine homologe Rekombination erforderlichen Homologien besessen haben.

4.1.4 Der atypische strukturelle Aufbau des Introns *CdIS1* beeinträchtigt nicht dessen Funktionalität

Aufgrund der Lage der offenen Leseraster *tlpA* und *tlpB* von *CdIS1* ist das P9.0 Pairing über eine sehr große Distanz hin ausgebildet (Abb. 3.2A). Keines der bislang beschriebenen Gruppe I Introns kann eine vergleichbar ausgedehnte P9.0 Paarung vorweisen. Dem P9.0 und dem P10 Pairing wird eine zentrale Rolle bei der Koordination der 3'-Spleißstelle zugeschrieben [31, 33, 53]. Die Tatsache, dass für *CdIS1* kein P10 Pairing nachweisbar ist, unterstreicht die Bedeutung des P9.0 Pairings für dieses Intron. Die in 3.2.2 dargestellten Analysen zur Spleißaktivität von *CdIS1* belegen eindeutig die Funktionalität des Introns. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Gen *tcdA-C34* als Integrationsort von *CdIS1* ebenfalls funktionell translatiert wird (Abb. 3.1B und 3.1C). Voraussetzung hierfür ist effizientes Spleißen von *CdIS1* aus der Vorläufer-mRNA. Für *CdIS1* konnte des weiteren eine für viele Gruppe I Introns typische Zyklisierung nach dem Spleißvorgang nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Die Spleißaktivität wurde auch bei allen *CdIS1*-Varianten belegt (Abb. 3.10), womit nachhaltig die Funktionalität dieses speziellen Typus von Gruppe I Introns bewiesen ist.

4.1.5 Vorteile der chimären Struktur von *CdIS1*

Bei der Betrachtung von *CdIS1* wird deutlich, dass der Intron-Anteil vollständig vorhanden ist. Der IS Element-Anteil beschränkt sich auf die potentiellen Transposasogene *tlpA* und *tlpB*, wobei der *tlpA*-Anteil lediglich ein Überbleibsel des ursprünglichen Gens ist (Abb. 3.2A). Zieht man in Betracht, dass bei den *CdIS1* Typus II Varianten *CdIS1a*, *CdIS1c*, *CdIS1d*, *CdIS1h*, *CdIS1i* und *CdIS1j* der *tlpA*-Anteil vollständig fehlt, so kann auf dessen Verzichtbarkeit geschlossen werden. Für die Funktionalität des Elements sind demnach die Intron-Komponente und das potentielle Transposasogen *tlpB* von essentieller Bedeutung.

Transposasen sind für die Mobilität von IS Elementen verantwortlich, indem sie an ihre spezifische Zielsequenz binden und die DNA an der Integrationsstelle schneiden [92, 94]. Die gleiche Funktion erfüllen die für Gruppe I Introns typischen Endonukleasen, allerdings mit einem entscheidenden Unterschied. Die Erkennungssequenzen für Endonukleasen umfassen i.d.R. 12-40 Basenpaare [37, 95]. Die von Endonukleasen vermittelte Mobilität von Gruppe I Introns wird als Intron Homing bezeichnet [31, 32, 36, 37, 95]. Bei diesem Vorgang integriert das Intron in ein Intron-freies Allel. Die ausgedehnte Erkennungssequenz und die damit verbundene hohe Spezifität der Endonuklease stellen dabei kein Mobilitätshindernis dar. Grundlegend unterschiedlich stellt sich die Situation im bakteriellen Genom dar. Solche ausgedehnten und hochspezifischen Erkennungssequenzen sind für die Mobilität ein

beträchtlicher Nachteil, da potentielle Integrationsorte mangels Intron-freier Allele faktisch nicht vorhanden sind. Daher kann die potentielle Transposase TlpB von *CdIS1* einen entscheidenden Vorteil gegenüber den Endonukleasen offerieren. Das als Zielsequenz für die Transposase definierte Pentanukleotid TTGAT liefert eine ausreichend große Zahl möglicher Integrationsstellen für das Intron im bakteriellen Genom. Darüber hinaus ist das Pentanukleotid auch an der Ausbildung des P1 Pairings beteiligt. Vier der fünf Nukleotide bilden Basenpaarungen zur Internal Guide Sequence (IGS) aus (Abb. 4.4). Auf diese Weise ist die Formation des P1 Pairings immer gewährleistet, welches für die Koordination der 5'-Spleißstelle essentiell ist. Das an der Integrationsstelle von *CdIS1* keine Sequenzduplikation erfolgte, wie es bei der Integration von IS Elementen der Regelfall ist, ist wahrscheinlich auf die potentielle Transposase TlpB zurückzuführen. TlpB weist eine hohe Homologie zu den Transposasen der IS605 Familie auf (Tab. 4.2), deren charakteristische Eigenschaft eine Integration ohne Sequenzduplikation ist [92]. Sequenzduplikationen würden bei der Integration von *CdIS1* in bakterielle Gene mit großer Wahrscheinlichkeit zu Frameshift-Mutationen führen, die das Gen ausschalten könnten. Eine über TlpB vermittelte Mobilität des Introns würde, unter der Annahme gleicher Mobilitäts-Mechanismen wie bei IS605 Transposasen, diese Gefahr ausschliessen. Aber auch die Transposase könnte auf der anderen Seite entscheidend von der Intron-Komponente profitieren, da im Fall von *CdIS1* die Integration in ein bakterielles Gen nicht gleichbedeutend mit dessen Insertionsinaktivierung ist. Über die Spleißaktivität wird das Gruppe I Intron auf RNA Ebene aus dem Gen entfernt, womit das betreffende Gen funktionell weiterhin aktiv bleibt. Das Überleben des Wirtsbakteriums ist daher durch die Integration des Introns nicht wie bei der Integration von IS Elementen gefährdet.

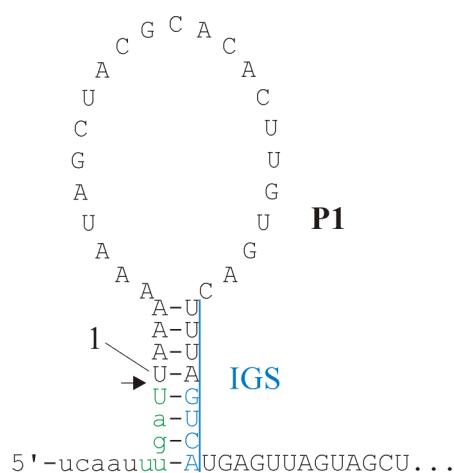


Abb. 4.4: Das P1 Pairing von *CdIS1*. Die Zielsequenz der potentiellen Transposase TlpB, TTGAT (UUGAU als RNA Sequenz, grün), ist bei *CdIS1* Bestandteil des P1 Pairings und bildet Basenpaarungen mit der Internal Guide Sequence (IGS, blau) des Gruppe I Introns aus.

4.1.6 Charakterisierung der wechselseitigen Beziehung zwischen der Intron-Komponente und der Transposase

Für klassische Gruppe I Introns wird ein symbiontisches Verhältnis zwischen dem Intron-Anteil und dem Endonuklease-Gen beschrieben [96]. Hier wird die Endonuklease als egoistische DNA angesehen, die dem Wirt (dem Intron) die Mobilität sichert und als Gegenleistung ein phenotypisch unauffälliges Versteck erhält [96].

Es stellt sich die Frage, ob diese Situation auch im Fall von *CdIS1* zutrifft. In Anbetracht des speziellen „Lebensraums“ dieses Gruppe I Introns, den eubakteriellen Genen, sollte diese Beziehung aber differenzierter betrachtet werden. Die Funktionalität von *CdIS1* im bakteriellen Genom erfordert das Zusammenwirken der beiden Komponenten, die damit unabdingbar aufeinander angewiesen sind. Klassische Gruppe I Introns benötigen nicht notwendigerweise einen ORF und werden nicht in eubakteriellen Genen vorgefunden. Der potentielle Nutzen der Transposase TlpB für *CdIS1* unter den im bakteriellen Genom vorliegenden Bedingungen wurde unter 4.1.5 ausführlich dargelegt. Die Transposase kann daher auch als egoistische DNA betrachtet werden, deren Ausbreitung durch die Intron-Komponente vorangetrieben bzw. in dieser Form erst ermöglicht wird. Den Intron-Anteil aber lediglich als Wirts-Vehikel zu sehen, wird der Beziehung im vorliegenden Fall nicht gerecht. Zutreffender ist eine Betrachtungsweise, die *CdIS1* als mobiles genetisches Element beschreibt, das aus einer Symbiose von egoistischer RNA (Intron-Anteil) und egoistischer DNA (Transposase) hervorgeht. Keine der Komponenten könnte den neuen Lebensraum in dieser Form für sich alleine erschliessen, worauf auch das Fehlen der potentiellen Vorläuferelemente im *C. difficile* Genom hindeutet.

Das ubiquitäre Vorkommen von *CdIS1* in der Spezies *C. difficile* beweist, dass diese Symbiose sehr erfolgreich ist. Wie in 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, ist das Gruppe I Intron bzw. dessen hochhomologe variante Formen in allen untersuchten *C. difficile* Isolaten in variabler Kopienzahl vertreten. Als Schlussfolgerung aus allen hier dargestellten Aspekten kann die Aussage getroffen werden, dass *CdIS1* die perfekte Adaption eines für eubakterielle Gene spezifischen Gruppe I Introns darstellt.

