

1 Einleitung

Seit Beginn der *in vitro*-Rekombination von genetischem Material (Cohen et al., 1973) und der nachfolgenden Weiterentwicklung der Gentechnik wurden zunehmend Anwendungen von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVMs) in der Forschung, in der industriellen Produktion, in der Landwirtschaft und im Umweltschutz erarbeitet (Wilson und Lindow, 1993). In Verbindung damit ist zunächst unter Wissenschaftlern (Berg et al., 1975) und später in der breiten Öffentlichkeit eine kontroverse Diskussion über potentielle Risiken dieser Anwendungen für Mensch und Umwelt entstanden. Potentielle Risiken werden in der unkontrollierten Vermehrung der GVMs und in der Verbreitung ihres gentechnisch veränderten Erbmaterials durch Weitergabe an andere Organismen (horizontaler Gentransfer) gesehen. Insbesondere in den letzten Jahren wurde gezeigt, daß horizontaler Gentransfer unter natürlichen Bedingungen möglich ist (Übersicht bei Lorenz und Wackernagel, 1993; Yin und Stotzky, 1997). Zur Minimierung der potentiellen Risiken bei der Anwendung von GVMs wurden Sicherheitssysteme (engl. „containment systems“) entwickelt, die ein Überleben der GVMs und die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers weitestgehend verringern sollen (Übersicht bei Molin et al., 1993). Die bevorzugte Form des biologischen „Containments“ von GVMs ist die steuerbare Expression von Genen, deren Produkte den Zelltod bewirken.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Charakterisierung der Endonuklease I von *Escherichia coli*, deren biologische Funktion bis heute ungeklärt ist (Lehman et al., 1962a, Dürwald und Hoffmann-Berling, 1968). Die Anwendung des Enzyms in einem Selbstmordsystem für Bakterien, das die Verbreitung von GVMs und ihrer rekombinanten DNA minimieren kann, sowie die Weiterentwicklung und die Optimierung dieses Suizidsystems sind weitere Inhalte dieser Arbeit.

1.1 Horizontaler Gentransfer bei Bakterien in der Umwelt

Der horizontale Gentransfer umfaßt Prozesse, die zu einer Übertragung genetischen Materials zwischen Zellen führen. Bei Bakterien kann der horizontale Gentransfer durch Konjugation, Transduktion oder Transformation erfolgen. Im folgenden werden die Mechanismen dieser Prozesse und ihre Bedeutung für Bakterien kurz erläutert.

Konjugation. Bei der Konjugation wird genetisches Material über direkte Zell-Zell-Kontakte ausgetauscht (Übersicht bei Firth et al., 1996; Yin und Stotzky, 1997). Die daran beteiligten Funktionen werden von Genen kodiert, die auf selbsttransmissiblen Plasmiden und auf dem Chromosom der Bakterienzelle lokalisiert sind. Die *tra*-Region der Plasmide enthält Gene, deren Produkte zur Ausbildung der Zellkontakte notwendig sind. Die Genprodukte der *mob*-Region leiten den Transferprozeß ein, der am *oriT* des

Plasmids beginnt. Ist ein Zellkontakt zwischen einer Spenderzelle (mit selbsttransmissiblen Plasmid) und einer Empfängerzelle entstanden, wird in einem Replikationsvorgang am *oriT* beginnend eine einzelsträngige DNA-Kopie erzeugt. Die hierfür notwendigen Funktionen werden z. T. von der Wirtszelle bereitgestellt. Unterstützt durch wirtskodierte Proteine gelangt der gebildete Einzelstrang mit dem 5'-Ende voran über den Zellkontakt in die Empfängerzelle. Dort wird der komplementäre Strang synthetisiert. Nach dem Transfer kann es zur Rezirkularisierung des Plasmides kommen. Konjugative Plasmide können nicht nur ihren eigenen Transfer bewirken, sondern sind in der Lage, andere nicht-konjugative Plasmide zu mobilisieren. Fehlt dem nicht-konjugativen Plasmid lediglich die *tra*-Region, kann ein selbsttransmissibles Plasmid derselben Zelle für den Zellkontakt sorgen, und die Übertragung des nicht-konjugativen Plasmides wird möglich. Enthält das nicht-konjugative Plasmid keine der zum Transfer benötigten Genregionen, können dennoch Teile des Plasmids oder das gesamte Plasmid übertragen werden, wenn zuvor genetisches Material rekombinativ in das selbsttransmissible Plasmid integriert wurde. Weiterhin ist ein reziproker Gentransfer zwischen einer Spender- und einer Empfängerzelle möglich. Bei einem bestehenden Zellkontakt kann das selbsttransmissible Plasmid in die Empfängerzelle gelangen und die Mobilisierung von chromosomaler DNA (integrierte *mob*-Region) oder Plasmiden (*tra*⁻ *mob*⁺) bewirken, sodaß eine Übertragung genetischen Materials von der Rezipientenzelle zur ursprünglichen Donorzelle erfolgt (Ankenbauer, 1997). In seltenen Fällen ist der konjugative Transfer chromosomaler DNA möglich. Nachdem das selbsttransmissible Plasmid durch Rekombinationsvorgänge ins Chromosom der Spenderzelle integriert wurde, können größere Teile des Chromosoms vom Insertionsort beginnend transferiert werden. Durch homologe Rekombination mit dem Chromosom der Empfängerzelle kann die übertragene DNA schließlich etabliert werden. Es ist ebenfalls möglich, daß ein ins Chromosom integriertes Plasmid wieder in ein extrachromosomales Replikon überführt wird. Dabei können flankierende Bereiche des Chromosoms ins Plasmid gelangen, deren nachfolgende Übertragung in eine andere Zelle möglich ist. Ein konjugativer Gentransfer ist nicht zwangsläufig mit einem selbsttransmissiblen Plasmid verknüpft, sondern bestimmte Transposons (z. B. *Tn916*) können ebenfalls eine Konjugation bewirken (Salyers et al., 1995). Konjugation, die bei Gram⁻- und Gram⁺-Bakterien weit verbreitet ist, kann aufgrund der erforderlichen Zell-Zell-Erkennung zwar nur zwischen bestimmten Organismen stattfinden, ist aber nicht auf Organismen derselben Gruppe beschränkt. Außer dem konjugativen Gentransfer zwischen Vertretern gleicher Organismengruppen wurde die Konjugation zwischen Gram⁻- und Gram⁺-Bakterien und zwischen Bakterien und Eukaryoten nachgewiesen (Heinemann und Sprage, 1989; Heinemann, 1991, Lorenz und Wackernagel, 1993; Salyers und Shoemaker, 1994).

Transduktion. Die Übertragung von genetischem Material durch Bakteriophagen wird

als Transduktion bezeichnet (Übersichten bei Masters, 1996; Weisberg, 1996). Bei der Produktion von infektiösen Phagen wird in seltenen Fällen anstatt der Phagen-DNA bakterielle DNA in die Phagenpartikel verpackt (transduzierende Phagen). Nach der Freisetzung der Phagen durch die Lyse der Spenderzelle können die transduzierenden Phagen erneut Bakterienzellen infizieren. Die chromosomale DNA oder die Plasmid-DNA der ursprünglichen Spenderzelle gelangt auf diese Weise in die Empfängerzelle und kann entweder durch homologe Rekombination ins Genom integriert oder im Cytoplasma nukleolytisch abgebaut werden. Transduktion wurde bei mehr als 50 Bakterienspezies nachgewiesen (Kokjohn, 1989), die sowohl in aquatischen als auch in terrestrischen Habitaten vorkommen. Viele Bakteriophagen sind extrem wirtsspezifisch, sodaß sie nur eine Bakterienspezies infizieren können. Es sind jedoch auch Phagen mit weitem Wirtsbereich bekannt. So können z. B. 16 verschiedene Gram⁻-Bakterien von dem Phagen P1 transduziert werden (Scott und Fröhlich, 1986).

Transformation. Die genetische Transformation ist die Aufnahme von freier extrazellulärer DNA und die vererbare Etablierung ihrer genetischen Information. Hinsichtlich des Mechanismus und der biologischen Bedeutung wird natürliche genetische Transformation (nachfolgend „natürliche Transformation“ genannt) von künstlicher Transformation unterschieden. Die künstliche Transformation umfaßt Verfahren, mit denen DNA *in vitro* in eine Zelle gebracht werden kann. Hierzu werden Zellen chemisch, physikalisch oder enzymatisch aufnahmefähig gemacht, oder die DNA gelangt durch Anwendung starker elektrischer Felder, durch Fusion einer Zelle mit Liposomen oder durch Beschuß einer Zelle mit Partikeln ins Cytoplasma (Übersicht bei Mercenier und Chassy, 1988). Der Prozeß der natürlichen Transformation ist hingegen von Zellfunktionen abhängig, die von koordiniert exprimierten Genen im Chromosom der Empfängerzelle kodiert werden (Übersicht bei Lorenz und Wackernagel, 1994). Er kann in folgende Schritte unterteilt werden: 1. Entwicklung der DNA-Aufnahmefähigkeit (Kompetenz). 2. Bindung der DNA an die Zelloberfläche. 3. Aufnahme der DNA in die Zelle. 4. Etablierung der genetischen Information. Die Kompetenz natürlich transformierbarer Bakterien wird während des normalen Wachstums oder nur unter ganz bestimmten Umweltbedingungen entwickelt. Dabei kommt es zur Expression von Genen, deren Produkte die Bindung der DNA an die Zelloberfläche und den aktiven Transport des genetischen Materials in das Cytoplasma bewirken. In den bisher charakterisierten Aufnahmeprozessen wird doppelsträngige DNA zunächst an die Zelloberfläche gebunden, und dann folgt der Transport eines DNA-Stranges ins Cytoplasma, während der komplementäre Strang exonukleolytisch degradiert wird. Von den Gram⁺-Bakterien *B. subtilis* und *S. pneumoniae* werden in die sequenzunspezifisch gebundene DNA Doppelstrangbrüche eingeführt, und ein DNA-Strang wird mit dem 3'-Ende voran ins Cytoplasma transportiert. Von den Gram⁻-Bakterien *H. influenzae* und *N. gonorrhoeae* wird hingegen nur DNA mit spezifischen Erkennungssequenzen aufgenommen. Entweder erfolgt der Transport

z. B. ein Plasmid aus Einzelsträngen zumindest teilweise rekonstituiert (Lorenz und Wackernagel, 1993; Lorenz und Wackernagel, 1994). Desweiteren wirkt sich die Sequenzdivergenz auf Gentransferprozesse aus. Die aufgenommene DNA muß für eine erfolgreiche Integration ausreichend homolog zum Wirtsgenom sein, und tolerierte Sequenzunterschiede werden von „Mismatch“-Korrekturmechanismen häufig so beseitigt, daß die genetische Information der Empfängerzelle erhalten bleibt.

Die verschiedenen Gentransferprozesse stellen unterschiedliche Anforderungen an die Umweltbedingungen (Lorenz und Wackernagel, 1993; Lorenz und Wackernagel, 1994; Yin und Stotzky, 1997). Die höchsten Ansprüche stellt der konjugative Gentransfer. Die Ausbildung der Zellkontakte ist sehr spezifisch, und die Spender- sowie die Empfängerzelle müssen zur gleichen Zeit physiologisch aktiv sein. Für ein wahrscheinliches Aufeinandertreffen des Spenders und des Empfängers muß entweder eine relativ hohe Zelldichte vorliegen, oder die Zellen müssen eine große Bewegungsaktivität aufweisen. Sehr häufig besteht in der Umwelt jedoch ein Nährstoffmangel, sodaß keine großen physiologischen Aktivitäten zu erwarten sind. Eine erfolgreiche Transduktion ist dagegen mit geringeren Umweltaforderungen verbunden. Der Austausch genetischen Materials ist zwar ebenfalls durch die Wirtsspezifität der Phagen begrenzt, und für eine erfolgreiche Phageninfektion werden häufig extrazelluläre Kofaktoren (z. B. zweiwertige Kationen) benötigt, aber Spender und Empfänger können räumlich und zeitlich voneinander getrennt sein, denn es gibt Hinweise auf eine ausreichende Überdauerung der Phagen in der Umwelt (Yin und Stotzky, 1997). Zur Phagenproduktion muß die Spenderzelle physiologisch voll aktiv sein, für die Aufnahme und Etablierung der genetischen Information ist jedoch nur eine vergleichbar geringe Aktivität der Empfängerzelle notwendig. Die geringsten Anforderungen an die Umweltbedingungen werden offenbar von natürlicher Transformation gestellt. Wie bei der Transduktion können Spender- und Empfängerzelle räumlich und zeitlich voneinander getrennt vorliegen. Dies setzt eine Überdauerung der von der Spenderzelle freigesetzten DNA voraus. Insbesondere Untersuchungen mit Mikrokosmen haben gezeigt, daß freie DNA sehr schnell an Bodenminerale binden kann. Zum einen ist die DNA in diesem Zustand gegen nukleolytische Degradierung bzw. gegen den Verlust ihrer biologischen Aktivität resistenter als gelöste DNA. Zum anderen ist die gebundene DNA für die Empfängerzelle immer noch zugänglich (Lorenz und Wackernagel, 1994). Die Spenderzelle muß nicht physiologisch aktiv sein, denn eine Freisetzung der DNA ist auch aus toten lysierenden Zellen möglich. Weiterhin kann die Kompetenzentwicklung der Empfängerzelle durch Nährstoffbegrenzung, die oft in der Umwelt auftritt, induziert werden. Zur Aufnahme und Etablierung der freien DNA ist nur eine geringe physiologische Aktivität notwendig.