4.1.7 Zusammenfassung der kennzeichnenden Merkmale des neuen Typus von Gruppe I Introns

Das Gruppe I Intron *CdISt1* und seine varianten Formen definieren einen neuen Typus von Gruppe I Introns, der sich klar von bislang beschriebenen Vertretern abgrenzt. Einen Überblick hierzu liefert die folgende Auflistung der Merkmale dieses neuen Typus:

- Der chimäre Aufbau, bestehend aus einem Intron-Anteil gefolgt von einer IS Element-Komponente, ist kennzeichnend für diese Gruppe von Ribozymen.
- Die Intron-Komponente ist vollständig. Sie ähnelt Gruppe IA2 Introns, hat allerdings im Gegensatz zu ihnen eine ausgedehnte P5 Domäne. Die 3' folgende IS Element-Komponente ist nur unvollständig vorhanden. Das zentrale Element ist dabei die potentielle Transposase *TlpB*.
- Als Integrationsort für das mobile genetische Element dienen bevorzugt (möglicherweise auch ausschliesslich) eubakterielle Gene. Das Pentanukleotid TTGAT kann als Zielsequenz der potentiellen Transposase angenommen werden.
- Aufgrund der Insertion in verschiedene Gene ist die Ausbildung eines P10 Pairings bei diesem Typus von Gruppe I Introns nicht möglich. Das P9.0 Pairing erstreckt sich hier, aufgrund der atypischen Lokalisation der Gene *tlpA* und *tlpB*, über eine wesentlich größere Distanz im Vergleich zu anderen Gruppe I Introns.
- Der Typus des chimären Gruppe I Introns ist bislang auf den Wirt *C. difficile* beschränkt.

4.2 Die Relation des Gruppe I Introns *CdISt1* zu seinem Wirt *C. difficile*

4.2.1 *CdISt1* – ein Symbiont oder ein Parasit?

Eine Antwort auf diese Frage ist abhängig vom potentiellen Nutzen, den der Wirt aus dem Vorhandensein des Introns für sich ziehen kann. Die Vorstellung, dass Introns als Parasiten im Genom ihrer Wirte existieren und prinzipiell damit nur Ballast für diese darstellen, ist wenig plausibel. So ist beispielsweise bekannt, dass im stickstofffixierenden Bakterium *Azoarcus* sp BH72 die Anwesenheit eines Gruppe I Introns in einem tRNA-Gen

notwendig für die Ausbildung funktionsfähiger tRNA ist [97]. In eubakteriellen Genen konnte bislang mit *CdIS1* ausschliesslich bei *C. difficile* ein Gruppe I Intron identifiziert werden. Es ist davon auszugehen, dass es bei Eubakterien einen hohen Selektionsdruck zur Eliminierung von Introns gab und möglicherweise noch gibt [63]. Könnte *CdIS1* seinem Wirt keinen Vorteil offerieren, wäre seine Existenz in *C. difficile* auf lange Sicht gefährdet. Bei einem auf symbiontischer Natur basierenden Verhältnis des Introns zu seinem Wirt ist eine dauerhafte Etablierung im eubakteriellen Genom vorstellbar.

4.2.2 Die Variation von clostridialen Proteinen durch alternatives Spleißen

Das Gruppe I Intron *CdIS1* könnte durch alternatives Spleißen eine Rolle in der Evolution clostridialer Proteine spielen und auf diese Weise seinem Wirt von Nutzen sein. Alternatives Spleißen ist ein unkonventioneller Spleißprozess, bei dem nicht die reguläre 3'-Spleißstelle beim Spleißvorgang genutzt wird, sondern eine im Intron gelegene sekundäre Spleißstelle. Dadurch wird das 5'-Exon an andere Sequenzabschnitte ligiert, was zur Transkription einer varianten mRNA Spezies führen kann. Da alternatives Spleißen im Vergleich zu konventionellem Spleißen deutlich seltener stattfindet, ist die Expression des ursprünglichen Proteins nicht nachhaltig beeinflusst. Sollte das alternative Genprodukt dem Wirt einen Vorteil bieten, kann es sich möglicherweise im Laufe der Evolution durch Selektionsdruck etablieren.

Mit der Generierung des Vektors pTransfer1 (Abb. 3.12) wurde im Rahmen dieser Arbeit die Voraussetzung dafür geschaffen, alternatives Spleißen in *C. difficile* zu untersuchen. Es wurde ein Modellsystem mit dem Reporter-gen Chloramphenicol-Acetyltransferase (*catP*) konzipiert und umgesetzt, mit dessen Hilfe *in vivo* Untersuchungen zum alternativen Spleißen durchgeführt werden konnten (Abb. 3.14). Die Zielvorgabe war der Nachweis eines auf alternativem Spleißen beruhenden Fusionsproteins, das dem Wirt eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol vermittelt. Damit wäre nachgewiesen, dass die Generierung alternativer Proteinspezies durch alternatives Spleißen nicht nur eine hypothetische Modellvorstellung ist, sondern tatsächlich *in vivo* abläuft. Über alternative Spleißvorgänge kann das Gruppe I Intron *CdIS1* dem Wirt *C. difficile* ein zusätzliches Evolutionspotential für seine Proteine bieten.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass alternatives Spleißen in *C. difficile* tatsächlich *in vivo* stattfindet. Eine Voraussetzung für die Generierung des Fusionsproteins ist die Transkription der alternativen mRNA. Diese konnte am Modellsystem mittels RT-PCR eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.19) und eine nachfolgende Sequenzierung der RT-PCR Produkte bestätigte die korrekte Sequenz des Fusionsproteins. Die Translation zu einem funktionsfähigen Fusionsprotein konnte ebenfalls belegt werden. Die minimale Hemmstoff-Konzentration (MHK) bei der Anzucht auf Selektivplatten von

C. difficile Transkonjuganten, deren Resistenz auf der Generierung eines durch alternatives Spleißen gebildeten Chloramphenicol-Acetyltransferase Fusionsproteins beruht, liegt mit 7 µg/ml Chloramphenicol über dem Wert des Wildtyps (4 µg/ml) bzw. der Negativkontrolle (4 µg/ml) und unter dem Wert der Positivkontrolle (8 µg/ml) (Tab. 3.2). Auffällig ist bei den vorliegenden Daten das nahe Beieinanderliegen der MHK-Werte, die auf alternatives Spleißen zurückzuführen sind mit den MHK-Werten, die auf konventionellem Spleißen beruhen. Möglicherweise ist dieser Sachverhalt auf eine Sekretion des Fusionsproteins in das Medium zurückzuführen, was zu einem Angleichen der Werte führt. Die Aktivität des Enzyms wurde zusätzlich über einen auf *C. difficile* angepassten Schnelltest, den Rapid CAT Assay, nachgewiesen (Abb. 3.20). Der Test konnte belegen, dass die als Reportergen eingesetzte Chloramphenicol-Acetyltransferase als ein aufgrund alternativer Spleißvorgänge gebildetes Fusionsprotein aktiv ist.

Die Versuche zeigen, dass über die Anwesenheit des Gruppe I Introns *CdIS1* in *C. difficile* die Generierung modifizierter Proteinspezies durch alternatives Spleißen erfolgen kann. Auf diese Weise könnte sich der Wirt *C. difficile* ein zusätzliches Evolutionspotential erschliessen.

4.2.3 Die mögliche Variation von clostridialen Proteinen über Exon Shuffling

Die Idee, dass über eine homologe Rekombination von Introns die Möglichkeit geschaffen wird, verschiedene Exons zu einer neuen Transkriptionseinheit zusammenzuführen, hatte W. Gilbert schon im Jahr 1978 [61]. Diese, später als Exon Shuffling bezeichnete Hypothese, konnte 1989 von der Arbeitsgruppe um D.A. Shub konkret bewiesen werden [62]. Im Bakteriophagen T4 befinden sich zwei eng verwandte Gruppe I Introns in den nah benachbarten Genen *td* und *nrdB*. Beide Gene werden in die gleiche Richtung transkribiert und zwischen ihnen liegen nur nicht-essentielle Gene. Es konnte eine Mutante identifiziert werden, welche im zwischen den Genen befindlichen Sequenzbereich eine Deletion aufwies und dessen Gruppe I Intron ein Hybrid aus den beiden nah verwandten Introns darstellt. Dem Gruppe I Intron Hybrid konnte *in vivo* und *in vitro* die Fähigkeit zu einer effizienten Spleißreaktion nachgewiesen werden. Die homologe Rekombination der Introns führt im Resultat damit zur Transkription von Exons verschiedener Gene, was ein direkter Beweis für Exon Shuffling ist.

Da das Gruppe I Intron *CdIS1* und seine Varianten hoch homolog zueinander sind (vgl. Tab. 3.1), ist Exon Shuffling auch für clostridiale Proteine denkbar (Abb. 4.5). Dabei ist allerdings auch hier zu bedenken, dass durch Exon Shuffling keine essentiellen Gene deletiert werden dürfen. Bei einer Genomgröße von 4,4 MB ist die Wahrscheinlichkeit, dass Intronvarianten eng benachbart in die eubakteriellen Gene integriert sind, nicht allzu groß, da die Zahl der Varianten zwischen nur 4 beim Referenzstamm VPI 10463 und 12 bei *C. difficile* C34 variieren.