Umweltsimulierte Experimente zeigten, daß die drei Prozesse des horizontalen Gentransfers in aquatischen und terrestrischen Standorten stattfinden können (Lorenz und Wackernagel, 1993, Yin und Stotzky, 1997). Außerdem haben populationsgenetische

Untersuchungen indirekt Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer in der Umwelt gegeben. Eine panmiktische Populationsentwicklung zeigt sich in der Kombination vieler verschiedener Allele und deutet auf einen häufigen Gentransfer hin. Findet jedoch nur selten horizontaler Gentransfer statt, herrschen in einer Population nur wenige Klone vor, und man erhält eine klonale Populationsstruktur. In Organismen natürlicher Populationen wurden sowohl in einzelnen Genen als auch in ganzen Genomen Mosaikstrukturen gefunden, die sich aus Teilen verschiedener Organismen zusammensetzen und nur durch interspeziellen DNA-Transfer entstanden sein können (Lorenz und Wackernagel, 1996; Syvanen, 1994; Mazodier und Davies, 1991; Smith et al., 1992). Dies kann zur Entwicklung völlig neuer Stoffwechselwege führen, wenn geeignete Gene verschiedener Bakterien miteinander kombiniert werden (Fulthorpe et al., 1995). Es wurde daher vermutet, daß der horizontale Gentransfer hinsichtlich des Erwerbs neuer Eigenschaften und hinsichtlich der Evolution von großer Bedeutung für Bakterien ist. Da jedoch die Aufrechterhaltung der Art gewährleistet werden soll, ist der horizontale Gentransfer ein seltenes Ereignis, und es erfolgt primär eine klonale Evolution.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß horizontaler Gentransfer in der Umwelt stattfindet. Vermutlich ist die natürliche Transformation der häufigste Transfermechanismus, und Gentransfer durch Konjugation oder Transduktion kann unter günstigen Bedingungen zusätzlich stattfinden. Offenbar ist die natürliche Transformation ursprünglich der bakterieneigene Gentransferprozeß, da alle benötigten Funktionen vom Bakterienchromosom kodiert werden. Dem Gentransfer durch Konjugation oder Transduktion hingegen liegen Mechanismen zugrunde, die primär zur Verbreitung von parasitischen genetischen Elementen (Plasmide, Phagen, Transposons) dienen. Generell ist ein reziproker Gentransfer zwischen Spender- und Empfängerzelle einer Bakterienspezies möglich. Viel seltener findet ein genetischer Austausch zwischen verschiedenen Bakterienarten oder -genera statt, und in Ausnahmefällen ist ein Austausch genetischen Materials zwischen Bakterien und höheren Organismen möglich.

1.2 Selbstmordsysteme für Bakterien

Die biotechnische Anwendung von GVMs läßt in naher Zukunft bedeutende Fortschritte in der Wissenschaft, in der Medizin, in der industriellen und landwirtschaftlichen Produktion und im Umweltschutz erwarten. Die Konstruktion dafür geeigneter GVMs ist oftmals mit der Kombination genetischer Information aus sehr unterschiedlichen Organismen verbunden, deren natürliche Entstehung durch Barrieren, wie sie für den horizontalen Gentransfer bestehen (s. 1.1), nahezu unwahrscheinlich sind. Da das Verhalten dieser GVMs in der Umwelt nach einer beabsichtigten oder unbeabsichtigten Freisetzung unklar ist, bestehen insbesondere hinsichtlich einer großtechnischen Anwendung von GVMs große Bedenken. Es wird befürchtet, daß es durch ein Überleben und eine

Vermehrung der GVMs zur Beeinträchtigung des mikrobiellen Ökosystems kommen kann. In der Regel werden zwar geschwächte Mikroorganismen zur gentechnischen Veränderung verwendet, aber generell ist eine Anpassung der GVMs an die Umwelt durch horizontalen Transfer von Genen autochthoner Organismen auf die GVMs möglich. Einige Beispiele zeigen, daß GVMs die Population autochthoner Bakterien und deren Prozesse beeinflussen können (Austin et al., 1990; Doyle et al.; 1991; Wang et al., 1989). Ein weiteres Risiko wird in der unkontrollierten Verbreitung des rekombinanten Erbmaterials in der Umwelt gesehen. Es gibt Hinweise, daß DNA der GVMs durch horizontale Gentransferprozesse auf autochthone Bakterien übertragen werden kann (Henschke et al., 1990; Smit et al., 1991). Die Rezipienten könnten durch den Erwerb der rekombinanten DNA Vorteile gegenüber anderen Organismen des Ökosystems erlangen. Desweiteren könnte die Vermehrung der Rezipienten zur Vervielfältigung der rekombinanten DNA führen, wodurch die Chance zur Weitergabe an andere autochthone Bakterien der gleichen oder einer anderen Umwelt erhöht würde.

Mit dem Ziel der gefahrlosen Anwendung von GVMs wurden biologische Sicherheitssysteme entwickelt, die die potentiellen Risiken auf das äußerste minimieren sollen. Diese Systeme sollen die Vermehrung von unbeabsichtigt freigesetzten GVMs einschränken oder bei einer Anwendung in der offenen Umwelt die Existenz der GVMs in ihrem Zielhabitat zeitlich begrenzen. In jedem Fall soll außerdem die Wahrscheinlichkeit eines Gentransfers zwischen GVMs und autochthonen Bakterien minimiert werden. Prinzipiell können passive Sicherheitssysteme von aktiven Systemen unterschieden werden. Das passive nicht-regulierbare Containment von GVMs wurde seit der Entwicklung der Gentechnik routinemäßig angewendet. Es beruht auf der Verwendung vielfältig mutierter Bakterienstämme, die außerhalb des Labors in der Konkurrenz mit autochthonen Organismen weit unterlegen sind. Weiterhin wurden nicht-konjugative und nicht-mobilisierbare Plasmide als Vektoren bevorzugt eingesetzt. Passive Sicherheitssysteme haben jedoch einige entscheidende Nachteile. Das Wachstum der geschwächten Mutanten ist oftmals selbst unter Laborbedingungen stark beeinträchtigt (Curtiss et al., 1977), sodaß sie nicht für industrielle Anwendungen taugen. Der Aufwand zur Identifizierung einer geeigneten Mutante mit ausreichender Einschränkung und den erforderlichen Wachstumseigenschaften ist sehr groß. Außerdem wurde gezeigt, daß einige Laborstämme auch in der Umwelt für längere Zeit überleben können (Chao und Feng, 1990). In dieser Zeit kann horizontaler Gentransfer stattfinden. Sollen GVMs bei Umweltanwendungen zum Einsatz kommen, dann müssen sie konkurrenzfähig gegenüber autochthonen Organismen sein. Geschwächte GVMs sind daher zur Erledigung von Aufgaben, die ein Überleben in der Umwelt erfordern (z. B. Umweltsanierung, Lebendvaccinierung), nicht geeignet. Die ausschließliche Verwendung von nicht-mobilisierbaren Plasmiden vermindert die Wahrscheinlichkeit des horizontalen Gentransfers nur geringfügig, denn der Transfer von chromosomal- und plasmidkodierter genetischer

Information ist vermutlich durch die viel häufiger stattfindende Transformation oder Transduktion möglich (s. 1.1). Desweiteren könnte nach der Integration der rekombinanten DNA in ein koexistierendes mobilisierbares Plasmid auch eine konjugative Weitergabe ermöglicht werden. In den letzten Jahren wurden deshalb zunehmend aktive Sicherheitssysteme entwickelt, die eine regulierbare Abtötung ungeschwächter GVMs ermöglichen (Übersicht bei Molin et al., 1993). Das wirkungsvollste Prinzip aktiver Suizidsysteme ist die induzierbare Expression eines Gens (Kill-Gen), das ein Produkt mit bakterizider Wirkung kodiert. Auf diese Weise wird zum einen die Vermehrung der induzierten GVMs stark vermindert, und zum anderen wird die Chance eines horizontalen Gentransfers durch die stark verkürzte Verweildauer der GVMs in der Umwelt minimiert. Die meisten der bisher verwendeten Kill-Gene kodieren Produkte, die die Zellintegrität zerstören (vergl. Tab. 1; Hok, Gef, RelF, SacB, T7-Lysozym). Ein weiteres Tötungsprinzip beruht auf der Produktion eines Inhibitors für den zentralen Stoffwechsel der Zelle (Szafranski, 1997). Das Schicksal der (rekombinanten) DNA wird allerdings nur von einem System beachtet. Die Induktion dieses Systems bewirkt den Tod der Zelle und eine gleichzeitige Degradierung der zellulären DNA, sodaß die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers nach postmortaler DNA-Freisetzung minimiert wird (Ahrenholtz et al., 1994b). Die Wirksamkeit und die Anwendbarkeit dieser Suizidsysteme wird durch die Regulation des Kill-Gens bestimmt. Bisher wurden die Kill-Gene fast ausschließlich von einem regulierbaren Promoter kontrolliert, der eine Induktion des Zelltodes durch Temperaturerhöhung, durch Nährstoffmangel oder durch Zugabe von Chemikalien ermöglicht. Nur in einem Fall führt das spontane Umschalten der Suizidkontrolle zu einer stochastischen Abtötung der Zellen (Molin et al., 1988; Klemm et al., 1995). Die Wirksamkeit des Suizidsystems ist von der Dereprimierbarkeit der Kontrolle und der Expressivität des Kill-Gens abhängig. Einerseits soll ein Induktionssignal möglichst in allen Zellen eine sehr hohe Produktion der toxischen Substanz bewirken. Andererseits muß im uninduzierten Zustand das Basalniveau der Expression so gering wie möglich sein, damit die Fitness der Zellen nicht beeinträchtigt wird. Haben Zellen mit reprimiertem Suizidsystem einen Wuchsnachteil gegenüber suizidresistenten Mutanten, dann können sich diese Mutanten in der Population schnell durchsetzen, und ein erheblicher Teil der Zellen entkommt dem Tötungsprozeß (Knudsen und Karlström, 1991). Weiterhin muß die Chance minimiert werden, daß Zellen durch Segregation des Suizidsystems dem Tötungsprozeß entkommen. Dies ist insbesondere beim Einsatz eines plasmidkodierten Suizidsystems im großtechnischen Maßstab oder bei Umweltsanwendungen problematisch, da eine Selektion, wie sie unter Laborbedingungen angewendet wird (z. B. durch ein Antibiotikum), nicht praktikabel ist.

Die bisher bekannten Suizidsysteme mit induzierbarer Tötungsfunktion sind in Tab. 1 zusammengefaßt und werden im folgenden kurz erläutert.

Tab. 1: Bakterielle Suizidsysteme mit konditionaler Tötungsfunktion

Kill-Gen	Regulationssystem	Lokalisierung	Überleben ¹ [logN/N ₀]	Mutationsrate ²	Referenz
<i>hok</i>	P_{trp} vor <i>hok</i>	Plasmid	10^{-3} - 10^{-4}	k.A.	Molin et al., 1987
<i>hok</i>	P_R vor <i>hok</i> ; <i>cI857</i>	Plasmid	10^{-4}	k.A.	Molin et al., 1988
<i>hok</i>	P_{fimA} vor <i>hok</i> ; Regulator-gene <i>fimB</i> , <i>fimE</i>	Plasmid	10^{-6}	k.A.	Molin et al., 1988
<i>hok</i>	P_{lac} vor <i>hok</i>	Plasmid	10^{-2}	k.A.	Bej et al., 1988
<i>relF</i> ³	P_{lacUV5} vor <i>relF</i> <i>lacI</i>	Plasmid Chromosom	5×10^{-5}	10^{-6}	Knudsen und Karlström 1991
<i>gef</i> ^β	P_{tac} vor <i>gef</i> P_m vor <i>lacI</i> ; <i>xyIS</i>	Plasmid Plasmid	10^{-5} - 10^{-6}	10^{-4} - 10^{-5}	Contreras et al., 1992
<i>hok/sok</i>	P_{phoA} vor <i>hok/sok</i>	Plasmid	5×10^{-2}	k.A.	Schweder et al., 1992
<i>sacB</i>	Suizidkassette <i>sacB-R-nptI</i>	Chromosom	10^{-3}	10^{-5}	Recorbet et al., 1993
<i>gef</i> ^β	$P_{lacA1-04/03}$ vor <i>gef</i> P_m vor <i>lacI</i> ; <i>xyIS</i>	Chromosom Plasmid	10^{-4}	10^{-5} (<i>lacI</i>), 10^{-6} (<i>lacI</i> ^q), 10^{-8} (<i>lacI</i> ^q , 2 Suizidkassetten)	Jensen et al., 1993
<i>nuc</i>	P_L vor <i>nuc</i> <i>cI857</i>	Plasmid Chromosom	2×10^{-5}	k.A.	Ahrenholtz et al., 1994b
<i>gef</i> ^β	P_{fimA} vor <i>gef</i> ; Regulator-gene <i>fimB</i> , <i>fimE</i>	Plasmid	10^{-5}	k.A.	Klemm et al., 1995
<i>relF</i> ³	$P_{lacA1-04/03}$ vor <i>relF</i> , 2 Suizidkassetten <i>lacI</i> ^q	Plasmid Chromosom	10^{-8}	10^{-8}	Kundsen et al., 1995
<i>gef</i> ^β	P_{lac} vor <i>gef</i> P_m vor <i>lacI</i> ; <i>xyIS</i>	Chromosom Plasmid	10^{-2} - 10^{-3}	10^{-6}	Ronchel et al., 1995
<i>T7lys</i>	P_{phoA} vor T7-Lysozymgen	Plasmid	10^{-4} - 10^{-5}	k.A.	Schweder et al., 1995
<i>colE3</i>	$P_{lacA1-04/03}$ vor <i>colE3</i> P_m vor <i>lacI</i>	Chromosom Plasmid	10^{-3}	5×10^{-5}	Munthali et al., 1996
<i>stv</i>	$P_{T7\Phi10}$ vor <i>stv</i> , P_m vor <i>lacI</i> (Antisense-RNA zu Kill-mRNA); <i>xyIS</i> P_{tac} vor T7gen1 (T7-RNA-Polymerase); <i>T7lys</i>	Plasmid Plasmid	10^{-3} - 10^{-6}	10^{-4} - 10^{-8}	Szafranski et al., 1997
<i>endA</i>	P_L vor <i>endA</i> <i>cI857</i>	Plasmid Chromosom	1×10^{-5}	$1,7 \times 10^{-9}$	diese Arbeit

¹Es ist das minimale Überleben angegeben, das nach der Induktion festgestellt wurde.²Es ist die Mutationsrate pro Zelle und Generation angegeben; k. A. = keine Angabe³Gehört zur Familie der *hok*-Gene.

Die ersten aktiven Suizidsysteme enthielten das *hok*-Gen des *parB*-locus aus dem Plasmid R1 als Kill-Gen (Molin et al., 1987; Molin et al., 1988). Dieses Gen kodiert ein kurzes Polypeptid, das in die Cytoplasmamembran inseriert wird und zum Zusammenbruch des Membranpotentials führt, sodaß essentielle Stoffwechselreaktionen (z. B. ATP-Synthese) nicht mehr stattfinden können. Homologe Gene bzw. Regionen wurden in anderen Plasmiden (*flmA*, *srnB'*, *pndA*) und im Chromosom von *E. coli* (*gef*, *relF*) gefunden (Gerdes et al., 1990). Die Expression des *hok*-Gens wird in dem von Molin et al. (1987) vorgestellten Suizidsystem von dem Promoter des Tryptophan-Operons aus *E. coli* (P_{trp}) kontrolliert. Das plasmidkodierte Suizidsystem wird durch Tryptophanmangel induziert, den 0,1% der Zellen überleben. Eine Untersuchung der Überlebenden ergab, daß die Suizidkassette intakt ist und ein Überleben vermutlich durch eine mangelnde Induktion des Suizidsystems möglich wurde. Eine zehnfach größere abtötende Wirkung konnte durch Zugabe von IAA (3-(3-indolyl) acrylic acid), einem Inhibitor des Tryptophan-trpAporepressor-Komplexes, erreicht werden.

In einem anderen Suizidsystem wird das *hok*-Gen von einem Promoter (P_{fimA}) kontrolliert, der sich auf einem invertierbaren DNA-Fragment befindet. Die natürliche Funktion des P_{fimA} besteht in der periodischen Induktion der Synthese von Typ1-Fimbrien in *E. coli*. Dies führt zum Phasenwechsel der Oberflächenantigene (Abraham et al., 1985). Die Inversion findet mit einer Rate von 10^{-3} pro Zelle und Generation statt und wird von den Genen *fimB* und *fimE* reguliert. Das Protein FimB bewirkt eine Expression des *fimA*-Gens, und das FimE bewirkt ein „Abschalten“ der *fimA*-Expression. Dies bedeutet, daß es zur periodischen Induktion des Suizidsystems in einem Teil der Zellpopulation kommt. Dadurch wird die Vermehrungsgeschwindigkeit der Zellpopulation insgesamt vermindert und es entsteht ein Wuchsnachteil gegenüber den autochthonen Bakterien in der Umwelt. Die Induktion des Suizidsystems erfolgt nicht durch ein bestimmtes Signal, sondern spontan. Das plasmidkodierte Suizidsystem bewirkt zwar, daß in einer stationären Kultur nach neun Tagen nur noch 0,0001% der Zellen vermehrungsfähig sind, aber die relativ langsame Verminderung der Zellpopulation läßt genügend Zeit für einen horizontalen Gentransfer.

Ein identisches Suizidsystem mit dem *gef*-Gen unter der Kontrolle des P_{fimA} wurde von Klemm et al. (1995) vorgestellt und unterscheidet sich in der Wirksamkeit nicht von dem System mit dem *hok*-Gen.

In einem weiteren Suizidsystem befindet sich das *hok*-Gen unter der Kontrolle des P_R -Promoters vom Phagen λ . Die Expression wird von dem *cI857*-Allel des Phagen reguliert, das einen thermosensiblen Repressor kodiert. Der *CI857*-Repressor wird durch Erhöhung der Umgebungstemperatur von 30°C auf 42°C inaktiviert, und folglich kommt es zur der *Hok*-Produktion. Eine neunzigminütige 42°C-Behandlung überleben 0,01% der Zellen.

Von Bej et al. (1988) wurde ein Suizidsystem konstruiert, das ein vom Promoter des Lac-Operons von *E. coli* (P_{lac}) kontrolliertes *hok*-Gen enthält und durch IPTG-Zugabe induziert werden kann. Die Abtötungseffizienz dieses Suizidsystems war relativ gering (1% Überlebende), da vermutlich suizidresistente Mutanten mit großer Häufigkeit auftreten.

Das von Knudsen und Karlström (1991) entwickelte Suizidsystem enthält das *relF*-Gen als Kill-Gen. Die Kontrolle der *relF*-Expression erfolgt durch einen veränderten P_{lac} (P_{lacUV5}), der eine zweifach höhere induzierbare Expression und ein zehnfach höheres Basalniveau bewirkt als der P_{lac} (Lanzer und Bujard, 1988). Die Suizidkassette befindet sich in einem Plasmid, und das Repressor-Gen (*lacI*) ist im Chromosom lokalisiert. In Gegenwart von IPTG überleben 0,005 % der Zellen. Suizidresistente Mutanten treten mit einer Rate von 10^{-6} pro Zelle und Generation auf. Eine nähere Untersuchung zeigte, daß die Mutationsrate der limitierende Faktor für die Abtötungseffizienz ist. Außerdem wurde deutlich, daß das Basalniveau der *relF*-Expression zu einer reduzierten Vermehrungsgeschwindigkeit führt und somit ein selektiver Wachstumsvorteil der suizidresistenten Mutanten entsteht.

Ein Suizidsystem mit IPTG-induzierbarer *relF*-Expression, dessen Wirkung selten durch Mutationen dauerhaft aufgehoben ist, wurde von Knudsen et al. (1995) vorgestellt. Die Kontrolle des Kill-Gens erfolgt in diesem System durch den $P_{A1-04/03}$ -Promoter, der vom P_{lac} abgeleitet ist und ein sehr niedriges Basalniveau der Expression bewirkt (Lanzer und Bujard, 1988). In einem Plasmid befinden sich zwei identische Suizidkassetten, die gleichzeitig mutieren müssen, um eine Suizidresistenz zu erhalten. Der Repressor wird vom *lacI^q*-Allel kodiert, das sich im Chromosom befindet. Dieses Allel bewirkt im Vergleich zum *lacI*-Wildtypallel eine zehnfach höhere Produktion des Lac-Repressors (Calos, 1978). Die Rate suizidresistenter Mutanten ist hundertfach geringer als beim System, das ein vom P_{lac} und *lacI*-Gen kontrolliertes *relF* enthält (vergl. Knudsen und Karlström, 1991). Eine einstündige Induktion des Systems überleben 0,1% der Zellen, und nach 40-50 h Induktion beträgt das Überleben nur noch 10^{-8} .

Contreras et al. (1991) entwickelten ein Suizidsystem mit komplexer Regulation des *gef*-Gens. Das Suizidsystem sollte ein Modell dafür sein, wie der Zelltod von GVMs nach Beendigung ihrer Funktion in einer Umweltsituation ausgelöst werden kann. In dem Suizidsystem steht das *gef*-Gen unter der Kontrolle des *tac*-Promoters, der aus Teilen des P_{lac} und des P_{trp} zusammengesetzt ist (de Boer et al., 1983) und eine dreifach höhere induzierte Expression und ein fünfzigfach höheres Basalniveau als der P_{lac} bewirkt (Lanzer und Bujard, 1988). Die Suizidkassette befindet sich in einem Plasmid (Suizidplasmid). Die Regulation des Suizidsystems erfolgt durch eine Kassette, die in einem kompatiblen Plasmid (Regulationsplasmid) integriert ist und gleichzeitig neben dem Suizidplasmid in einer Zelle existieren kann. Diese Regulationskassette besteht aus

dem Repressor-Gen (*lacI*), das unter der Kontrolle des Promoters (P_m) vom Operon der Metaspaltung aromatischer Verbindungen in *Pseudomonas putida* steht. Außerdem enthält das Regulationssystem das *xylS*-Gen, das einen positiven Regulator des P_m kodiert. Eine aus der Umwelt aufgenommene Benzoatverbindung (Effektor) kann XylS binden und durch Interaktion des XylS-Effektor-Komplexes mit dem P_m die Expression des *lacI*-Gens induzieren. Folglich findet eine Repression des Suizidsystems statt, solange der umzusetzende Effektor des Abbaupfades in der Umwelt vorhanden ist. Wenn die Effektor-Konzentration aufgrund der Spaltungsaktivität der GVMs sehr niedrig geworden ist, wird die *lacI*-Expression eingestellt, und es kommt zur Induktion des Suizidsystems. Das Überleben beträgt nach der Induktion des Suizidsystems zwar nur 10^{-5} - 10^{-6} , aber bei einer längeren Inkubation steigt der Lebendtitel wieder. Eine Untersuchung zeigte, daß die meisten der Überlebenden suizidresistente Mutanten sind. Außerdem ist ein Einsatz des Suizidsystems in Umweltsanwendungen unwahrscheinlich, da die in der Umwelt vorkommenden Effektorkonzentrationen für eine wirksame Repression viel zu gering sind. Das Suizidsystem wäre daher in der Umwelt ständig induziert, und es würde kein Abbau von aromatischen Verbindungen stattfinden können.

Von Jensen et al. (1993) wurde ein sehr ähnliches Suizidsystem für *Pseudomonas putida* entwickelt. Das *gef*-Gen wurde unter die Kontrolle des $P_{A1-04/03}$ gestellt und ins Chromosom inseriert. Die Regulationskassette mit dem P_m -kontrollierten *lacI*-Gen und das *xylS*-Gen wurden hingegen in einem Plasmid belassen (vergl. Contreras et al., 1991). Zwei Wochen nach der Induktion des Suizidsystems sind noch 0,01% der Zellen, die zu dem zuvor sterilisierten Boden gegeben wurden, vermehrungsfähig. Die Rate suizidresistenter Mutanten beträgt ca. 10^{-5} pro Zelle und Generation. Die Mutationsrate ist zehnfach geringer, wenn anstatt des *lacI* das *lacI^q* verwendet wurde, weil die erhöhte Repressorproduktion mit dem *lacI^q* vermutlich das Basalniveau der *gef*-Expression reduziert. Die Mutationsrate ist nochmals hundertfach niedriger, wenn zwei Suizidkassetten im Chromosom einer Zelle vorliegen. (vergl. Knudsen et al., 1995).

Von Ronchel et al. (1995) wurde ein nahezu identisches Suizidsystem konstruiert. Im Unterschied zum System von Jensen et al. (1993) befindet sich das *gef*-Gen unter der Kontrolle des P_{lac} . Außerdem ist die Suizidkassette im Transposon Tn5 integriert, und es wurde das *lacI* zur Konstruktion der Regulationskassette verwendet. Die Abtötungseffizienz ist zehn- bis hundertfach geringer als beim System mit der $P_{A1-04/03}$ -Kontrolle, und die Mutationsrate unterscheidet sich nur unwesentlich (vergl. Tab. 1; Jensen et al., 1993). Möglicherweise ist das induzierte Expressionsniveau des P_{lac} bedeutend geringer als beim $P_{A1-04/03}$, sodaß die eine geringere Gef-Produktion erfolgt und die Chance des Überlebens größer ist.

In einer weiteren Abwandlung des von Contreras et al. (1991) beschriebenen Suizidsystems wurde das *colE3*-Gen, das das toxische Colicin E3 kodiert, unter die Kontrolle

des $P_{A1-04/03}$ gestellt (Munthali et al., 1996). Das Colicin E3 führt 49 bp vom 3'-Ende der 16S-RNA eine endonukleolytische Spaltung durch. Dadurch wird die komplementäre Shine-Delgarno-Sequenz entfernt, und es entstehen defekte 30S-Untereinheiten der Ribosomen. Folglich kommt es aufgrund der ausbleibenden Proteinbiosynthese zum Zelltod. Natürlicherweise wirken Colicine nur in einem engen Wirtsbereich, da sie über spezifische Oberflächenrezeptoren gebunden und aufgenommen werden müssen. Das intrazelluläre Angriffsziel des Colicin E3 ist jedoch in allen Organismen sehr stark konserviert, sodaß das intrazellulär produzierte Protein ein breites Wirkungsspektrum besitzt (Diaz et al., 1994). Die Suizidkassette befindet sich in einem Transposon (mini-Tn5) und wurde in das Chromosom von *Pseudomonas putida* inseriert. Die Komponenten der Regulationkassette (P_m -kontrolliertes *lacI*) und das *xyIS*-Gen sind in einem Plasmid lokalisiert. Das Überleben nach der Induktion beträgt ca. 10^{-3} , und suizidresistente Mutanten treten mit einer Rate von 5×10^{-5} pro Zelle und Generation auf. Dies entspricht der Wirksamkeit des nahezu identischen Systems mit *gef* als Kill-Gen (vergl. Ronchel et al., 1995).

Schweder et al. (1992) stellten ein Suizidsystem vor, das die gesamte *parB*-Region (*hok/sok*) des Plasmids R1 als Tötungsfunktion enthält. Der *parB*-locus stabilisiert Plasmide in Bakterienpopulationen durch ein postsegregatives Abtöten plasmidfreier Zellen (Gerdes et al., 1986). Die Tötungsfunktion wird vom *hok*-Gen kodiert, das in eine sehr stabile mRNA transkribiert wird. Das *sok*-Genprodukt ist eine Antisense-RNA, die die Hok-Translation verhindert und nur eine geringe Halbwertszeit hat. Im Falle einer Plasmidsegregation wird die *sok*-RNA sehr schnell abgebaut. Folglich kommt es zur Translation der *hok*-mRNA und die Zelle wird vom Hok-Protein getötet (Thisted et al., 1994a; 1994b). Die *parB*-Region wurde so unter die Kontrolle des Promoter vom Gen der Alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (P_{phoA}) gestellt, daß eine Phosphatlimitierung die Überproduktion der *hok*-mRNA auslöst. Die Zelle wird dann getötet, weil nicht ausreichend *sok*-RNA zur Verhinderung der Hok-Translation vorhanden ist. Die Abtötungseffizienz des Systems ist sehr gering, obwohl der P_{phoA} ein hohes induziertes Expressionsniveau bewirkt. Eine Phosphatlimitierung überleben 5% der Zellen. Es wurde vermutet, daß das *sok*-Gen die Ursache für die geringe Wirksamkeit ist, da die Induktion des Suizidsystems mit dem vom P_{trp} kontrollierten *hok*-Gen (ohne *sok*) weniger als 0,1% der Zellen überlebten (vergl. Tab. 1; Molin et al., 1987).

Die vom P_{phoA} kontrollierte Expression des T7-Lysozyngens ist das Prinzip eines weiteren Suizidsystems (Schweder et al., 1995). Die Induktion des Systems überleben 0,01-0,001% der Zellen, alle anderen werden lysiert.

Ein Suizidsystem, das durch Saccharose-Zugabe induziert wird, stellten Recorbet et al. (1993) vor. Als Kill-Gen dient das *sacB*-Gen von *Bacillus subtilis*, das eine Levansucrase kodiert. Nach der Induktion des im Chromosom von *E. coli* lokalisierten Suizidsy-

systems produziert das Enzym tödliche Mengen Levan, das im Periplasma akkumuliert und die Lyse der Zelle bewirkt. Eine zehnstündige Induktion des Suizidsystems überleben ca. 0,1% der Zellen, und die Rate Saccharose-resistenter Mutanten betrug 10^{-5} pro Zelle und Generation.