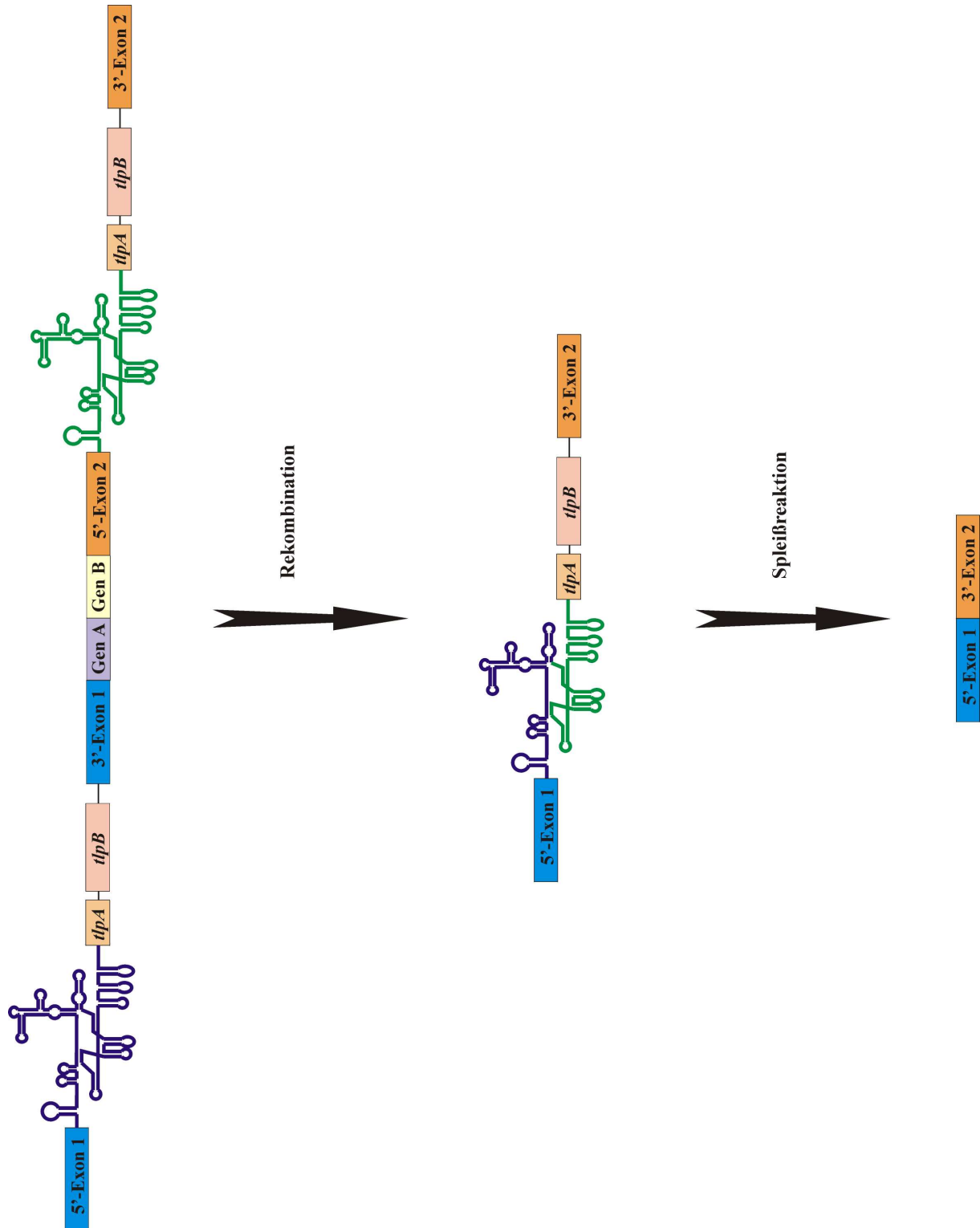


Abb. 4.5: Modellvorstellung zum Exon Shuffling durch *CdIS1*. Über die Rekombination zweier hoch homologer Varianten (blau und grün) entsteht ein funktioneller Intron Hybrid. Die zwischen den beiden Introns gelegenen Gene A und B wurden aufgrund des Rekombinationsereignisses deletiert, die Spleißreaktion führt zur Ligation von ehemals entfernt voneinander liegenden Exons.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es *C. difficile* Isolate mit weitaus höheren Kopienzahlen gibt. Je größer die Anzahl der Introns ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit für Exon Shuffling. Zudem kann an dieser Stelle angeführt werden, dass die Ausbreitung von *CdIS1* und seinen Varianten im Genom von *C. difficile* noch nicht abgeschlossen ist. Möglicherweise stehen wir am Anfang von einer Expansion dieser chimären Gruppe I Introns in das Genom von *C. difficile*. Ein weiterer Punkt, den es beim Exon Shuffling zu beachten gilt, ist die Integrationsphase der Introns. Die Integrationsphase beschreibt die Stelle im Kodon, in die das Intron inseriert ist. Nur bei einer korrelierten Integrationsphase können durch Exon Shuffling neu entstandene ORFs auch funktionell translatiert werden. Ist die Integrationsphase der Introns verschieden, so ist mit großer Sicherheit eine Frameshift-Mutation die Folge. Interessanterweise sind in *C. difficile* C34 9 der 12 Gruppe I Introns in der Integrationsphase 0 inseriert (vgl. Tab. 3.1). Inwieweit diese Integrationsphase tatsächlich präferiert wird, ist nach dem heutigen Stand der Dinge noch nicht abzuklären, da für eine statistisch gesicherte Aussage diesbezüglich die Integrationsphasen von weitaus mehr Gruppe I Introns dieses Typus bestimmt werden müssen. Zumindest deutet sich hier aber eine Tendenz zur Phase 0 an. Eine solche Korrelation zur Phase 0 wäre aus den o.a. Gründen für Exon Shuffling in *C. difficile* von großer Bedeutung.

4.3 *CdIS1* markiert einen Wendepunkt für die Historie von Gruppe I Introns und eubakteriellen Genen

4.3.1 *CdIS1* als evolutionsgeschichtlich neues Gruppe I Intron

Gruppe I Introns gelten als die ursprünglichsten Introns, da ein Intron an der exakt gleichen Stelle in der Leucin tRNA von allen untersuchten Cyanobakterien und Chloroplasten sowie auch in der tRNA^{Leu} verschiedener Eubakterien vorgefunden wurde [40, 42, 44, 57]. Damit gilt als gesichert, dass Gruppe I Introns zumindest so alt wie die Cyanobakterien sind und möglicherweise schon im Progenoten vorhanden waren [57].

Das Intron *CdIS1* und seine Varianten verkörpern allerdings nicht diese Ursprünglichkeit der Gruppe I Introns. Wie vorhergehend beschrieben, ist *CdIS1* sehr wahrscheinlich aus der Fusion zweier Vorläufer-Komponenten entstanden (Abb. 4.3). Da es nicht grundsätzlich im Genus *Clostridium*, sondern ausschliesslich in *C. difficile* vorzufinden ist, erscheint ein Vorkommen des Introns im gemeinsamen Vorfahren der Clostridien als sehr unwahrscheinlich. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass das Intron über horizontalen Gentransfer in den *C. difficile* Vorläufer gelangt ist und sich dort etablieren

konnte. Einen weiteren Hinweis darauf, dass *CdIS1* erst in der jüngeren Evolutionsgeschichte entstanden ist, liefern die bislang vorgefundenen 11 Varianten *CdIS1a* bis *CdIS1k*. Sechs dieser Varianten entsprechen dem *CdIS1*-Varianten Typus II, bei dem die rudimentäre Transposase TlpA fehlt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass für die Mobilität von *CdIS1* nur die potentielle Transposase TlpB notwendig ist. Mit der Deletion von TlpA würden daher überflüssige DNA-Sequenzen eliminiert. Das hätte zur Folge, dass das für die Koordination der 3'-Spleißstelle notwendige P9.0 Pairing über eine weniger große Distanz erfolgt, womit die Stabilität der Intronstruktur erhöht wäre. Diese nachhaltige Veränderung deutet darauf hin, dass *CdIS1* ein evolutionsgeschichtlich neues genetisches Element ist. Wäre es ursprünglicher Natur, so hätten sich die optimierten Varianten wesentlich stärker durchgesetzt und Unterschiede wären auf Punktmutationen beschränkt.

4.3.2 Die Rolle von *CdIS1* in der „Introns early“ und „Introns late“ Kontroverse

Nachdem De Souza und W. Gilbert vor kurzem einen plausiblen Erklärungsansatz in der Debatte um die „Introns early“ und „Introns late“ Theorien vorbringen konnten [64], stellt sich die Frage, wie sich das Gruppe I Intron *CdIS1* in dieses Konzept einordnen lässt. Nach De Souza und W. Gilbert sind ungefähr ein Drittel aller Introns ursprünglich und folgen daher Konventionen, wie sie in der „Introns early“ Theorie vorgegeben werden [55-57]. Die verbleibenden zwei Drittel der Introns sind erst später im Verlauf der Evolution in Gene inseriert und sind damit konform zur „Introns late“ Theorie [58-60].