Von Szafranski et al. (1997) wurde ein induzierbares Suizidsystem für *Pseudomonas putida* vorgestellt, das einen endogenen Biotinmangel hervorruft. In der Suizidkassette befindet sich das *stv*-Gen, das das Streptavidin von *Streptomyces avidinii* kodiert, unter der Kontrolle des $\Phi 10$ -Promoter vom Phagen T7. Die Regulationskassette besteht aus dem vom P_m kontrollierten *lacI*-Gen. Die Suizid- und die Regulationskassette wurden mit entgegengesetzter Transkriptionsrichtung in ein Plasmid integriert, und das *xylS* wurde in dasselbe Plasmid inseriert. In Anwesenheit aromatischer Kohlenstoffverbindungen findet die XylS-vermittelte Produktion des Lac-Repressors statt. Die mRNA wirkt zugleich als Antisense-RNA, wodurch ein sehr niedriges Basalniveau der Streptavidin-Produktion erreicht wird. In einem zweiten Plasmid befindet sich das Gen der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des P_{tac} , und das Gen für das T7-Lysozym wird vom *tet*-Promoter aus transkribiert. Das T7-Lysozym inhibiert die T7-RNA-Polymerase, die den $\Phi 10$ -Promoter sehr spezifisch erkennt. Ist das Suizidsystem reprimiert, wird die Aktivität der basal produzierten Polymerase vermindert und folglich ist die Basalexpression sehr gering. Fehlt der Effektor des XylS in der Umwelt, findet keine Produktion des Lac-Repressors statt, und T7-RNA-Polymerase wird in großen Mengen hergestellt. Dies bewirkt wiederum eine starke Expression des *stv*-Gens. Das gebildete Streptavidin geht eine nahezu irreversible Bindung mit intrazellulärem Biotin ein, sodaß ein Mangel an zugänglichem Biotin in der Zelle entsteht. Die Biotin-abhängigen Enzyme (Carboxylasen, Decarboxylasen, Transcarboxylasen) des zentralen Kohlenstoffwechsels werden dadurch in ihrer Funktion blockiert, und der Zelltod tritt ein. Das Suizidsystem kann alternativ oder zusätzlich durch IPTG-Zugabe induziert werden. Die Abtötungseffizienz ist von der Induktionsweise abhängig. Ohne XylS-Effektor beträgt das Überleben 10^{-3} ; wenn zusätzlich IPTG gegeben wird, ist das Überleben der Zellen nur noch 10^{-5} - 10^{-6} . Zellen mit diesem System entkommen dem Tötungsprozeß durch Mutationen seltener als Zellen mit allen bisher bekannten Systemen, die ebenfalls nur einer Kopie der Suizidkassette enthalten. Suizidresistente Mutanten treten mit einer Rate von 10^{-7} - 10^{-8} pro Zelle und Generation auf. Die Ursache hierfür sind vermutlich die verschiedenen Maßnahmen zur Absenkung des Basalniveaus der *stv*-Expression.

Ein weiteres Suizidsystem wurde von Ahrenholtz et al. (1994b) vorgestellt. Die Tötung der Zellen mit diesem System erfolgt durch den endonukleolytischen Abbau intrazellulärer DNA. Das *nuc*-Gen, das die extrazelluläre Nuklease von *S. marcescens* kodiert, wurde um den Teil verkürzt, der den Export des Enzyms bewirkt, und wurde unter die Kontrolle des P_L -Promoters vom Phagen λ gestellt. Die Suizidkassette befindet sich in

einem Plasmid, und das *cI857*-Allel des Repressors ist im Chromosom lokalisiert. Nach einer Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C wird die intrazellulär wirksame Nuklease produziert, und die Degradierung des Wirtsgenoms führt zum Zelltod. Eine dreißigminütige Induktion überleben 0,002% der Zellen. Innerhalb von 2,5 h ist mehr als 80% der intrazellulären DNA in säurelösliches Material (Fragmentlänge ≤ 16 bp) umgewandelt. Dies ist bisher das einzige Prinzip, das außer dem Zelltod auch die biologische Inaktivierung der DNA von GVMs ermöglicht. Alle anderen Systeme töten zwar die Zelle, der Verbleib der rekombinanten DNA ist jedoch ungewiß. Es besteht das Risiko, daß die DNA der GVMs nach einer Zellyse (z. T. durch die Suizidfunktionen aktiv hervorgerufen) an Bodenminerale adsorbiert und für längere Zeit in der Umwelt überdauert. Diese DNA kann durch natürliche Transformation (s. 1.1) von anderen Bakterien aufgenommen und durch horizontale Gentransferprozesse weiter verbreitet werden. Mit Suizidsystemen, die Nukleasen als Tötungsfunktion enthalten, kann dieses Risiko deutlich minimiert werden.

1.3 Die Endonuklease I von *Escherichia coli*

Die Existenz einer RNA-inhibierten DNase in *E. coli* wurde erstmalig von Kozloff (1953) erwähnt. Das Enzym ist ein basisches Protein und spaltet DNA ausschließlich endonukleolytisch. Das pH-Optimum dieser ersten beschriebenen Endonuklease von *E. coli* (Endo I) liegt zwischen 7,5 und 8,5. Das Enzym spaltet native DNA mit einer siebenmal größeren Rate als denaturierte DNA. Nach einer exzessiven Degradierung durch Endo I entstehen Oligonukleotide mit einer Größe von durchschnittlich 7 bp, die ein 5'-Phosphat-Ende besitzen. Für die maximale Aktivität der Endo I sind Magnesium-Ionen erforderlich. Mit Mangan-Ionen ist das Enzym nur noch halb so aktiv, und andere zweiwertige Kationen können Magnesium-Ionen nicht ersetzen (Lehman et al., 1962a). Die DNA wird von Endo I sequenzunspezifisch, bzw. bevorzugt zwischen Guanin und Cytosin gespalten (Lehman et al., 1962a; Ehrlich et al., 1973). Aus der Kinetik der Umwandlung von DNA zu säurelöslichem Material wurde geschlossen, daß das Enzym Doppelstrangbrüche erzeugt, indem es beide DNA-Stränge gleichzeitig an gegenüberliegenden oder nahe beieinander liegenden Orten spaltet (Studier, 1965; Bernardi und Cordonnier, 1965; Melgar und Goldthwait, 1968a). Weiterhin wurde gezeigt, daß Endo I bei niedrigen Salzkonzentrationen zwar Doppelstrangbrüche erzeugt, aber bei hohen Salzkonzentrationen und gleichzeitiger Anwesenheit von tRNA strangunspezifisch einen Einzelstrangbruch pro superhelikales DNA-Molekül einführt (Goebel und Helinski, 1970; Jekel und Wackernagel, 1995). In Rohextrakten und nach der Freisetzung aus dem Periplasma ist Endo I mit RNA komplexiert, und die Aktivität des Enzyms ist inhibiert (Lehman et al., 1962a; Cordonnier und Bernardi, 1965). Die Aktivität der Endo I kann zwar mit verschiedenen RNA-Sorten aus unterschiedlichen Organismen kompeti-

tiv inhibiert werden, die stärkste Hemmung wurde jedoch mit tRNA von *E. coli* erreicht. Außerdem wurde festgestellt, daß das Enzym zumindest bei niedrigen Salzkonzentrationen eine größere Affinität zum Inhibitor (RNA) als zum Substrat (DNA) besitzt (Lehman et al., 1962b).

In Zellen, die sich exponentiell vermehren, ist der größte Teil der Endo I im periplasmatischen Raum lokalisiert und kann durch Behandlung mit Lysozym und EDTA, durch osmotischen Schock oder durch Kälteschock ins Umgebungsmedium freigesetzt werden (Cordonnier und Bernardi, 1965; Obinata und Mizuno, 1968; Ananthaswamy, 1977). Die größte Endo I-Menge liegt in Zellen der frühen exponentiellen Wachstumsphase einer Kultur vor, nimmt dann stetig ab, und in der stationären Wachstumsphase ist schließlich kaum noch Endo I-Aktivität nachweisbar (Shortman und Lehman, 1964). Die geringe intrazelluläre Endo I-Menge verändert sich dagegen nur verhältnismäßig wenig (Obinata und Mizuno, 1968). Aufgrund dieser Befunde wurde der Endo I eine Wachstumsphasen-spezifische Funktion zugeordnet und eine mit dem Wachstum koordinierte Regulation der Expression vermutet.

Mit Endo I-defizienten Mutanten wurde gezeigt, daß das Enzym offenbar nicht lebensnotwendig für die Zelle ist. Hinsichtlich der Vermehrungsgeschwindigkeit, der Phagenvermehrung nach einer Infektion und der konjugativen Rekombination wurde kein Unterschied zwischen Mutanten und Wildtyp festgestellt (Dürwald und Hoffmann-Berling, 1968). Das Gen der Endo I (*endA*) wurde in der 64. Minute zwischen den Genen *metK* und *galP* kartiert (Wright, 1971; Bachmann, 1990). Nach der Klonierung und Sequenzierung konnte das *endA*-Gen auf der physikalischen Karte lokalisiert (Nukleotid-Nr. 3.104.000) und die relative Transkriptionsrichtung (im Uhrzeigersinn) bestimmt werden (Jekel und Wackernagel, 1994). Aus der Nukleotidsequenz wurde abgeleitet, daß das *endA*-Gen aus einem 705 bp langen ORF besteht und einen eigenen Promoter und Transkriptionsterminator besitzen könnte. Möglicherweise wird beim Transport des Proteins durch die Cytoplasmamembran ein Signalpeptid abgespalten, sodaß für das prozessierte Protein ein relatives Molekulargewicht von ca. $M_r=25.000$ vermutet werden kann (Jekel und Wackernagel, 1995).

2 Problemstellung

In Verbindung mit dem Einsatz von GVMs in der industriellen Produktion, in der Medizin und in der offenen Umwelt (Landwirtschaft, Abfallbeseitigung) werden potentielle Risiken in einer unkontrollierten Vermehrung der GVMs und in einer Verbreitung ihrer rekombinanten DNA durch horizontalen Gentransfer gesehen. In der Vergangenheit wurden biologische Sicherheitssysteme entwickelt, um diese Risiken zu minimieren. Diese Suizidsysteme bewirken zwar den Zelltod, lassen aber nahezu alle das Schicksal der DNA unbeachtet. In der vorliegenden Arbeit sollte ein neues Sicherheitssystem entwickelt werden, das einen induzierbaren Zelltod mit einer intrazellulären DNA-Degradierung verbindet. Die Endonuklease I von *E. coli* sollte dabei als Tötungsfunktion dienen. Desweiteren sollte dieses System und ein analoges System, das die extrazelluläre Nuklease von *S. marcescens* als Tötungsfunktion enthält (Ahrenholtz et al., 1994b), hinsichtlich der Wirksamkeit und einer technischen Anwendung weiterentwickelt bzw. optimiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte eine Charakterisierung der Endo I die Beurteilung ermöglichen, ob das Enzym für das geplante Suizidsystem geeignet ist. Für eine wirksame Zelltötung müssen von der Endo I Doppelstrangbrüche im Bakterienchromosom erzeugt werden. Bisherige Untersuchungen zeigten, daß das Enzym bei niedrigen Salzkonzentrationen Doppelstrangbrüche und in Anwesenheit von tRNA bei hohen Salzkonzentrationen ausschließlich Einzelstrangbrüche produziert. Da intrazellulär eine große Menge tRNA vorliegt, eignet sich die Endo I für das Suizidsystem nur dann, wenn tRNA keine Änderung der doppelstrangbrechenden Aktivität bewirkt. Der Einfluß von tRNA und von verschiedenen Salzkonzentrationen auf die Aktivität der Endo I sollte daher untersucht werden. Weiterhin muß die DNase-Funktion des Suizidsystems möglichst stabil sein, damit nach der Induktion eine lang anhaltende nukleolytische Aktivität in den Zellen zu einer effizienten DNA-Degradierung führt. Frühere Untersuchungen zur Stabilität der Endo I wurden bei 100°C durchgeführt (Lehman et al., 1962a). Für eine Eignung der Endo I als Suizidfunktion ist jedoch die Stabilität des Enzyms bei Temperaturen ausschlaggebend, die bei industriellen Produktionsprozessen oder in der Umwelt vorherrschen. Von weiterem Interesse war es, welche Proteinstruktur der Endo I für die Aktivität des Enzyms erforderlich ist. Da Endo I ein periplasmatisches Enzym ist, war es nicht klar, ob die Proteinstruktur auch im Cytoplasma korrekt ausgebildet wird. Insbesondere die Bildung der Disulfidbrücken, die im Periplasma von ganz bestimmten Proteinen katalysiert wird (Bardwell, 1994), könnte im Cytoplasma schwierig sein. Zusätzliche Untersuchungen zur natürlichen Expression des *endA*-Gens sollten Hinweise auf die noch ungeklärte Funktion des Enzyms liefern. Hierfür sollte der mögliche Promoter identifiziert, die Expressionsstärke gemessen und der Verlauf der Enzymproduk-

tion in einer Bakterienkultur bestimmt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Endo I zur Entwicklung eines neuen Suizidsystems bzw. zur Weiterentwicklung bestehender Suizidsysteme angewendet werden. Die kontrollierbare Produktion einer intrazellulären Endo I sollte dadurch erreicht werden, daß der Signalpeptid-kodierende Teil vom *endA*-Gen entfernt und das verkürzte Gen unter die Kontrolle eines regulierbaren Promoters gestellt wird. Fehlt das aminoterminal Signalpeptid, kann Endo I nicht ins Periplasma exportiert werden, und die Bildung eines im Cytoplasma aktiven Enzyms wird möglich. Die Wirksamkeit des Suizidsystems sollte hinsichtlich der Zelltötung und des intrazellulären DNA-Abbaus bestimmt werden. Weiterhin sollte das Entkommen der Zellen vom Tötungsprozeß näher untersucht werden, damit die Wirksamkeit des Suizidsystems gezielt verbessert werden kann. Die Zellen können dem Tötungsprozeß durch Segregation oder Mutation des Suizidsystems dauerhaft entkommen. Die Chance, durch Segregation des plasmidkodierten Suizidsystems zu entkommen, sollte durch den *parB*-locus vom Plasmid R1 minimiert werden, der eine Stabilisierung von Plasmiden in den Zellen bewirkt (Gerdes et al., 1986; Thisted et al., 1994a; 1994b). Außerdem sollte untersucht werden, mit welcher Häufigkeit suizidresistente Mutanten auftreten, um die Bedeutung dieses Entkommens abzuschätzen. Desweiteren können Zellen dem Tötungsprozeß vorübergehend entkommen, wenn die Induktion des Suizidsystems nur zu einer unzureichenden Nuklease-Produktion führt. Dieses Überleben der Zellen sollte durch eine gleichzeitige Produktion der Endo I und der *Serratia*-Nuklease verringert werden. Die RNase-Aktivität der *Serratia*-Nuklease könnte den intrazellulären Inhibitor (RNA) der Endo I degradieren, sodaß schon geringe Nuklease-Mengen tödlich wirken. Außer der Optimierung der Wirksamkeit wurde eine möglichst flexible und einfache Anwendung des Suizidsystems in einem weiten Bereich verschiedener Bakterien beabsichtigt. Hierfür sollten alle Komponenten des Systems in einer Suizidkassette vereinigt und die Wirksamkeit in verschiedenen Gram⁻Bakterien überprüft werden.