Für *CdIS1* und seine Varianten kann es als gesichert angesehen werden, dass es sich nicht um ein ursprüngliches Intron gemäss der „Introns early“ Theorie handelt. Wie bereits ausführlich erörtert, stellt *CdIS1* einen neuen Typus von Gruppe I Introns dar, der aus einer Intron-Komponente und einer IS Element-Komponente besteht (vgl. 4.1.2). Des weiteren ist davon auszugehen, dass eine fortschreitende strukturelle Optimierung dieses Gruppe I Introns stattfindet (vgl. 4.3.1). Einen zusätzlichen deutlichen Hinweis darauf, dass *CdIS1* zu Introns, die der „Introns late“ Theorie folgen, gehört, liefert die Verteilung des Introns in den Genen des Wirts *C. difficile*. Von mehreren Hundert untersuchten Isolaten hat nur Stamm C34 das Intron *CdIS1* in das *tcdA*-Gen inseriert. Möglicherweise ist kürzlich mit *C. difficile* R10870 ein weiteres Isolat bei einer Typisierung entdeckt worden, das ebenfalls das Intron im *tcdA*-Gen integriert haben könnte [84]. Letztlich ist aber gesichert, dass die große Masse das Intron nicht an dieser Stelle vorzuweisen hat. Unter Annahme der „Introns early“ Theorie würde das bedeuten, dass fast alle *C. difficile* Stämme das Intron genau an dieser Stelle verloren hätten. Das gleiche müsste für alle weiteren solitären Integrationsorte auch angenommen werden, was insgesamt als wenig realistisch erscheint. Im Fall von *CdIS1* trifft die „Introns late“ Theorie zu, die von einer Insertion in bestehende Gene ausgeht. Neben seiner Klassifizierung als evolutionsgeschichtlich neues mobiles genetisches Element und der voneinander

unabhängigen Verteilung in verschiedene Gene, ist der Wirt an sich hier ebenfalls anzuführen. *CdIS1* ist bislang das einzige in eubakteriellen Genen gefundene Intron. Hätte hier die „Introns early“ Theorie bestanden, so würde das bedeuten, dass alle Eubakterien dieses Intron im Laufe der Evolution eliminiert hätten, nur *C. difficile* nicht. Das erscheint wenig plausibel, womit von der Gültigkeit der „Introns late“ Theorie für Introns der *CdIS1*-Gruppe auszugehen ist. Allerdings sollte ein kontroverser Punkt an dieser Stelle angemerkt werden. Gemäss der „Introns late“ Theorie ist eine Phasenkorrelation von Introns nicht vorgegeben, die Verteilung muss statistisch zu gleichen Teilen in die Phasen 0, 1 und 2 fallen. Das ist zumindest bei Stamm C34 nicht der Fall. Aus Tab. 3.1 geht hervor, dass 9 der 12 Introns in der Integrationsphase 0 integriert sind, 3 in Phase 1 und keines in der Phase 2. Die Anzahl an untersuchten Integrationsstellen ist allerdings viel zu gering, um verbindliche Aussagen ableiten zu können. In der Tendenz wird die Phase 0 aber offenbar bevorzugt. Grund dafür könnte die Zielsequenz TTGAT der Transposase TlpB sein, die möglicherweise eine Prädisposition für die Integrationsphase 0 liefert. Wie o.a. wäre dies eine optimale Voraussetzung für Exon Shuffling (vgl. 4.2.3.).

4.3.3 Die Rückkehr zu eubakteriellen Genen

Es ist eine gängige Vorstellung, dass Introns an der Entwicklung der ersten komplexen Gene im Progenoten entscheidenden Anteil hatten [56, 61]. Ihre Abwesenheit in der Gruppe der Eubakterien heutzutage wird durch eine Selektion hin zu einem „stromlinienförmigen“ Genom im Laufe der Evolution erklärt [63]. Die Entdeckung eines Gruppe I Introns in der Leucin tRNA von Cyanobakterien widerlegt eindeutig die Theorie, dass Introns generell späterevolutionären Ursprungs sind und daher nicht in Bakterien vorkommen [59]. Das Gruppe I Intron *CdIS1* ist allerdings aus den zuvor erörterten Gründen späterevolutionären Ursprungs und hat aufgrund seiner Fülle an Novitäten die Möglichkeit, sich eubakterielle Gene als „Lebensraum“ zu erschliessen. Unter der Annahme, dass Introns im Laufe der Evolution in Bakterien eliminiert wurden, stehen *CdIS1* und seine Varianten für eine Rückkehr von Introns zu eubakteriellen Genen. Trotz der Möglichkeit, dass Eliminationsmechanismen seitens der Bakterien, in diesem Fall im Speziellen von *C. difficile*, entwickelt werden könnten, scheint hier ein Wendepunkt in der Evolution markiert zu sein. Auch wenn der experimentelle Nachweis, dass die Mobilität von der potentiellen Transposase TlpB vermittelt wird noch ansteht, kann schon zum jetzigen Zeitpunkt das chimäre Gruppe I Intron *CdIS1* bzw. seine Varianten als ein invasives, mobiles genetisches Element angesehen werden. Alle erforderlichen Voraussetzungen, um sich in der neuen Umwelt behaupten zu können werden mitgebracht. Damit erscheint der Fortbestand des chimären Ribozyms in *C. difficile* gesichert und eine Ausbreitung zu anderen clostridialen Spezies ist vorstellbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Krankheitsbilder der Antibiotika-assoziierten Diarrhöe und der Pseudomembranösen Kolitis beim Menschen sind auf den humanpathogenen Keim *C. difficile* zurückzuführen [1]. Als Hauptvirulenzfaktoren sind die der Gruppe der Großen Clostridialen Zytotoxinen (LCTs) zugehörigen Toxine TcdA und TcdB identifiziert worden [2]. Ausgangspunkt dieser Arbeit waren PCR-Analysen mit verschiedenen *C. difficile* Stämmen, die zum Ziel hatten, variante Toxingene zu identifizieren. Das aus Kanada stammende klinische Isolat *C. difficile* C34 wies in seinem *tcdA*-Gen eine Besonderheit auf. In diesem Stamm konnte erstmals eine deutliche Vergrößerung der *tcdA*-Gens nachgewiesen werden. Die Identifikation der Vergrößerung als eine Insertion, die strukturelle Merkmale eines Gruppe I Introns und eines IS Elementes aufwies, bestimmte den Fortgang der Experimente der vorliegenden Arbeit und führte zur umfassenden Charakterisierung eines neuartigen genetischen Elements.

Gruppe I Introns sind RNA-Moleküle, die zu einer autokatalytischen Spleißreaktion befähigt sind [31-33]. Diese Eigenschaft beruht auf ihrer definierten RNA-Sekundär- und Tertiärstruktur. In Anlehnung an die katalytische Aktivität von Enzymen werden sie auch Ribozyme genannt. In dem als *CdIS1* bezeichneten genetischen Element aus *C. difficile* C34 wurde im 5'-Bereich die für Gruppe I Introns obligatorischen, konservierten kurzen Sequenzfolgen P, Q, R und S gefunden. Am 5'- und am 3'-Ende von *CdIS1* befanden sich die für die Definition der Spleißstellen notwendigen konservierten Nukleotide U (5'-Spleißstelle) und G (3'-Spleißstelle). Die Darstellung der RNA-Sekundärstruktur von *CdIS1* durch die Ausbildung einer Abfolge von Basenpaarungen, die als Pairings P1-P9 bezeichnet werden, wies *CdIS1* Ähnlichkeiten mit Gruppe I Introns der Untergruppe IA2 zu. Auffällig war, dass der 3' der P9 Pairings gelegene Anteil von *CdIS1* sich grundlegend von allen bislang bekannten Gruppe I Introns unterschied. Hier wurden zwei offene Leseraster identifiziert, welche bei Homologiesuchen mit den Aminosäuresequenzen hohe Homologien zu Transposasen aufwiesen. Die offenen Leseraster wurden daher als *tlpA* und *tlpB* (transposase like protein) bezeichnet. Gruppe I Introns wurden bis zu diesem Zeitpunkt nicht mit Transposasen in Zusammenhang gebracht. Der chimäre Aufbau von *CdIS1*, bestehend aus einem vollständigen Intron-Anteil und einem partiellen IS Element-Anteil, konnte als das wesentliche Charakteristikum dieses neuen Typus von Gruppe I Introns definiert werden.

Die aussergewöhnliche Struktur von *CdIS1* machte es erforderlich, funktionelle Analysen zur Spleißaktivität des Gruppe I Introns durchzuführen. Die Untersuchung der *in vivo* Spleißaktivität von *CdIS1* im Stamm C34 war über die Methode der RT-PCR möglich. Es konnte gezeigt werden, dass *CdIS1* aus dem primären Transkript ausgespleißt wurde und eine Sequenzierung des Spleißproduktes bestätigte, dass das 5'- und 3'-Exon in frame ligiert waren.