3 Material

3.1 Bakterien, Phagen und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Phagen und Plasmide sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Tab. 2: Liste der verwendeten Bakterienstämme und Phagen

Bakterien	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Acinetobacter sp.</i> DSM-Nr. 588 (LO22)	<i>trpE27</i>	DSM, Braunschweig
<i>E. coli</i> K12		
AB1157 (WA234)	<i>argE3 his-64 leuB6 proA2 thr-1 thi-1 ara-14 galK2 lacY1 mtl-1 xyl-5 tsx33 rpsL31 supE44</i>	Howard-Flanders et al., 1966
BT124	GW1100, <i>recA</i> ⁺	B. Thoms, Oldenburg; Kenyon und Walker, 1980
BT125	wie WA234, aber <i>recD1010</i>	B. Thoms, Oldenburg
BT267	wie WA234, aber <i>endA::Km</i> ^R	B. Thoms, Oldenburg
BT281	wie WA234, aber <i>endA::Tc</i> ^R	B. Thoms, Oldenburg
BT297	wie WA234, aber <i>endA::Cm</i> ^R	B. Thoms, Oldenburg
BT333	wie WA234, aber $\Delta endA::Tc$ ^R	Cherepanov und Wackernagel, 1995
DH5 α	($\phi 80\Delta lacZ\Delta M15$) <i>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻m_k⁺)</i>	Hanahan, 1983
TGE900	F' <i>sup</i> ⁺ <i>ilv bio</i> ($\lambda cI857\Delta BamHI$)	Courtney et al., 1984
AB1886 (WA115)	<i>uvrA6 ara xyl mtl gal lacY thr leu pro his argB thi tsx strA supE</i> λ^S	R. Devoret
H520 (WA165)	wie WA115, aber <i>endA</i>	H. Hoffmann-Berling
WA385	wie WA234, aber (r _k ⁻ m _k ⁺)	B. Thoms, Oldenburg
<i>Pseudomonas mendocina</i> DSM-Nr. 50017 ^T (LO215)	Typenstamm	DSM, Braunschweig
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300 (LO179)	Wildtyp	G. Stewart
Phagen		
λ - <i>cI857 sam7</i>		B. Thoms, Oldenburg
λ -vir		R. Devoret

Tab. 3: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pACYC184	Cm ^R , Tc ^R , 4.245 bp, p15A-origen	Chang und Cohen, 1978
pAH12	Ap ^R , 5.225 bp, der für das reife Protein der <i>Serratia</i> -Nuklease kodierende Genbereich (<i>nucΔL</i>) unter Kontrolle des P _L in pSF1E	Ahrenholtz et al., 1994b
pBBR1MCS	Cm ^R , 4.707 bp, broad-host-range Plasmid mit <i>lacZα</i> -multiple cloning site aus pBluescriptII, pBBR1-origen	Kovach et al., 1994
pBBR1MCS-5	Gm ^R , 4.768 bp, Cm ^R in pBBR1MCS durch Gm ^R ersetzt	Kovach et al., 1995
pBluescript II KS+	Ap ^R , 2.961 bp; multicopy copy; pUC-origen	Stratagene, Heidelberg
pBR322	Ap ^R , Tc ^R , 4.361 bp, ColE1-origen	Bolivar et al., 1977
pCP15	Ap ^R , Km ^R , 4.1 kb, pUC-origen	Cherepanov und Wackernagel, 1995
pET81F+	Ap ^R , 2.730 bp, Expressionskassette mit P _{T7Φ10} , Ribosomenbindestelle, Startcodon und Transkriptionsterminator, f1-origen, pUC-origen	Tanhauser et al., 1992
pMJ7	Ap ^R , 4.518 bp, <i>endA</i> -Gen in pBluescript II KS+ inseriert, <i>endA</i> entgegen <i>lacZ</i> orientiert	Jekel und Wackernagel, 1995
pMJ8	wie pMJ7, aber <i>endA</i> wie <i>lacZ</i> orientiert	Jekel und Wackernagel, 1995
pMJ16	Km ^R , 11,1 kb, pSY343 mit inseriertem <i>endA</i>	diese Arbeit
pMJ18	Ap ^R , 3.354 bp, der für das reife Protein der Endo I kodierende Genbereich (<i>endAΔL</i>) unter der Kontrolle des P _{T7Φ10} in pET81F+	diese Arbeit
pMJ20	Ap ^R , 4.921 bp, <i>endAΔL</i> mit T7Φ10-Region unter Kontrolle des P _L in pSF1E	diese Arbeit
pMJ21	Ap ^R , 4.884 bp, <i>endAΔL</i> ohne T7Φ10-Region unter Kontrolle des P _L in pSF1E	diese Arbeit
pMJ22	Ap ^R , 5.547 bp, zweimal <i>endAΔL</i> ohne T7Φ10-Region in Tandemanordnung unter Kontrolle des P _L in pSF1E	diese Arbeit
pMJ24	Ap ^R , 8.485 bp, vermutliche <i>endA</i> -Promotoren in pTL61Ta inseriert, Promotoren wie <i>lacZ</i> orientiert	diese Arbeit
pMJ25	Ap ^R , 9.337 bp, <i>endAΔL</i> vor RNase III-Schnittstelle in pTL61T inseriert, Orientierung des <i>endAΔL</i> identisch mit <i>lacZ</i> -Orientierung	diese Arbeit
pMJ26	Ap ^R , 5.949 bp, <i>endAΔL</i> mit RNase III-Schnittstelle aus pTL61T vor <i>nucΔL</i> in pAH12 inseriert	diese Arbeit
pMJ27a	Km ^R , 4,7 kb, <i>bla</i> des pSF1E durch <i>nptI</i> und <i>hok/sok</i> ersetzt	diese Arbeit
pMJ28a	Km ^R , 5,5 kb, <i>bla</i> des pMJ20 durch <i>nptI</i> und <i>hok/sok</i> ersetzt	diese Arbeit
pMJ29a	Km ^R , 5,8 kb, <i>bla</i> des pAH12 durch <i>nptI</i> und <i>hok/sok</i> ersetzt	diese Arbeit
pMJ30a	Km ^R , 6,5 kb, <i>bla</i> des pMJ26 durch <i>nptI</i> und <i>hok/sok</i> ersetzt	diese Arbeit
pMJ31	Cm ^R , 7.099 bp, <i>cI857</i> und <i>rexA</i> aus λ in pBBR1MCS inseriert, <i>cI857</i> identisch wie <i>lacZα</i> orientiert (pMJ31a: <i>cI857</i> entgegen <i>lacZα</i> orientiert)	diese Arbeit

pMJ32	Tc ^R , 12 kb, <i>cIts</i> -Allel aus λ im Plasmid pRK248 <i>cIts</i> durch <i>cI857</i> und <i>rexA</i> aus λ ersetzt, Orientierung des <i>cI857</i> mit <i>cIts</i> identisch (pMJ32a: <i>cI857</i> im Vergleich zu <i>cIts</i> entgegengesetzt orientiert)	diese Arbeit
pMJ33	Km ^R , 6,5 kb, <i>cI857</i> aus λ in pMJ27a inseriert, <i>cI857</i> identisch wie <i>P_L</i> orientiert (pMJ33a: <i>cI857</i> identisch entgegen <i>P_L</i> orientiert)	diese Arbeit
pMJ34	Km ^R , 6,5 kb, <i>cI857</i> aus λ in pMJ28a inseriert, <i>cI857</i> identisch wie λPL und <i>endAΔL</i> orientiert	diese Arbeit
pMJ35	Km ^R , 6,8 kb, <i>cI857</i> aus λ in pMJ29a inseriert, <i>cI857</i> identisch wie <i>P_L</i> und <i>nucΔL</i> orientiert	diese Arbeit
pMJ36	Km ^R , 7,5 kb, <i>cI857</i> aus λ in pMJ30a inseriert, <i>cI857</i> identisch wie <i>P_L</i> und <i>endAΔL-nucΔL</i> orientiert	diese Arbeit
pMJ39	Km ^R , 7,5 kb, je eine <i>Bam</i> HI- site vor <i>nptI</i> und nach <i>nucΔL</i> in pMJ36 erzeugt	diese Arbeit
pMJ40	Km ^R , Gm ^R , 9,4 kb, Suizidkassette mit <i>P_L</i> , <i>endAΔL-nucΔL</i> , <i>cI857</i> , <i>parB</i> und <i>nptI</i> zwischen <i>lacZα</i> und Gm ^R in pBBR1MCS-5 inseriert, Nuklease-Gene entgegen <i>lacZα</i> orientiert (pMJ40a: Nuklease-Gene identisch wie <i>lacZα</i> orientiert)	diese Arbeit
pMJ41	Km ^R , Gm ^R , 9,4 kb, Suizidkassette mit <i>P_L</i> , <i>endAΔL-nucΔL</i> , <i>cI857</i> , <i>parB</i> und <i>nptI</i> in <i>lacZα</i> von pBBR1MCS-5 inseriert, Nuklease-Gene entgegen <i>lacZα</i> orientiert (pMJ41a: Nuklease-Gene identisch wie <i>lacZα</i> orientiert)	diese Arbeit
pRK248 <i>cIts</i>	Tc ^R , 12 kb, <i>Bg</i> III-Fragment mit <i>cIts</i> -Allel aus λ im Minireplikon des Plasmids RK2 inseriert	Bernard et al., 1979
pSF1E	Ap ^R , 4.149 bp, <i>P_L</i> -Promoter, <i>f1</i> -origin, <i>ColE1</i> -origin	Ahrenholtz et al., 1994b
pSY343	Km ^R , 9,5 kb, Vektor mit Temperatur-induzierbarer runaway-copy-Replikation	Yasuda und Takagi, 1983
pTL61T	Ap ^R , 8.565 bp, multicopy-Vektor mit „multiple cloning site“ vor promoterlosem <i>lacZ</i> , <i>ColE1</i> -origin	Linn und St.Pierre, 1990
pTL61Ta	Ap ^R , 8.485 bp, <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I-Fragment (93% der „multiple cloning site“) in pTL61T deletiert	diese Arbeit

3.2 Medien, Puffer, Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Puffer autoklaviert (121°C, 20 min) oder durch Membranfilter (0,45 μ m, Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert.

Luria-Bertani (LB)-Vollmedium (Miller, 1972) enthielt pro Liter 10 g Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Difco) und 5 g NaCl. LB-Flüssigmedium wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt. LB-Festmedium enthielt pro Liter 15 g Agar (Difco). Antibiotika wurden bei Bedarf nach dem Autoklavieren in

folgenden Konzentrationen hinzugefügt: Ampicillin 100 µg/ml, Tetracyclin 15 µg/ml, Chloramphenicol 15 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Gentamycin 15 µg/ml.

SOC-Vollmedium (Hanahan, 1983) enthielt pro Liter 20 g Bacto-Trypton (Difco), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Difco), 10 mmol NaCl, 2,5 mmol KCl, 10 mmol MgCl₂, 10 mmol MgSO₄, 20 mmol Glukose, und wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

Neutraler Phosphatpuffer zum Verdünnen von Bakteriensuspensionen enthielt pro Liter 7 g Na₂HPO₄ [2 H₂O], 3 g KH₂PO₄, 4 g NaCl und 2 mmol MgSO₄ (Winkler et al., 1976)

STELT-Puffer enthielt 8% Saccharose; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 mg/ml Lysozym; 0,5% Triton X-100.

TBEE-Puffer (Sambrook et al., 1989) enthielt 89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA und 0,25 µg/ml Ethidiumbromid

TE-Puffer (Sambrook et al., 1989) enthielt 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0.

3.3 Enzyme und Chemikalien

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer, Mannheim) wurde zur Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten verwendet.

Klenow-Enzym (Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli.*; Boehringer Mannheim) wurde zum Auffüllen 3'-rezessiver DNA-Enden von doppelsträngigen DNA-Fragmenten eingesetzt.

Lysozym aus Hühnereiweiß (Boehringer, Mannheim) wurde zur Unterstützung der Lyse von Bakterienzellen bei der Plasmidpräparation benutzt.

Mung Bean-Nuklease (Eurogentec, Seraing; Belgien) wurde zur Entfernung von einzelsträngigen Enden in doppelsträngigen DNA-Fragmenten verwendet.

Restriktionsendonukleasen von Eurogentec (Seraing, Belgien), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Bad Schwalbach) wurden nach Empfehlung der Hersteller eingesetzt.

T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Bad Schwalbach) wurde zur Ligation doppelsträngiger DNA nach Sambrook et al. (1989) verwendet.

Thermosequenase (Amersham Buchler, Braunschweig) wurde zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA nach Vorschrift des „GATC-Biocyte Sequencing Kit“ (GATC, Konstanz) eingesetzt.

RNaseA aus Rinderpankreas (Sigma, Deisenhofen) wurde nach Sambrook et al. (1989) verwendet.

4 Methoden

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung von Bakterien aerob in LB-Vollmedium (LB) bei 37°C, und alle Zentrifugationen wurden in einer Sorvall RC-5B-Zentrifuge (Du Pont, Bad Nauheim) oder 5417R-Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg) bei 4°C durchgeführt.

4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen oder Transformationen wurde aus Zellen von *endA*-Mutanten nach der „Rapid boiling“-Methode (Holmes und Quigley, 1981) isoliert. Hierzu wurden die Zellen in 110 µl STELT-Puffer suspendiert, 40 sec gekocht, und nach 1 min in Eis für 15 min zentrifugiert. Das Sediment wurde entfernt und der Überstand mit 110 µl Isopropanol vermischt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei RT wurde das Präzipitat mit Ethanol (70%) gespült, luftgetrocknet und in 20 µl TE aufgenommen. Aus Zellen, die Endo I oder *Serratia*-Nuklease in relativ geringen Mengen produzierten, wurde DNA mit dem „QSQ Mini-prep Kit“ (Mobitec, Göttingen) isoliert. Zur Präparation großer Mengen Plasmid-DNA für Klonierungen oder als Substrat für den Endonuklease-Test (4.13) wurde das „Qiagen Plasmid Kit“ (Diagen, Düsseldorf) verwendet. Diese Methode eignete sich zur Isolierung von DNA aus Zellen, die keine oder nur geringe Mengen DNasen (z. B. bei reprimiertem Suizidsystem) produzierten.

4.2 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Klonierung oder Analyse von Schnittstellen wurde DNA mit Restriktionsendonukleasen, wie von Sambrook et al. (1989) beschrieben, und unter Berücksichtigung der Herstellerempfehlungen behandelt.

4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente oder verschiedener Zustandsformen von Plasmidmolekülen erfolgte in horizontalen Gelen mit angemessener Agarosekonzentration (Sambrook et al., 1989). Die Elektrophorese wurde in TBEE bei 4°C und einer Spannung von 40-120 V durchgeführt. Zur Ermittlung von DNA-Mengen und der Länge von DNA-Fragmenten wurden bestimmte Mengen mit *Hind*III behandelte λ -DNA als Standard verwendet. Die Gele wurden mit dem Videosystem „E.A.S.Y. Image plus“ (Herolab, Wiesloch) dokumentiert und ausgewertet.

4.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Sambrook et al. (1989).

4.4.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der vollständigen Restriktion der DNA wurden die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt, und die zu klonierende DNA wurde herausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus dem Agaroseblock wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Diagen, Düsseldorf) verwendet. Die eluierte DNA wurde durch eine Ethanol-Präzipitation konzentriert (Sambrook et al., 1989) und schließlich in 5 µl H₂O gelöst.

4.4.2 Beseitigung von überstehenden DNA-Enden

Wenn nicht anders angegeben, wurden Einzelstrangüberhänge an den DNA-Enden mit MungBean-Nuklease entfernt. Hierzu wurde die DNA in 10 mM NaCH₃COOH pH 5,0, 0,1 mM Zn(CH₃COOH)₂, 100 mM NaCl und 5% Glycerin mit einer Konzentration von 0,05 - 0,1 µg/µl gelöst und mit 25 EE MungBean-Nuklease (Eurogentec, Seraing, Belgien) für 30 min bei 30°C inkubiert. War der Erhalt der Sequenz im Einzelstrangüberhang erforderlich, dann wurden 3'-recessive DNA-Enden mit dem Klenow Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* aufgefüllt. Hierzu wurde restringierte DNA in 50 µl Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, je 0,25 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP) gelöst und mit 2 EE Klenow-Enzym (Boehringer, Mannheim) für 30 min bei 37°C inkubiert. Folgte nach der Beseitigung der überstehenden Enden eine Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel, wurden die Enzyme nicht inaktiviert. Andernfalls wurde nach der Inkubation zu je 50 µl Reaktionsansatz 2,5 µl Tris-HCl pH 9,5, 5 µl 8 M LiCl und 2 µl 10% SDS gegeben. Anschließend wurde die DNA, wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben, mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, mit Ethanol gefällt und in 5 µl H₂O gelöst.

4.4.3 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Die 5'-Phosphat-Gruppe der Vektor-DNA wurde durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase entfernt, damit bei einer intermolekularen Ligation die Rezirkularisierung des Vektors verhindert wird. Die DNA (max. 5 µg) wurde in 100 µl Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH 8,5) gelöst und mit 20 EE Alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim) mind. 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch

Zugabe von 0,2 Vol. 100 mM EGTA pH 8,0 und Inkubation für 10 min bei 75°C beendet. Anschließend wurde die DNA extrahiert (s. 4.4.2), gefällt und in 5 µl H₂O gelöst.

4.4.4 Ligation von DNA

Die Berechnung der zur Ligation eingesetzten DNA-Mengen erfolgte nach Empfehlung von Legerski und Robberson (1985), und die Ligationsreaktion wurde nach der Methode von Rusche und Howard-Flanders (1985) durchgeführt. In einem Volumen von 10 µl wurde die DNA mit 2.000 EE T4-Ligase (Biolabs, Schwalbach) in Gegenwart von 66 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgSO₄, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM ATP und 1 mM Hexamin-Kobalt(III)-Chlorid zunächst 30 min bei RT stengelassen. Dann wurde KCl hinzugegeben (30 mM Endkonzentration) und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit Alkohol gefällt (Sambrook et al., 1989) und in 10 µl TE gelöst. Davon wurden 1-3 µl zur Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt.

4.5 Transformation von Bakterien

Zellen von *E. coli* wurden, wie von Dower et al. (1988) beschrieben, präpariert und durch Elektroporation transformiert. Zellen von LO22, LO179 und LO215 wurden für die Elektroporation nach Pemberton und Penfold (1992) präpariert. Die Elektroporation erfolgte durch einen einmaligen Puls (25 µF, 200 W, 12,5 kV/cm) mit einem Gene Pulser (Bio-Rad, München). Zur Expression der Antibiotikum-Resistenz wurden die Zellen in 1 ml SOC-Vollmedium 1 h bei 37°C inkubiert. Die Expression in Zellen mit thermoinduzierbarem Suizidsystem erfolgte für 1,5 h bei 28°C.

4.6 Sequenzierung von DNA

Die Nukleotidsequenz von Plasmid-DNA wurde nichtradioaktiv mit dem „GATC-Biocyte Sequencing Kit“ (GATC, Konstanz) und der „ThermoSequenase“ (Amersham Buchler, Braunschweig) nach dem Prinzip von Sanger et al. (1977) ermittelt. Die Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit einem „GATC 1500 Direct Blotting Electrophoresis Long Run DNA Sequencer“ und entsprechendem Detektionszubehör (GATC, Konstanz) nach den Herstellerangaben.

4.7 Gerichtete ortsspezifische Mutagenese

Die gerichtete Änderung der Nukleotidsequenz an einem bestimmten Ort der DNA er-

folgte mit dem „Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) nach den Herstellerangaben. Die Primer mit der gewünschten Sequenzveränderung wurden von Interactiva (Ulm) synthetisiert und gereinigt. Zur Amplifizierung der veränderten DNA wurde ein „DNA Thermal Cycler 480“ (Perkin Elmer, Norwalk, USA) verwendet.

4.8 Freisetzung der Endonuklease I aus dem Periplasma von *E. coli*

Wenn nicht anders erwähnt, dann wurde Endo I im wesentlichen nach der Methode von Ananthaswamy (1977) aus dem Periplasma von *E. coli* ins Umgebungsmedium freigesetzt. Hierzu wurden Zellen 6 min bei 8.000 x g und 20°C sedimentiert. Nach möglichst vollständiger Entfernung der Mediumsreste wurden die Zellen in 1 Vol. eiskaltem Kälteschockpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 7,4, 0,2 M KCl) suspendiert. Bei Bedarf wurde die Endo I durch Suspendieren der Zellen in nur 0,1-0,01 Vol. Kälteschockpuffer konzentriert. Nach der Inkubation für 90 min auf Eis wurden die Zellen 10 min bei 12.000 x g sedimentiert. Der Überstand mit der Endo I wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

Zur Freisetzung sämtlicher periplasmatischer Proteine wurden *E. coli*-Zellen nach Randall und Hardy (1986) mit Lysozym und EDTA behandelt. Eine Konzentrierung der freigesetzten Proteine erfolgte auf gleiche Weise wie bei der Kälteschock-Methode.

4.9 Reinigung der Endonuklease I von *E. coli*

Die Endonuklease I wurde aus dem Periplasma des überproduzierenden *E. coli*-Stammes WA165 pMJ16 freigesetzt und mit einer modifizierten Methode von Lehman et al. (1962a) gereinigt. Die Zellen wurden in 1,5 l LB-Vollmedium bei 30°C bis zu einem Titer von 1×10^8 Zellen/ml vermehrt und dann weitere 6 h bei 37°C inkubiert, um die „runaway copy“-Replikation des Plasmides zu induzieren. Die Freisetzung der Endo I erfolgte durch Kälteschock (s. 4.8), wobei die Endo I fünfzigfach konzentriert wurde. Zum Kälteschocküberstand wurde RNase A (Endkonzentration 0,5 mg/ml) gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte auf Eis bzw. bei 4°C.

Der Endo I-Rohextrakt wurde gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 dialysiert und 10 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 äquilibrierte DEAE-Zellulose-Säule (1,3 cm x 4 cm) gegeben und mit gleichem Puffer gespült, bis im Durchfluß die Absorption bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreicht hatte. Die Kaliumphosphat-Konzentration des Durchflusses wurde auf 35 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 eingestellt. Der Durchfluß wurde gefiltert (0,45 µm) und auf eine „CM-Econopac“-Säule (5 ml, Biorad München) ge-

geben, die zuvor mit 40 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 äquilibriert worden ist. Die Säule wurde wie die DEAE-Säule mit Äquilibrationpuffer gespült, und anschließend

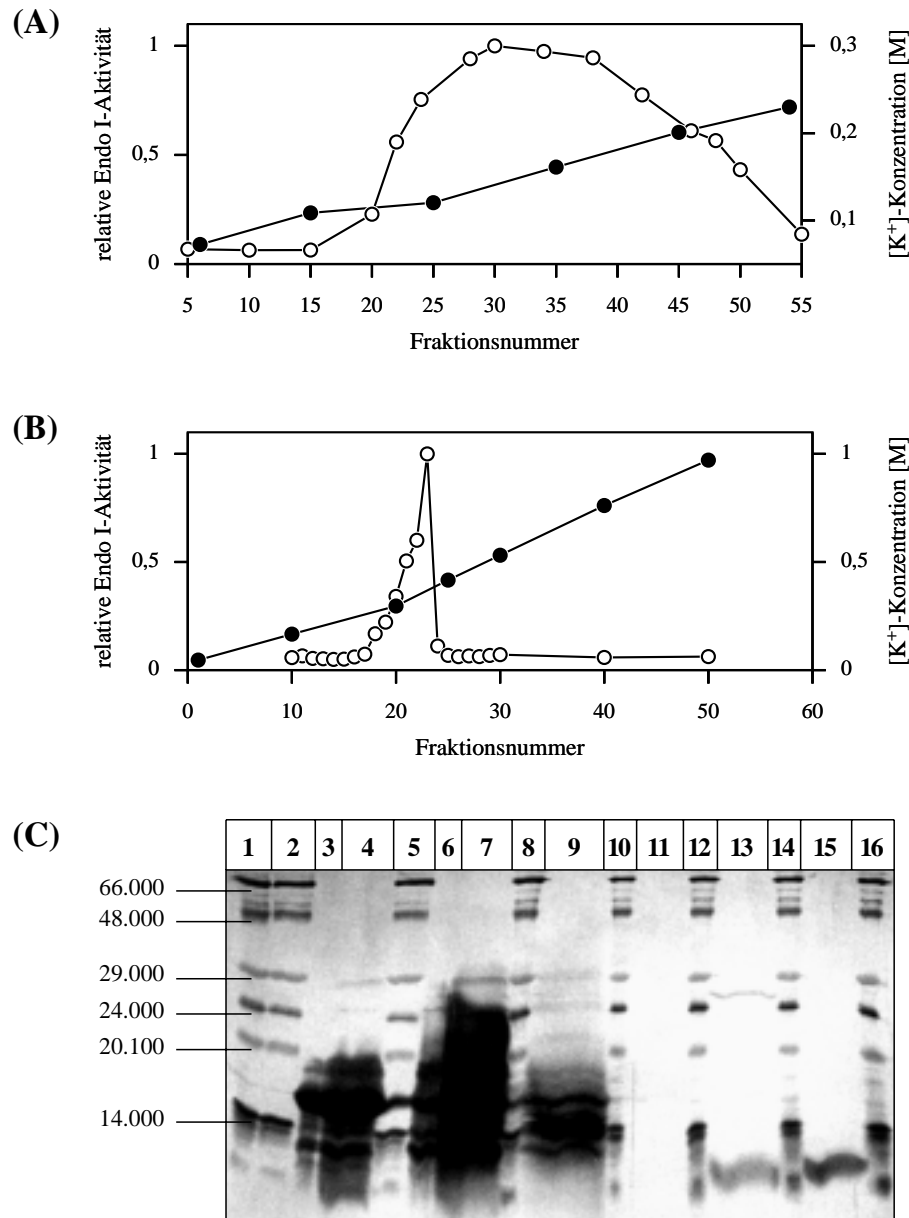


Abb. 1: CM-Chromatographie der Endo I. (A) Erste Elution mit linearem Kaliumphosphatpuffer-Gradienten (40-200 mM; pH7,4) (B) Zweite Elution mit linearem KCl-Gradient (0 - 1 M KCl in 20 mM Kaliumphosphatpuffer; pH 7,4); -O- : relative Endo I-Aktivität in den Fraktionen; -●- : $[K^+]$ -Konzentration in den Fraktionen; (C) Die Fraktionen mit der höchsten Endo I-Aktivität und angrenzende Fraktionen wurden jeweils vereinigt und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (4.9). Spur 1, 2, 5, 8, 10, 12, 14, 16: Molekulargewichtsstandards BSA ($M_r = 66.000$), Ovalbumin ($M_r = 48.000$), Carboanhydrase ($M_r = 29.000$), Trypsinogen ($M_r = 24.000$), Trypsininhibitor ($M_r = 20.100$), Lactalbumin ($M_r = 14.000$); Spur 3 - 9: vereinigte Fraktionen aus (A); Spur 11 - 15: vereinigte Fraktionen aus (B). 3, 4: Fraktion 20 - 25, 0,01 Vol. bzw. 0,1 Vol.; 6, 7: Fraktion 26 - 39, 0,01 Vol. bzw. 0,1 Vol.; 9: Fraktion 40 - 45, 0,25 Vol.; 11: Fraktion 16 - 18, 0,25 Vol.; 13: Fraktion 19 - 23, 0,25 Vol.; 15: Fraktion 24 - 25, 0,25 Vol.

wurde das adsorbierte Protein mit zwei verschiedenen Gradienten nacheinander eluiert. Es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt, in denen die Endo I durch Messung der endonukleolytischen Aktivität (s. 4.13) identifiziert wurde. Die Konzentration der $[K]^+$ -Ionen in den Fractionen wurde durch Leitfähigkeitsmessung ermittelt. Die Elutionsprofile der beiden Gradienten sind in Abb. 1A und 1B dargestellt. Die erste Elution erfolgte nach Lehman et al. (1962a) mit einem linearen Gradienten von 40-200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Der größte Teil der Endo I-Aktivität befand sich in den Fractionen 26-38 bei einer $[K^+]$ -Konzentration von 155-190 mM. Da kein scharf abgegrenzter Endo I-„Peak“ entstand, und die Ausbeute gering war (s. 5.2.1, Tab. 6), wurde die Säule mit 10 Vol. 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gespült und noch gebundene Endo I mit einem linearen Gradienten von 0-1 M KCl im gleichen Puffer eluiert. Der größte Teil der Endo I-Aktivität eluierte dann bei 265-345 mM $[K^+]$ (Fractionen 19-23). Die Fractionen mit der höchsten Endo I-Aktivität und die flankierenden Fractionen wurden jeweils vereinigt, und zweimal gegen 10 mM Tris-HCl pH 7,4 dialysiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 20.000 x g wurde der Überstand gefriergetrocknet und in 0,1 ml H₂O gelöst. Ein Teil jeder Proteinfraction wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 1C) und der Rest bei -20°C gelagert.