Die Suche nach *CdIS1*-verwandten Sequenzen im Genom über ein PCR-Screening ergab, dass jeder untersuchte *C. difficile* Stamm entsprechende Sequenzen aufwies, andere clostridiale Spezies waren bei der Analyse durchweg negativ. Die Kopienzahl des Introns im Genom von ausgewählten *C. difficile* Stämmen wurde über eine Southern Hybridisierung mit einer *CdIS1*-spezifischen Sonde bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass das Intron oder eine Intronvariante in einer von Stamm zu Stamm variablen Kopienzahl und Verteilung vorlag. Mit Hilfe der inversen PCR konnten zwölf Integrationsstellen von *CdIS1* bzw. dessen Varianten in Stamm C34 identifiziert werden. Alle Gruppe I Introns waren in einem offenen Leseraster nach dem Pentanukleotid TTGAT integriert. Waren die bislang in der Literatur beschriebenen Gruppe I Introns bei Bakterien ausschliesslich in tRNA-Genen integriert, so scheinen *CdIS1* und seine Varianten im Gegensatz dazu auf eine Integration in offene Leseraster spezialisiert zu sein. Ein Vergleich unter den zwölf Intronvarianten untereinander ermöglichte eine Einteilung in zwei Gruppen. *CdIS1*-Varianten des Typus I zeichneten sich durch den Besitz beider potentiellen Transposasogene *tlpA* und *tlpB* aus, *CdIS1*-Varianten des Typus II besaßen nur das *tlpB*-Gen. Eine funktionelle Analyse aller *CdIS1*-Varianten aus Stamm C34 über RT-PCR-Assays konnte deren Spleißaktivität bestätigen.

Die nachfolgenden Experimente hatten das Ziel, einen möglichen Nutzen des Introns für seinen Wirt zu evaluieren. Alternative Spleißvorgänge könnten zur Generierung neuer Proteinspezies führen, die möglicherweise dem Wirt einen Vorteil bieten. Zur Untersuchung des alternativen Spleißens *in vivo* in *C. difficile*, dem originären Wirt des Introns, wurde ein Konstrukt konzipiert, welches aufgrund von alternativem Spleißen eine Chloramphenicolresistenz des Wirts herbeiführt. Die rekombinante DNA wurde von *B. subtilis* über Konjugation in *C. difficile* übertragen. Dabei kam der für diesen Zweck entwickelte Transfer-Vektor pTransfer1 zum Einsatz. Der Nachweis, dass alternatives Spleißen *in vivo* stattfand, wurde durch das Wachstum von *C. difficile* Klonen auf Chloramphenicol-Selektivplatten belegt. RT-PCR Analysen und der auf *C. difficile* angepasste Rapid CAT Assay zum Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität sicherten dieses Ergebnis ab. Damit war nachgewiesen, dass das Intron an der Evolution clostridialer Proteine beteiligt sein kann.

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene chimäre Gruppe I Intron *CdIS1* und seine Varianten demonstrieren eindrucksvoll, wie invasive genetische Elemente sich einen neuen Lebensraum erschliessen. Aus den bislang vorliegenden Ergebnissen kann gefolgert werden, dass das Zusammenwirken zwischen dem Intron-Anteil mit seiner Spleißaktivität und dem potentiell mobilitätsvermittelnden IS Element-Anteil ursächlich für diesen Erfolg sind. Der experimentelle Nachweis, dass die Mobilität auf die potentielle Transposase TlpB zurückzuführen ist, kann als Perspektive für nachfolgende Arbeiten vorgegeben werden.

6 LITERATUR

1. Knoop, F.C., M. Owens, and I.C. Crocker, *Clostridium difficile: clinical disease and diagnosis*. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(3): p. 251-65.
2. von Eichel-Streiber, C., et al., *Large clostridial cytotoxins--a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins*. Trends Microbiol, 1996. **4**(10): p. 375-82.
3. von Eichel-Streiber, C., et al., *Purification of two high molecular weight toxins of Clostridium difficile which are antigenically related*. Microb Pathog, 1987. **2**(5): p. 307-18.
4. Martinez, R.D. and T.D. Wilkins, *Purification and characterization of Clostridium sordellii hemorrhagic toxin and cross-reactivity with Clostridium difficile toxin A (enterotoxin)*. Infect Immun, 1988. **56**(5): p. 1215-21.
5. Bette, P., et al., *A comparative biochemical, pharmacological and immunological study of Clostridium novyi alpha-toxin, C. difficile toxin B and C. sordellii lethal toxin*. Toxicon, 1991. **29**(7): p. 877-87.
6. Selzer, J., et al., *Clostridium novyi alpha-toxin-catalyzed incorporation of GlcNAc into Rho subfamily proteins*. J Biol Chem, 1996. **271**(41): p. 25173-7.
7. Moos, M. and C. von Eichel-Streiber, *Purification and evaluation of large clostridial cytotoxins that inhibit small GTPases of Rho and Ras subfamilies*. Methods Enzymol, 2000. **325**: p. 114-25.
8. Just, I., et al., *Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B*. Nature, 1995. **375**(6531): p. 500-3.
9. Popoff, M.R., et al., *Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for Clostridium sordellii lethal toxin glucosylation*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10217-24.
10. Chardin, P., et al., *The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells*. Embo J, 1989. **8**(4): p. 1087-92.
11. Paterson, H.F., et al., *Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1001-7.
12. Giry, M., et al., *Transient expression of RhoA, -B, and -C GTPases in HeLa cells potentiates resistance to Clostridium difficile toxins A and B but not to Clostridium sordellii lethal toxin*. Infect Immun, 1995. **63**(10): p. 4063-71.
13. Chaves-Olarte, E., et al., *Toxins A and B from Clostridium difficile differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(7): p. 1734-41.
14. Chaves-Olarte, E., et al., *A novel cytotoxin from Clostridium difficile serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 11046-52.

15. Donta, S.T., N. Sullivan, and T.D. Wilkins, *Differential effects of Clostridium difficile toxins on tissue-cultured cells*. J Clin Microbiol, 1982. **15**(6): p. 1157-8.
16. Hofmann, F., et al., *Sequencing and analysis of the gene encoding the alpha-toxin of Clostridium novyi proves its homology to toxins A and B of Clostridium difficile*. Mol Gen Genet, 1995. **247**(6): p. 670-9.
17. Oksche, A., R. Nakov, and E. Habermann, *Morphological and biochemical study of cytoskeletal changes in cultured cells after extracellular application of Clostridium novyi alpha-toxin*. Infect Immun, 1992. **60**(7): p. 3002-6.
18. Popoff, M.R., *Purification and characterization of Clostridium sordellii lethal toxin and cross-reactivity with Clostridium difficile cytotoxin*. Infect Immun, 1987. **55**(1): p. 35-43.
19. Torres, J.F., *Purification and characterisation of toxin B from a strain of Clostridium difficile that does not produce toxin A*. J Med Microbiol, 1991. **35**(1): p. 40-4.
20. von Eichel-Streiber, C., et al., *Closing in on the toxic domain through analysis of a variant Clostridium difficile cytotoxin B*. Mol Microbiol, 1995. **17**(2): p. 313-21.
21. von Eichel-Streiber, C., et al., *Morphological changes in adherent cells induced by Clostridium difficile toxins*. Biochem Soc Trans, 1991. **19**(4): p. 1154-60.
22. Badley, R.A., et al., *Cytoskeleton changes in fibroblast adhesion and detachment*. J Cell Sci, 1980. **43**: p. 379-90.
23. Hofmann, F., et al., *The ras-related protein Ral is monoglucosylated by Clostridium sordellii lethal toxin*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **227**(1): p. 77-81.
24. Moos, M., *Molekulare Schutzmechanismen der eukaryonten Zelle gegenüber dem Clostridium difficile Zytotoxin B*. Dissertationsarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz, 1998.
25. Starlinger, P. and H. Saedler, *Insertion mutations in microorganisms*. Biochimie, 1972. **54**(2): p. 177-85.
26. Barth, P.T., et al., *Transposition of a deoxyribonucleic acid sequence encoding trimethoprim and streptomycin resistances from R483 to other replicons*. J Bacteriol, 1976. **125**(3): p. 800-10.
27. Mullany, P., et al., *Genetic analysis of a tetracycline resistance element from Clostridium difficile and its conjugal transfer to and from Bacillus subtilis*. J Gen Microbiol, 1990. **136**(Pt 7): p. 1343-9.
28. Mullany, P., M. Wilks, and S. Tabaqchali, *Transfer of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS) resistance in Clostridium difficile is linked to a gene homologous with toxin A and is mediated by a conjugative transposon, Tn5398*. J Antimicrob Chemother, 1995. **35**(2): p. 305-15.
29. Mullany, P., et al., *A group II intron in a conjugative transposon from the gram-positive bacterium, Clostridium difficile*. Gene, 1996. **174**(1): p. 145-50.

30. Lyras, D., *et al.*, *Chloramphenicol resistance in Clostridium difficile is encoded on Tn4453 transposons that are closely related to Tn4451 from Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(7): p. 1563-7.
31. Lambowitz, A.M. and M. Belfort, *Introns as mobile genetic elements*. *Annu Rev Biochem*, 1993. **62**: p. 587-622.
32. Saldanha, R., *et al.*, *Group I and group II introns*. *Faseb J*, 1993. **7**(1): p. 15-24.
33. Cech, T.R., *Self-splicing of group I introns*. *Annu Rev Biochem*, 1990. **59**: p. 543-68.
34. James, H.A. and P.C. Turner, *Ribozymes*. *Methods Mol Biol*, 1997. **74**: p. 1-9.
35. Lambowitz, A.M., *Infectious introns*. *Cell*, 1989. **56**(3): p. 323-6.
36. Belfort, M. and P.S. Perlman, *Mechanisms of intron mobility*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(51): p. 30237-40.
37. Belfort, M. and R.J. Roberts, *Homing endonucleases: keeping the house in order*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(17): p. 3379-88.
38. Roberts, A.P., *et al.*, *Demonstration that the group II intron from the Clostridial Conjugative transposon Tn5397 undergoes splicing In vivo*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(4): p. 1296-9.
39. Damberger, S.H. and R.R. Gutell, *A comparative database of group I intron structures*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(17): p. 3508-10.
40. Kuhsel, M.G., R. Strickland, and J.D. Palmer, *An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts*. *Science*, 1990. **250**(4987): p. 1570-3.
41. Reinhold-Hurek, B. and D.A. Shub, *Self-splicing introns in tRNA genes of widely divergent bacteria*. *Nature*, 1992. **357**(6374): p. 173-6.
42. Xu, M.Q., *et al.*, *Bacterial origin of a chloroplast intron: conserved self-splicing group I introns in cyanobacteria*. *Science*, 1990. **250**(4987): p. 1566-70.
43. Biniszkievicz, D., E. Cesnaviciene, and D.A. Shub, *Self-splicing group I intron in cyanobacterial initiator methionine tRNA: evidence for lateral transfer of introns in bacteria*. *Embo J*, 1994. **13**(19): p. 4629-35.
44. Paquin, B., *et al.*, *Origin and evolution of group I introns in cyanobacterial tRNA genes*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(21): p. 6798-806.
45. Bechhofer, D.H., K.K. Hue, and D.A. Shub, *An intron in the thymidylate synthase gene of Bacillus bacteriophage beta 22: evidence for independent evolution of a gene, its group I intron, and the intron open reading frame*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(24): p. 11669-73.
46. Goodrich-Blair, H. and D.A. Shub, *The DNA polymerase genes of several HMU-bacteriophages have similar group I introns with highly divergent open reading frames*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(18): p. 3715-21.
47. Young, P., *et al.*, *Intron-containing T4 bacteriophage gene sunY encodes an anaerobic ribonucleotide reductase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(32): p. 20229-32.
48. Mikkonen, M. and T. Alatossava, *A group I intron in the terminase gene of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis phage LL-H*. *Microbiology*, 1995. **141**(Pt 9): p. 2183-90.

49. van Sinderen, D., *et al.*, *Sequence analysis and molecular characterization of the temperate lactococcal bacteriophage r1t*. Mol Microbiol, 1996. **19**(6): p. 1343-55.
50. Landthaler, M. and D.A. Shub, *Unexpected abundance of self-splicing introns in the genome of bacteriophage Twort: introns in multiple genes, a single gene with three introns, and exon skipping by group I ribozymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 7005-10.
51. Lazarevic, V., *et al.*, *Introns and intein coding sequence in the ribonucleotide reductase genes of Bacillus subtilis temperate bacteriophage SPbeta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1692-7.
52. Kruger, K., *et al.*, *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena*. Cell, 1982. **31**(1): p. 147-57.
53. Jaeger, L., F. Michel, and W. E., *The structure of group I ribozymes*, in *Catalytic RNA*, F. Eckstein and M.J. Lilley, Editors. 1997, Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg. p. 33-51.
54. Michel, F. and E. Westhof, *Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis*. J Mol Biol, 1990. **216**(3): p. 585-610.
55. Kersanach, R., *et al.*, *Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin*. Nature, 1994. **367**(6461): p. 387-9.
56. Gilbert, W., S.J. de Souza, and M. Long, *Origin of genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 7698-703.
57. Shub, D.A., *The antiquity of group I introns*. Curr Opin Genet Dev, 1991. **1**(4): p. 478-84.
58. Rzhetsky, A., *et al.*, *Exon/intron structure of aldehyde dehydrogenase genes supports the "introns-late" theory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6820-5.
59. Palmer, J.D. and J.M. Logsdon, Jr., *The recent origins of introns*. Curr Opin Genet Dev, 1991. **1**(4): p. 470-7.
60. Stoltzfus, A., *et al.*, *Intron "sliding" and the diversity of intron positions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10739-44.
61. Gilbert, W., *Why genes in pieces?* Nature, 1978. **271**(5645): p. 501.
62. Hall, D.H., Y. Liu, and D.A. Shub, *Exon shuffling by recombination between self-splicing introns of bacteriophage T4*. Nature, 1989. **340**(6234): p. 575-6.
63. Doolittle, W.F., *Genes in pieces: were they ever together?* Nature, 1978. **272**(5645): p. 581-582.
64. de Souza, S.J., *et al.*, *Toward a resolution of the introns early/late debate: only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5094-9.
65. Wagenknecht-Wiesner, A., *et al.*, *Delineation of the catalytic domain of Clostridium difficile toxin B-10463 to an enzymatically active N-terminal 467 amino acid fragment*. FEMS Microbiol Lett, 1997. **152**(1): p. 109-16.
66. George, W.L., *et al.*, *Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile*. J Clin Microbiol, 1979. **9**(2): p. 214-9.

67. Sullivan, N.M., S. Pellett, and T.D. Wilkins, *Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile*. Infect Immun, 1982. **35**(3): p. 1032-40.
68. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 6127-45.
69. Ymer, S., *Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(24): p. 6960.
70. Mullany, P., et al., *Gene cloning in Clostridium difficile using Tn916 as a shuttle conjugative transposon*. Plasmid, 1994. **31**(3): p. 320-3.
71. Clewell, D.B., S.E. Flannagan, and D.D. Jaworski, *Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons*. Trends Microbiol, 1995. **3**(6): p. 229-36.
72. Rice, L.B., *Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(8): p. 1871-7.
73. Mullany, P., M. Wilks, and S. Tabaqchali, *Transfer of Tn916 and Tn916 delta E into Clostridium difficile: demonstration of a hot-spot for these elements in the C. difficile genome*. FEMS Microbiol Lett, 1991. **63**(2-3): p. 191-4.
74. Wang, H., A.P. Roberts, and P. Mullany, *DNA sequence of the insertional hot spot of Tn916 in the Clostridium difficile genome and discovery of a Tn916-like element in an environmental isolate integrated in the same hot spot*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **192**(1): p. 15-20.
75. Kedzierski, W. and J.C. Porter, *A novel non-enzymatic procedure for removing DNA template from RNA transcription mixtures*. Biotechniques, 1991. **10**(2): p. 210-4.
76. Conley, E.C. and J.R. Saunders, *Recombination-dependent recircularization of linearized pBR322 plasmid DNA following transformation of Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1984. **194**(1-2): p. 211-8.
77. Hundesberger, T., et al., *Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of Clostridium difficile*. Eur J Biochem, 1997. **244**(3): p. 735-42.
78. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
79. Soehn, F., et al., *Genetic rearrangements in the pathogenicity locus of Clostridium difficile strain 8864--implications for transcription, expression and enzymatic activity of toxins A and B*. Mol Gen Genet, 1998. **258**(3): p. 222-32.
80. Azemun, P., et al., *Rapid detection of chloramphenicol resistance in Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother, 1981. **20**(2): p. 168-70.
81. Dietz, A.A. and H.M. Rubinstein, *Laboratory note--standardization of the Ellman reaction*. Clin Biochem, 1972. **5**(2): p. 136-8.
82. Braun, V., et al., *Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in Clostridium difficile*. Gene, 1996. **181**(1-2): p. 29-38.
83. Rupnik, M., et al., *A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of Clostridium difficile isolates*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(8): p. 2240-7.

84. Rupnik, M., *et al.*, *Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of Clostridium difficile strains and description of novel toxinotypes*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 2): p. 439-47.
85. Mehlig, M., *et al.*, *Variant toxin B and a functional toxin A produced by Clostridium difficile C34*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **198**(2): p. 171-6.
86. Braun, V., *et al.*, *A chimeric ribozyme in clostridium difficile combines features of group I introns and insertion elements*. Mol Microbiol, 2000. **36**(6): p. 1447-59.
87. Stevens, D.L., K.A. Maier, and J.E. Mitten, *Effect of antibiotics on toxin production and viability of Clostridium perfringens*. Antimicrob Agents Chemother, 1987. **31**(2): p. 213-8.
88. Wren, B.W., *et al.*, *Molecular cloning and genetic analysis of a chloramphenicol acetyltransferase determinant from Clostridium difficile*. Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(8): p. 1213-7.
89. Le Grice, S.F., *et al.*, *Pseudosecretion of Escherichia coli chloramphenicol acetyltransferase by Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1987. **169**(7): p. 3362-4.
90. Murphy, F.L. and T.R. Cech, *GAAA tetraloop and conserved bulge stabilize tertiary structure of a group I intron domain*. J Mol Biol, 1994. **236**(1): p. 49-63.
91. Been, M.D. and T.R. Cech, *Sites of circularization of the Tetrahymena rRNA IVS are determined by sequence and influenced by position and secondary structure*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(23): p. 8389-408.
92. Mahillon, J. and M. Chandler, *Insertion sequences*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 725-74.
93. Kersulyte, D., *et al.*, *Novel sequence organization and insertion specificity of IS605 and IS606: chimaeric transposable elements of Helicobacter pylori*. Gene, 1998. **223**(1-2): p. 175-86.
94. Polard, P. and M. Chandler, *Bacterial transposases and retroviral integrases*. Mol Microbiol, 1995. **15**(1): p. 13-23.
95. Grivell, L.A., *Intron mobility. Invasive introns*. Curr Biol, 1994. **4**(2): p. 161-4.
96. Edgell, D.R., N.M. Fast, and W.F. Doolittle, *Selfish DNA: the best defense is a good offense*. Curr Biol, 1996. **6**(4): p. 385-8.
97. Stommel, M., *Untersuchung zur Funktion und Verbreitung von selbstspießenden Introns der Gruppe I in Bacteria*. Dissertationsarbeit am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, 1998.