4.10 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in Lösungen wurde mit einem „Protein Assay Kit“ (Bio-Rad, München) nach dem von Bradford (1976) beschriebenen Prinzip bestimmt. Eine mit BSA erstellte Eichkurve wurde hierfür als Vergleichsstandard verwendet. Lagen die Proteingehalte unterhalb der Detektionsgrenze, wurden die Proben vor der Proteinbestimmung in Microcon-Ultrafiltrationseinheiten (Amicon, Witten) mit einer Ausschlußgröße von $M_r = 10.000$ konzentriert.

4.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von SDS-denaturierten Proteinen erfolgte in Polyacrylamid-Gelen (5% Sammelgel, 15% Trenngel) nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode. Die Proteine wurden anschließend mit dem „Silver Stain Kit“ (Bio-Rad, München) gefärbt. Die Detektionsgrenze beträgt nach Herstellerangaben ca. 0,1 ng/mm². Die gefärbten Gele wurden mit dem Videosystem „E.A.S.Y. Image plus“ (Herolab, Wiesloch) dokumentiert, und die relativen Mengen der aufgetrennten Proteine in einer Probe wurden densitometrisch bestimmt.

4.12 Sequenzierung von Polypeptiden

Die Aminosäuresequenz von Polypeptiden wurde nach Thole und Jungblut (1994) durchgeführt. Die Proteinprobe wurde zunächst in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Dann wurde die Sequenz vom aminoterminalen Proteinende nach dem Prinzip von Edman und Begg (1967) mit einem „477A Protein Sequencer“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) ermittelt.

4.13 Quantifizierung der endonukleolytischen Aktivität

Der Standardreaktionsansatz (10 μ l) zur Quantifizierung der endonukleolytischen Aktivität enthielt 100 ng superhelikale pSY343-DNA ($9,6 \times 10^9$ Moleküle), 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 4,5 mM MgSO₄ und 1 μ l in Kälteschockpuffer (0,1 M Tris-HCl pH 7,4, 0,2 M KCl) verdünntes Enzym. Bei Bedarf wurde die NaCl-Konzentration oder die Enzymmenge erhöht, oder es wurde tRNA aus *E. coli* MRE600 (20 μ g/ml, Boehringer, Mannheim) oder BSA (40 μ g/ml, DNase-frei, Eurogentec, Seraing, Belgien) hinzugegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Enzymverdünnungen 30 min bei 37°C mit 40 μ g/ml RNase A (DNase-frei, Qiagen, Düsseldorf) vorbehandelt, um die Aktivität der RNA-freien Endo I zu messen. Sollte der Einfluß von RNA auf die Endo I-Aktivität untersucht werden, fand keine Vorbehandlung statt.

Die Enzymreaktion wurde nach 30 min bei 37°C durch Kühlung auf 0°C und der Zugabe von 0,2 Vol. Stopplösung (15% Ficoll 400, 0,025% Bromphenolblau, 0,2 M EDTA pH 8.0) beendet. Nach 5 min bei 65°C wurde die DNA in einem 0,4% Agarosegel über Nacht bei 2 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde mit dem Videosystem „E.A.S.Y. Image plus“ (Herolab, Wiesloch) dokumentiert und ausgewertet. Zur Bestimmung der DNA-Mengen in den Banden wurden pro Gel zwei unterschiedlich lang integrierte Bilder erzeugt. Ein Bild ohne Überbelichtung wurde zur Quantifizierung im Bereich 15-100 ng DNA/Bande verwendet. Im anderen Bild waren Banden mit mehr als 15 ng DNA zwar überbelichtet, dafür konnten aber DNA-Mengen von 1-15 ng exakt quantifiziert werden. Für die DNA-Bestimmung wurde *Hind*III-restringierte λ -DNA (73 ng, 145 ng, 218 ng, 290 ng) als Standard verwendet. Da in superhelikale DNA (cccDNA) weniger Ethidiumbromid interkaliert als in lineare DNA (linDNA) oder relaxierte DNA (ocDNA), mußte zur Quantifizierung der cccDNA ein Korrekturfaktor bestimmt werden. Hierzu wurde 100 ng unbehandelte pSY343-DNA (unb) und 100 ng mit *Eco*RI linearisiertes Plasmid (Eco) in jedem Gel aufgetrennt. Der Korrekturfaktor wurde folgendermaßen ermittelt: $(\text{linDNA}_{\text{Eco}}\text{-ocDNA}_{\text{unb}}) \times (\text{cccDNA}_{\text{unb}})^{-1}$.

Für die Berechnung der Enzymeinheiten (EE) wurde eine von Hecht und Thielmann

(1978) beschriebene Methode angewendet. Da Endo I die DNA sequenzspezifisch spaltet (Lehman et al. 1962a) und die Spaltungsereignisse unabhängig voneinander sind, wird eine Poisson-Verteilung der enzymkatalysierten Strangbrüche auf die Substrat-Moleküle erwartet. In diesem Fall kann mit dem relativen Anteil ungebrochener DNA-Moleküle ($\text{cccDNA}/\text{gesamte DNA} = \alpha$) die durchschnittliche Anzahl der Strangbrüche pro DNA-Molekül (N) berechnet werden ($N = -\ln\alpha$). Zur Berechnung der enzymkatalysierten Strangbrüche wurden die Strangbrüche, die schon im Ausgangssubstrat vorhanden waren (N_0) von den Strangbrüchen nach der Enzymeinwirkung subtrahiert. Die Aktivität, die in einer Stunde bei 37°C durchschnittlich einen Strangbruch pro superhelikales DNA-Molekül erzeugt (entsprechend der Plasmid-Moleküle im Testansatz ca. 1×10^{10} Strangbrüche), wurde als eine Enzymeinheit (EE) definiert. Mit Zunahme von N steigt die Häufigkeit, daß ein Reaktionsprodukt erneut gespalten wird. Die Produkte einer mehrfachen endonukleolytischen Spaltung werden mit dem Testsystem jedoch nicht erfaßt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurden daher nur solche Enzymverdünnungen berücksichtigt, nach deren Einwirkung insgesamt noch mind. 80% der ursprünglich eingesetzten Substratmenge als cccDNA, linDNA und ocDNA vorlagen ($0,1 < N < 0,3$). Mit dieser Methode kann die DNA-doppelstrangbrechende (dsb) und die DNA-einzelstrangbrechende Aktivität (ssb) in einem Endonuklease-Testansatz getrennt quantifiziert werden:

$$EE_{\text{dsb}} = (N_{\text{dsb}} - N_{0\text{dsb}}) \times F \times (h_{37^\circ\text{C}})^{-1};$$

$$EE_{\text{ssb}} = (N_{\text{ssb}} - N_{0\text{ssb}}) \times F \times (h_{37^\circ\text{C}})^{-1}.$$

Dabei ist F der Verdünnungsfaktor der Enzymprobe. Sollte die endonukleolytische Aktivität in verschiedenen Zellen miteinander verglichen werden, dann wurden die EE auf einen Standard von 10^8 aufgearbeiteten Zellen korrigiert.

4.14 De- und Renaturierung der Endonuklease I-Aktivität

Endonuklease I wurde durch Kälteschock aus dem Periplasma freigesetzt (s. 4.8). Der Kälteschocküberstand wurde gegen 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂ pH 7,4 bei 4°C dialysiert und 15 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Zu jeweils gleichen Teilen des Überstandes wurde 1 Vol. 4% SDS, 1 Vol. 4% SDS/10% β-Mercaptoethanol oder 1 Vol. H₂O gegeben und 50 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann 4 Tage bei 30°C gegen den oben genannten Puffer dialysiert, wobei jeweils nach 5 h und 19 h ein Pufferwechsel erfolgte. Nach der Dialyse wurden die Proben nochmals 24 h bei 30°C inkubiert und dann 48 h auf Eis gelagert. Die endonukleolytische Aktivität in den Proben wurde vor - bzw. nach der Denaturierung fortlaufend gemessen (s. 4.13).

4.15 Bestimmung des Zellüberlebens nach Induktion der Suizidsysteme

Von Klonen des zu untersuchenden Stammes wurde auf LB mit Antibiotikum eine Vorkultur ca. 24 h bei 28°C inkubiert. Parallel dazu wurde ein Ausstrich bei 42°C inkubiert, um die Thermosensibilität des Klons zu kontrollieren. Die Zellen der Vorkultur wurden in 20 ml LB-Vollmedium bei 28°C vermehrt, bis nach zwei Generationen der Titer ca. 2×10^8 Zellen/ml betrug. Die Kultur wurde geteilt und je eine Hälfte bei 28°C bzw. 42°C (Thermoinduktion) weiter inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde der Titer koloniebildungsfähiger Zellen (Lebendtiter) durch Ausplattieren der Zellen auf LB mit Antibiotikum und Inkubation für 24 h bei 28°C bestimmt. Das Überleben (N/N_0) ergibt sich aus dem Quotienten des Lebendtiters zum Zeitpunkt seit dem Induktionsbeginn (N) und dem Lebendtiter der Kultur unmittelbar vor der Induktion (N_0).

4.16 Bestimmung der intrazellulären Degradierung von DNA

Die Bestimmung der Degradierung von zellulärer DNA in säurelösliche DNA-Fragmente (≤ 16 bp) erfolgte nach Ahrenholtz et al. (1994b). Die Induktion von Suizidsystemen erfolgte dabei generell durch Inkubation für 60 min bei 42°C.

4.17 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die β -Galaktosidase-Aktivität in *E. coli*-Zellen wurde nach Kenyon et al. (1982) bestimmt.

4.18 Bestimmung der UV-Sensibilität von *E. coli*

Eine Zellsuspension (ca. 4×10^7 Zellen/ml) des zu untersuchenden Stammes wurde auf LB plattiert. Die Zellen wurden in Intervallen von 5 bzw. 10 sec mit UV-Licht (ca. $1,8 \text{ J/m}^2 \times \text{s}^{-1}$; Thoms und Wackernagel, 1982) bestrahlt und 24-48 h inkubiert. Die Koloniebildungsfähigkeit wurde mit parallel bestrahlten Zellen von WA234 ($recA^+$, UV-resistent) und DH5a ($recA$, UV-sensibel) verglichen.

4.19 Extraktion von Zellen durch Ultraschallbehandlung

Die Zellen wurden zunächst im Kulturmedium bei -20°C eingefroren und erst kurz vor der Ultraschallbehandlung langsam aufgetaut. Die folgenden Schritte erfolgten bei 0°C.

In einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde 0,5 ml der Kultur mit einem Branson Sonifier (Modell 250; Mikrospitze 3 mm; Output-Control Stufe 3; Duty-Cycle 50%) in 10 sec-Intervallen insgesamt 1 min lang bei 0°C beschallt. Zwischen den Beschallungsintervallen wurde die Probe jeweils 2 min gekühlt. Das Lysat der Zellen wurde 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Die Endonuklease-Aktivität im Überstand wurde sofort bestimmt (s. 4.13) und der Rest des Extraktes bei -20°C gelagert.

4.20 Bestimmung der Stabilität von Suizidplasmiden in *E. coli*

Die Zellen einer Einzelkolonie von einem thermosensiblen Klon wurden in 10 ml LB suspendiert und 24 h bei 28°C inkubiert. Dann wurde 10 ml frisches LB mit dieser Übernachtskultur auf einen Titer von 10^4 Zellen/ml (N_0) angeimpft und wiederum 24 h bei 28°C inkubiert. Diese Überimpfung wurde mehrfach wiederholt. Der Titer (N) wurde nach jeder Inkubation mikroskopisch bestimmt und die Anzahl der Generationen (n) in der Kultur berechnet [$n = (\log N - \log N_0) \times (\log 2)^{-1}$]. Zur Bestimmung des Anteils thermoresistenter Zellen an allen vermehrungsfähigen Zellen wurde die Kultur parallel auf LB plattiert und bei 28°C bzw. 42°C inkubiert. Die thermoresistenten Klone, die bei 42°C Kolonien bildeten, wurden anschließend überprüft, ob sie noch ein Plasmid besitzen. Hierzu wurden die Zellen parallel auf LB mit bzw. ohne Antibiotikum ausgestrichen, und es wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt.

4.21 Überprüfung der Thermosensibilität vom CI857-Repressor aus λ

Suspensionen der Phagenmutanten λ -vir und λ -cI857 sam7 (ca. 5×10^5 pfu/ml) wurden parallel auf einer LB-Platte ausgestrichen. Anschließend wurden Suspensionen stationärer Zellen (ca. 10^9 Zellen/ml) auf beide Phagensorten gegeben. Parallel beimpfte Platten wurde 24 h bei 28°C bzw. 42°C inkubiert. Besitzen die Zellen ein intaktes cI857-Allel, vermehrt sich λ -cI857 zwar bei 42°, aber nicht bei 28°C. Findet bei 42° ebenfalls keine Vermehrung statt, ist der Repressor nicht thermolabil. Werden die Zellen von λ -cI857 immer lysiert, dann wird kein aktiver Repressor gebildet. Die Infektion mit λ -vir dient zur Kontrolle, ob eine Infektion mit dem Phagen überhaupt möglich ist. Diese Phagenmutante vermehrt sich auch in Zellen, die einen CI-Repressor produzieren. Werden Zellen von λ -vir nicht lysiert, dann sind sie gegen eine λ -Infektion resistent.

4.22 Fluktuationstest

Zur Bestimmung der Rate suizidresistenter Mutanten wurden Fluktuationstests, wie von Knudsen und Karlström (1991) beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurden 24 Kulturen eines thermosensiblen Klons (0,2 ml LB mit Antibiotikum; ca. 500 Zellen/ml) bis zu einem angemessenen Titer (5×10^5 - 5×10^8 Zellen/ml) bei 28°C inkubiert. Dann wurden 4 Kulturen verdünnt und zur Bestimmung des Lebendtiters auf LB mit Antibiotikum bei 28°C über Nacht inkubiert. Die restlichen 20 Kulturen wurden vollständig auf LB mit Antibiotikum plattiert und zur Identifizierung suizidresistenter Mutanten bei 42°C inkubiert. Die Mutation wurde durch parallele Inkubation der Zellen für 24 h bei 28°C bzw. 42°C überprüft. Die Häufigkeit suizidresistenter Mutanten pro Zelle und Generation (R) kann aus dem Anteil mutantenfreier Kulturen (P_0) und der durchschnittlichen Zahl koloniebildungsfähiger Zellen (N) bestimmt werden: $R = -\ln 2 \times \ln P_0 \times N^{-1}$.