Anhang A: Primer

Primer	Sequenz (5' – 3')
Lok1	AAAATATACTGCACATCTGTATAC
Lok3	TTTACCAGAAAAAGTAGCTTTAA
PrimexB	ACATATTCATCTTCTTGAGTACGA
ACD1C	GGAGGTTTTTATGAGCTCAATATCTAAAGA
ACD2N	CCCTCTGTTATTGTAGGTACCACATTTA
ICheck1	CTGTGGTATGATAGTGAAGC
ICheck2	CGGAGCTTACCTGCTGATTG
ICheck3	CGGGGTGGCCTGTGGAGAA
ICheck4	ATCTATTGTAGGTACTGTAGG
ICheck5	CGAAATAACTAGGATTCCAAAGA
ICheck6	GTAACTTCCATTTTTCATCACCTA
ICheck8	ATTTGTCAGGTTCCCTTAAGCCA
ISCD1Up	AAATAGCTACGCACACTT
TransCheck1	CCTAAACTTGGTATGGTTAAG
TransCheck2	CCCACATTTATTGCATATTTG
C34-ADH2	AATGTTTGTAGTACTACTCCAA
C34-ADH3	GCTAATACTTTTGCAGTATCTATAC
C34-Inv2-2	GCAGTTAGTGGCCCCATCCCC
C34-Inv2-3	CCATTAAGTCTCCAAATGTGCCAT
Virulence1	GTTTTAAATATAATAGTTGG
Virulence2	TATGTATGGTCCAAATATGG
XylReg1	ATGAAGAGAAATAATTTTTC
XylReg2	AGCAATTTTAAAATCAGGG
AspaRace1	ATTCCAAATGAAGAAGACCG
AspaRace2	TAAATTGAACTTAGTGCGGC
TransReg1	ATTATCAAAAAGAGATAAAG
TransReg2	TTCTATTTTAAACATTATCCC
IntegMem1	ATCACTAAAAAATATAATGC
IntegMem2	ATTGAACTAACTAACATACC
Nacrein1	CCAATAGAAGGAATGGATGC
Nacrein2	TGAAAAAAGTTATACTACCC
PseudoSyn1	CTTTCAAATTTAGGTTATGG
PseudoSyn2	AACCTTCCAACAGGAAATGG

Primer	Sequenz (5' – 3')
PFLA1	TGAAAGATAAATGTGTATCCTGTA
PFLA2	ATTTGATTCTCCACATAAATCACA
HyPro1	GCAACATGTTTATATACAGG
HyPro2	AACTTTAACTTCATTGCTTC
TetMPrim1	ATGGAGGAGAATTCCATGAAAATT
TetMPrim2	AAATACAGCTAGCTATTTTATTGA
pQEPolTerm1	GATCTCACGTATAACCATCACCATG
pQEPolTerm2	GAATAATAGTATACTAAATGATAG
tcdDBProm1.1	CCGATTACCATGGTATAATTACTG
tcdDBProm2	CTAACTGTCCCGGGTAACTAAAC
EGFPPrim1	GGTCTGCAGTGGTGAGCAAGGGCGAGGA
EGFPPrim2	CGAAGCTTGAGCATGCGATCTGAGTCC
catPBstX Downstream	CAAACCAGAATATTGGTATTTATCAATTCC
catPBstX Upstream	GGAACTTACCAGTATTTTGGAAAAATTGAT
catRT-PCR1	GTGAAATATTGTATAGCTTGG
catRT-PCR2	CTGTTCCAACATTTTTATCAA
TransfoCheck1	TTTGGGCTTTTGAATGGAGG
TransfoCheck2	AATTGATCCCATGGTGATGG
TransfoCheck3	CCATAACTTCTTTTACGTTTCC
TransfoCheck4	CCTCCTTTACACTTTAATTC
C34A1-Sonde1	ATGAGCTCAATATCTAAAAAAGAGTTAA
C34A1-Sonde2	ATCAAATTGAGGATTTTGAATCTCTTCC

Anhang B: PCR-Bedingungen

Primerpaar ^a	PCR ^b	Temp. ^c	Anwendung
Lok3/PrimexB	I	47°C	PL2-Fragment
ACD1C/ACD2N	I	56°C	A1-Fragment
ICheck1/ICheck2	II	52°C	5'-Grenze <i>tcdA</i> -Intron
ICheck3/ICheck4	II	52°C	3'-Grenze <i>tcdA</i> -Intron
ICheck1/ICheck4	II	52°C	<i>CdIS1</i>
ICheck2/ICheck3	II	52°C	Zyklisierungsnachweis von <i>CdIS1</i> bei der RT-PCR und inverse PCR
TransCheck1/TransCheck2	II	52°C	Nachweis einer <i>CdIS1</i> -spezifischen Sequenz
ISCD1Up/ICheck6	I	51°C	Sonde für Hybridisierung
C34-ADH2/C34-ADH3	II	52°C	<i>CdIS1a</i>
C34-Inv2-2/C34-Inv2-3	II	52°C	<i>CdIS1b</i>
Virulence1/Virulence2	II	52°C	<i>CdIS1c</i>
XylReg1/XylReg2	II	52°C	<i>CdIS1d</i>
AspaRace1/AspaRace2	II	52°C	<i>CdIS1e</i>
TransReg1/TransReg2	II	52°C	<i>CdIS1f</i>
IntegMem1/IntegMem2	II	52°C	<i>CdIS1g</i>
Nacrein1/Nacrein2	II	52°C	<i>CdIS1h</i>
PseudoSyn1/PseudoSyn2	II	52°C	<i>CdIS1i</i>
PFLA1/PFLA2	II	52°C	<i>CdIS1j</i>
HyPro1/HyPro2	I	49°C	<i>CdIS1k</i>
TetMPrim1/TetMPrim2	I	48°C	<i>tetM</i> -Gen
pQEPolTerm1/pQEPolTerm2	II	50°C	Polylinker und Terminator aus Vektor pQE11a18
tcdDBProm1.1/tcdDBProm2	II	50°C	Promotor- und Regulatorelement
EGFPPrim1/EGFPPrim2	II	68°C	<i>EGFP</i> -Gen
catPBstX Upstream/catPBstX Downstream	II	52°C	<i>catP</i> -Gen
tcdDBProm1.1/catRT-PCR2	I	48°C	Verifizierung Konstrukte
TransfoCheck1/TransfoCheck2	II	50°C	5'-Grenze Konstrukte-Tn916
TransfoCheck3/TransfoCheck4	II	50°C	3'-Grenze Konstrukte-Tn916

Primerpaar ^a	PCR ^b	Temp. ^c	Anwendung
Lok3/Lok1	II	52°C	PaLoc-Integrationsstelle
C34A1-Sonde1/C34A1-Sonde2	II	52°C	<i>tcdA</i> -Fragment 5' von <i>Cd/StI</i>
ICheck1/catRT-PCR2	II	52°C	RT-PCR zur Transkriptionsanalyse
ICheck1/ICheck5	II	52°C	RT-PCR zur Transkriptionsanalyse

^a Die Primersequenzen sind in Anhang A aufgeführt.

^b Die PCR wurde entweder mit einem 2-Schrittprogramm (I: Annealing und Extension x°C, 8min, 30 Zyklen; Denaturierung 95°C, 4sek, 30 Zyklen) oder einem 3-Schrittprogramm (II: Annealing x°C, 1min, Extension 72°C 1min, Denaturierung 95°C, 1min, 30 Zyklen) durchgeführt.

^c Die Temperaturangabe bezieht sich auf Annealing und Extension bei 2-Schrittprogrammen (I) bzw. auf Annealing bei 3-Schrittprogrammen (II).

Anhang C: Nukleotidsequenzen

Bezeichnung	Acc. No. ^a
<i>CdIS1</i>	AJ131844
<i>CdIS1a</i>	AJ269486
<i>CdIS1b</i>	AJ269487
<i>CdIS1c</i>	AJ269488
<i>CdIS1d</i>	AJ269489
<i>CdIS1e</i>	AJ269490
<i>CdIS1f</i>	AJ269491
<i>CdIS1g</i>	AJ269492
<i>CdIS1h</i>	AJ269493
<i>CdIS1i</i>	AJ269494
<i>CdIS1j</i>	AJ269495
<i>CdIS1k</i>	AJ430194

^a Accession Number der Sequenz in der Datenbank

Nukleotidsequenz des Vektors pTransfer1:

5'–GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCC
 CGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACA
 CTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCA
 TGATTACGAATTCATGAAAATTATTAATATTGGAGTTTTAGCTCATGTTGATGCAGGAAAACTACCTTAACAG
 AAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAAGGTACAACGAGGACGGATAATA
 CGCTTTTAGAAGCTCAGAGAGGAATTACAATTAGACAGGAATAACCTCTTTTTCAGTGGGAAAAATACGAAGGTGA
 ACATCATAGACACGCCAGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTTCATTATCAGTTTTAGATGGGGCAA
 TTCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAACTCGTATATTATTTTCATGCACTTAGGAAAAATGGGGA
 TTCCACAATCTTTTTTATCAATAAGATTGACCAAAATGGAATTGATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAG
 AGAACTTTCTGCCGAAATTGTAATCAAACAGAAGGTAGAAGTGTATCCTAATGTGTGTGTGACGAACTTTACCG
 AATCTGAACAATGGGATACGGTAATAGAGGGAAACGATGACCTTTTAGAGAAATATATGTCCGGTAAATCATTAG
 AAGCATTGGAAGTGAACAAGAGGAAAGCATAAGATTTTCAAGATTTCTCTGTTCCTCTTTATCATGGAAGTG
 CAAAAGTAATATAGGGATTGATAACCTTATAGAAGTTATTAATAAAATTTTATTCATCAACACATCGAGGTC
 CGTCTGAACTTTGCGGAAATGTTTTCAAAATTGAATATACAAAAAAGACAACGTCTTGCATATATACGCCCTTT
 ATAGTGGAGTACTACATTTACGAGATTCCGGTTAGAGTATCAGAAAAAGAAAAATAAAAGTTACAGAAATGTATA
 CCATCACCATGGGATCAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCGA
 CTGGTGGACTTTTCGAGATTGATGGTGTATATATTTCTTTGGTGTGATGGAGTAAAAGCCCTGGGATATATG
 GCTAAAATATATGTTTGATAAAAAATTATTCCTGTGCTACTAAGAAATTTATTTTATATAATAAATATTGAGATT
 TAATTAACAGTCATGTGTTATTGTAATACATGACTTTTAGTTAAAATTTTCTATCATTAGTATACCTAATAAT
 TTATCAATTTCCCTTTAGTAACGTGTAACCTTTCAAATTTACAAAAGCGACTCATAGAATTTTCTCCCTCCCGTT
 AAATAATAGATAACTATTAATAAATAGACAATACTTGCTCATAAGTAACGGTACTTAAATGTTTACTTTGGCGTG
 TTTTATTGCTTGATGAAACTGATTTTTAGTAAACAGTTGACGATATTCTCGATTGACCCATTTTGAACAAAGTA
 CGTATATAGCTTCCAATATTTATCTGGAACATCTGTGGTATGGCGGGTAAAGTTTTATTAAGACACTGTTTACTTT

TGGTTTAGGATGAAAGCATTCCGCTGGCAGCTTAAGCAATTGCTGAATCGAGACTTGAGTGTGCAAGAGCAACCC
TAGTGTTCCGGTGAATATCCAAGGTACGCTTGTTAGAAATCCTTCTTCAACAATCAGATAGATGTCAGACGCATGGCT
TTCAAAAACCACTTTTTTAATAATTTGTGTGCTTAAATGGTAAGGAATACTCCCAACAATTTTATACCTCTGTTT
GTTAGGGAATTGAACTGTAGAATATCTTGGTGAATTAAGTGACACGAGTATTCAGTTTTAATTTTTCTGACGA
TAAGTTGAATAGATGACTGTCTAATTC AATAGACGTTACCTGTTTACTTATTTTTAGCCAGTTTCGTCGTTAAATG
CCCTTACCTGTTCCAATTCGTAAACGGTATCGGTTTCTTTTAAATTC AATTTGTTTTATTTTGGTTGAGTAC
TTTTTCACTCGTTAAAAAGTTTTGAGAATATTTTATATTTTTGTTTCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACAAAT
TTTAGCATCTAATTTAACTTCAATTCCTATTATACAAAATTTTAAAGATACTGCACTATCAACACACTCTTAAGTT
TGCTTCTAAGTCTTATTTCCATAACTTCTTTTACGTTTCCGGTACCGAGCTCGAATTCCTCGGTTTCTCTTGGAT
ACTTAAATCAATCATTTCAAATGCAGTTATGGAAGGGATACGCTATGGTTGTGAACAAGGATGTATGGTTGGA
ATGTGACGGACTGTAAAATCTGTTTTAAGTATGGCTTATACTATAGCCCTGTTAGTACCCAGCAGATTTTCGGA
TGCTTGCTCCTATTGTATTGGAACAAGTCTTAAAAAAGCTGGAACAGAATTGTTAGAGCCATATCTTAGTTTTA
AAATTTATGCGCCACAGGAATATCTTTCACGAGCATAACAACGATGCTCCTAAATATTGTGCGAACATCGTAGACA
CTCAATTGAAAAATAATGAGGTCATTCTTAGTGGAGAAATCCCTGCTCGGTGATTTCAAGAAATATCGTAGTGATT
TAACTTTCTTTACAAATGGACGTAGTGTGTTTAAACAGAGTTAAAAGGGTACCATGTTACTACCGGTGAACCTG
TTTGCCAGCCCCGTCGTCCAAATAGTCGGATAGATAAAGTACGATATATGTTCAATAAAAATAGCTAGCTTGGCAC
TGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCTTGCAGCACATCCCC
CTTTGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCG
AATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTA
CAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTT
GTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGT
CATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGG
TTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATT
CAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTATGAGTA
TTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTGCTTCCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACCG
TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATGGATCTCAACAGCGCGTA
AGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGG
TATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACTACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGT
ACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA
GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACA
TGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACA
CCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGC
AACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGT
TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA
TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAAC
TTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGT
TTTTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTTCTGCGGTAA
TCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT
TTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACC
ACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
ATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGG
GTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCAGCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA
GCCCACGCTTCCGAAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGA
GGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGAT
TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTTACGGTTCTTGGCCT
TTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTG
AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGAGGAAGCGGAAGA-3'

Anhang D: Lebenslauf

Zur Person

Name:	Markus Mehlig
Geburtsdatum:	15.07.1968
Geburtsort:	Bingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Königsschloß 1 55424 Münster-Sarmsheim

Schulbildung

Grundschule:	1975 - 1979
Gymnasium:	1979 - 1988

Wehrdienst

Materialamt der Luftwaffe in Köln-Bonn:	01.07.1988 - 30.09.1989
---	-------------------------

Studium

Biologie Diplom:	01.10.1989 - 20.12.1996
------------------	-------------------------

Promotion

Dissertationsarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. von Eichel-Streiber	01.03.1997 – 04.12.2002
--	-------------------------

VERSICHERUNG

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit aufgeführt sind. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form weder als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung noch bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Markus Mehlig

Mainz, 2002

ABSTRACT

Im *tcdA*-Gen des *Clostridium difficile* Stammes C34 wurde eine Insertion mit einer Größe von 1975 bp lokalisiert. Der als *CdIS1* bezeichneten Insertion konnten charakteristische Merkmale von Gruppe I Introns und von Insertionselementen zugewiesen werden. Dem im 5' Bereich gelegenen Anteil ließen sich die Intron-spezifischen Eigenschaften zuordnen, im 3' Anteil wurden zwei offene Leseraster gefunden, die hohe Homologien zu Transposasen der IS605 Familie hatten. Funktionelle Analysen belegten die Spleißaktivität des chimären Ribozymes. *CdIS1* konnte in mehreren Kopien in allen untersuchten *C. difficile* Stämmen nachgewiesen werden. In anderen clostridialen Spezies konnte das Gruppe I Intron bislang nicht vorgefunden werden. Der Integrationsort in *C. difficile* war in allen untersuchten Fällen immer ein offenes Leseraster. Bislang waren Gruppe I Introns noch nie in bakteriellen offenen Leserastern beschrieben worden. Es kann angenommen werden, dass der chimäre Aufbau des Ribozymes die Integration in bakterielle offene Leseraster ermöglicht. Dabei wäre für die Spleißaktivität der Gruppe I Intron Anteil maßgeblich, die Mobilität würde über den IS Element Anteil vermittelt. Im Rahmen der Dissertationsarbeit konnten erste experimentelle Hinweise erbracht werden, dass das chimäre Ribozym an der evolution clostridialer Proteine beteiligt sein kann, wovon seinen Wirt *C. difficile* entsprechend profitieren würde.

An insertion of 1975 bp is situated in the *tcdA*-gene of *Clostridium difficile* strain C34. The insertion was designated as *CdIS1* and it had characteristics of group I introns and insertion elements. The group I characteristics could be found in the 5' area of the genetic element, in the 3' area two open reading frames were located with high homologies to transposases of the IS605 family. Functional studies could proof the splicing activity of the ribozyme. *CdIS1* could be found in several copies in all *C. difficile* strains examined so far. It was absent in other examined clostridial species. In all cases, the integration site in *C. difficile* was an open reading frame. Up to now, group I introns never were discovered in bacterial open reading frames. It can be assumed that the chimeric characteristics of the ribozyme permit an integration in bacterial open reading frames. The group I intron part would be responsible of the splicing activity, the IS element part could mediate the mobility of the genetic element. First experimental evidences point to a possible involvement of the chimeric ribozyme in the evolution of clostridial proteins, so the host *C. difficile* could benefit from its presence.