5 Ergebnisse

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Konstruktion eines Systems, das den steuerbaren Selbstmord von Bakterien durch intrazelluläre Degradierung der DNA in biologisch inaktive Bruchstücke ermöglicht. Aus folgenden Gründen wurde hierfür die Endonuklease I von *E. coli* (Endo I) gewählt: 1. Das Enzym kann hochmolekulare DNA sequenzunspezifisch in Oligonukleotide spalten (Lehman et al., 1962a). 2. Weil das Suizidsystem für *E. coli* entwickelt werden sollte, ist die Verwendung des arteigenen Proteins vorteilhaft. Probleme, die eventuell bei der Produktion aktiver Enzyme aus anderen Organismen auftreten (z. B. durch unterschiedlichen Kodongebrauch oder bestimmte posttranslationale Modifikationen), können dadurch vermieden werden. 3. Aufgrund der Inhibierbarkeit von Endo I durch RNA wurde erwartet, daß die in uninduzierten Zellen basal produzierte Enzymmenge nicht toxisch wirkt. 4. Das Gen der Endo I (*endA*) lag kloniert und sequenziert vor (Jekel und Wackernagel, 1995).

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Endo I biochemisch und genetisch charakterisiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der *endA*-Bereich entfernt, der für das Signalpeptid kodiert. Zur Konstruktion eines aktiven Suizidsystems wurde das verkürzte Gen (*endAΔL*), das nun ein intrazelluläres Enzym kodiert, allein oder in Kombination mit dem entsprechend veränderten Gen der extrazellulären Nuklease von *Serratia marcescens* (*nucΔL*; Ahrenholtz et al. 1994b) einer thermisch induzierbaren Expressionskontrolle unterstellt. Nachfolgend wurden die Suizidsysteme für den technischen Einsatz weiterentwickelt und optimiert.

Die Endonuklease I von *Escherichia coli*

5.1 Überproduktion und Defizienz der Endo I in *E. coli*

Die zelluläre Funktion der Endo I ist ungeklärt. Alle bisherigen Untersuchungen mit *endA*-Punktmutanten ergaben, daß das Enzym offenbar nicht essentiell für die Zelle ist, da bei diesen Mutanten kein Defizienzphänotyp erkennbar war (Dürwald und Hoffmann-Berling, 1968). Im folgenden wurde mit einem sehr empfindlichen Endonuklease-Test in der sehr häufig verwendeten *endA1*-Punktmutante eine Endo I-Restaktivität festgestellt. Daraufhin wurden Mutanten erzeugt, bei denen keine Endo I-Aktivität im Periplasma nachweisbar ist. Außerdem wurde das *endA*-Gen in Plasmide mit hoher Kopiezahl kloniert, um den Verlauf und die Auswirkung einer Endo I-Überproduktion untersuchen zu können.

5.1.1 Überproduktion der Endo I durch Erhöhung der *endA*-Kopiezahl in *E. coli*

Das *endA*-Gen befindet sich auf einem chromosomalen *Hind*III-DNA-Fragment, das in das Phagemid pBluescript (Stratagene) kloniert und vollständig sequenziert wurde (Jekel und Wackernagel, 1995). Das Gen ist in dem Plasmid entweder in entgegengesetzter Richtung des *lac*-Promoters (P_{lac}) inseriert (pMJ7), oder die Orientierungen sind identisch (pMJ8). Zur Bestimmung der Endo I-Überproduktion wurde die Enzymaktivität in Kälteschocküberständen der log-Kulturen von WA115 (*endA*⁺), WA165 (*endA*), WA165 pBluescript KS⁺, WA165 pMJ7 und WA165 pMJ8 quantifiziert. Die Generationszeit in der Mitte der log-Phase wurde mit dem mikroskopisch verfolgten Zelltiter berechnet. Das Ergebnis ist in Tab. 4 dargestellt.

Im Kälteschocküberstand des Stammes WA165, der eine undefinierte *endA*-Mutation besitzt (Dürwald und Hoffmann-Berling, 1968), und im Überstand von WA165 pBluescript (Vektor) war keine endonukleolytische Aktivität nachweisbar. Im Extrakt von

Tab. 4: Vermehrungsgeschwindigkeit von *E. coli*-Zellen mit unterschiedlicher Endo I-Produktion

Stamm	relevanter Genotyp	relative Endo I-Aktivität ^a	Generationszeit bei 37°C [min] ^b
WA115	<i>endA</i> ⁺	1	20 [±4]
WA165	<i>endA</i>	n. d. ^c	
WA165 [pBlue]	<i>endA</i> [pBluescript KS ⁺]	n. d. ^c	22 [±4]
WA165 [pMJ7]	<i>endA</i> [pBlue:: <i>endA</i> ⁺]	23	25 [±4]
WA165 [pMJ8]	<i>endA</i> [pBlue:: <i>endA</i> ⁺]	108	24 [±4]
WA165 [pSY343]	<i>endA</i> [pSY343]	n. d. ^c	
WA165 [pMJ16]	<i>endA</i> [pSY343:: <i>endA</i> ⁺]	175 ^d	
WA234	<i>endA</i> ⁺	1	27[±5]
DH5α	<i>endA</i> 1	0,001	
BT267	<i>endA</i> ::Km ^R	n. d. ^c	29[±1]
BT281	<i>endA</i> ::Tc ^R	n. d. ^c	
BT297	<i>endA</i> ::Cm ^R	n. d. ^c	
BT333	Δ <i>endA</i> ::Tc ^R	n. d. ^c	23[±1]

^a Die Endo I-Aktivität im Kälteschocküberstand von Zellen der exponentiellen Wachstumsphase (s. 4.8) wurde, wie in 4.13 beschrieben, quantifiziert. Die Endo I-Aktivität [EE_{dsb}] von 10⁸ Zellen ist relativ zur Aktivität des *endA*-Wildtyps (280 EE_{dsb}/10⁸Zellen) angegeben.

^b Verdopplungszeit von Zellen, die sich in LB-Vollmedium exponentiell vermehren. Es ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung (in Klammern) dargestellt.

^c nicht detektierbar: unterhalb der Nachweisgrenze von 5 x 10⁻⁵ EE_{dsb}/10⁸Zellen

^d 5 h nach Induktion der „runaway-copy“-Replikation

WA165 pMJ7 war die Endonuklease-Aktivität dreiundzwanzigfach höher als im Kälteschocküberstand des entsprechenden *endA*-Wildtyps (WA115). Dies zeigt, daß Endo I vom *endA*-Gen kodiert wird und die einzige durch Kälteschock freisetzbare Endonuklease in *E. coli* ist. Mit pMJ8 war die Endo I-Produktion fünfmal größer als mit pMJ7. Offenbar findet bei identischer Transkriptionsrichtung des *endA* und P_{lac} (pMJ8) eine höhere Endo I-Produktion als bei entgegengesetzter Transkription (pMJ7) statt.

Die Induktion des P_{lac} in WA165 pMJ8 durch 5 mM IPTG im Medium führte zu keiner weiteren Erhöhung der Endo I-Produktion. Auch im Kälteschocküberstand der *lacI*-Mutante DH5 α pMJ8, in der aufgrund des defekten Repressors eine konstitutive Expression der P_{lac} -kontrollierten Gene erfolgt, war die Enzymkonzentration nicht höher als im uninduzierten WA165 pMJ8. Da im Chromosom der Zellen von WA165 pMJ8 nur eine Kopie des Repressor-Gens vorhanden ist, kann die gebildete Repressormenge wahrscheinlich die zahlreichen P_{lac} -Kopien der pMJ8-Moleküle nicht maximal reprimieren. In Zellen mit pMJ8 wurde daher eine ca. tausendfach erhöhte Transkription des *endA* erwartet (vergl. Lanzer und Bujard, 1988). Außerdem liegen in diesen Zellen, entsprechend der Kopiezahl des pBluescript (Sambrook et al., 1989), theoretisch ca. 500 *endA*-Kopien vor. Dennoch war die Endo I-Menge im Periplasma von WA165 pMJ8 nur 108 mal höher als im *endA*-Wildtyp (Tab. 4). Dies deutet darauf hin, daß die Transkription oder Translation des *endA* oder der Export der Endo I reguliert sein könnte.

Die Überproduktion der Endo I hat offenbar keinen Effekt auf die Vermehrungsgeschwindigkeit während der log-Phase. Die Generationszeit von WA165 pMJ7 bzw. WA165 pMJ8 entspricht etwa der von WA165 pBluescript (Tab. 4).

5.1.2 Einfluß der Wachstumsphase auf die Endo I-Menge im Periplasma eines überproduzierenden *E. coli* -Stammes

Die Endo I-Menge im Periplasma von Zellen unterschiedlicher Wachstumsphasen wurde bestimmt, um Hinweise auf die Regulation der Endo I-Produktion und auf eine mögliche Funktion des Enzyms zu erhalten. Während der lag-Phase der Kultur nimmt die Endo I-Menge pro Zelle zu (Abb. 2). Nach der ersten Teilung, beim Übergang der Zellen in die exponentielle Wachstumsphase (log-Phase), ist die Endo I-Menge ca. zwanzig mal so groß wie in der stationären Wachstumsphase (stat-Phase). Im Verlauf der log-Phase sinkt die Endo I-Menge, bis beim Eintritt in die stat-Phase der Ausgangswert wieder erreicht ist. Ein ähnlicher Verlauf der Endo I-Produktion wurde in Ultraschallextrakten festgestellt (Shortman und Lehman, 1964). Dies zeigt, daß die Menge der periplasmatischen Endo I nicht vom Transportsystem, sondern vermutlich durch Kontrolle der *endA*-Expression reguliert wird. Beim Übergang von der stat- in die log-Phase wird möglicherweise die Endo I-Produktion induziert, und spätestens nach der ersten Zelltei-

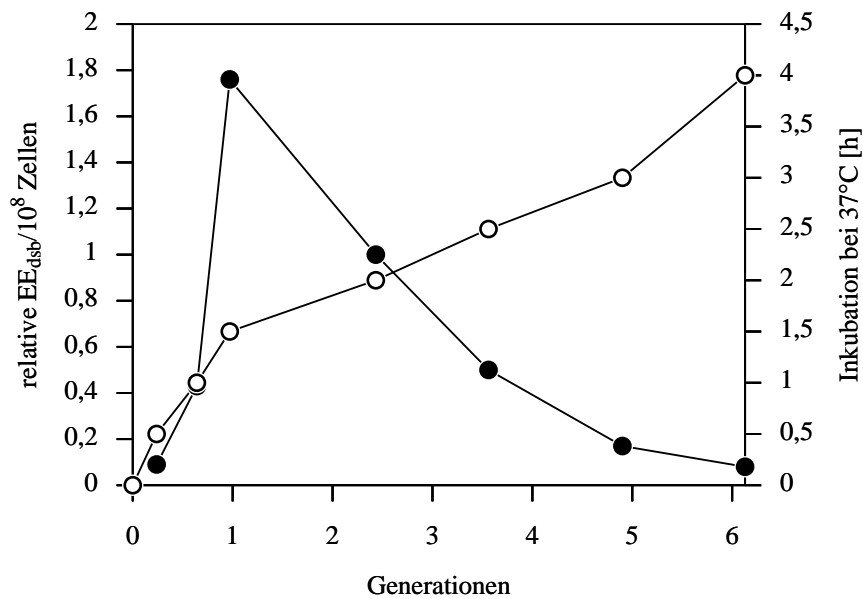


Abb. 2: Endo I-Aktivität im Periplasma von WA165 pMJ8-Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen einer Kultur. Eine Kultur von *E. coli*-WA165 pMJ8 wurde mit Zellen der stat-Phase beimpft (5×10^7 Zellen/ml) und bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde die DNA-doppelstrangbrechende Endo I-Aktivität (EE_{dsb}) im Überstand von Kälteschock-behandelten Zellen bestimmt (4.8; 4.13). Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Endonuklease-Tests dargestellt. Anhand des mikroskopisch ermittelten Zelltiters wurde die EE_{dsb} auf einen Standard von 10^8 aufgearbeiteten Zellen korrigiert, und die Anzahl der vollendeten Generationen zum Zeitpunkt des Kälteschock wurde berechnet. Die Endo I-Aktivitäten sind relativ zur Aktivität in Zellen aus der Mitte der log-Phase (nach ca. 2,5 Generationen) angegeben. -●-: EndoI-Aktivität; -O-: Wuchskurve.

lung erfolgt die Repression des *endA*. Dadurch ist die Neusynthese des Enzyms verhindert, und vorhandene Endo I wird in weiteren Teilungen auf die Tochterzellen verteilt. Die Endo I-Überproduktion wirkt sich offenbar nicht nachteilig aus, denn weder die Lebensfähigkeit der Zellen war dadurch beeinträchtigt, noch war der Druck zur Segregation des pMJ8 erhöht. In jeder Wachstumsphase waren 40-50% der Zellen von WA165 pBluescript und von WA165 pMJ8 koloniebildungsfähig. Ein paralleles Ausplattieren der Kulturen auf selektivem und nicht-selektivem Medium zeigte, daß mehr als 90% der lebenden Zellen beider Stämme Ampicillin-resistent waren, also das Plasmid besaßen.

5.1.3 Endo I-Aktivität in verschiedenen *endA*-Mutanten von *E. coli*

Bisher standen nur *endA*-Punktmutanten zur Verfügung, die, wie im Fall der *endA1*-Mutanten, eine Endo I-Restaktivität besaßen (Dürwald und Hoffmann-Berling, 1968). Nur eine völlige Eliminierung der Endo I-Aktivität kann gewährleisten, daß ein Mutan-

tenphänotyp ausgeprägt und nicht durch eine Restaktivität maskiert wird. Außerdem wird hierdurch sichergestellt, daß bei der Präparation von Proteinen und DNA keine Kontamination mit Endo I-Aktivität auftritt, die häufig bei der weiteren Verwendung oder einer längeren Lagerung der Präparate erheblich stören kann.

Zur Erzeugung von *endA*-Nullmutanten wurde zunächst das Gen einer Antibiotikum-Resistenz in das *endA* des pMJ7 inseriert. Die weitere Konstruktion erfolgte nach dem von Cherepanov und Wackernagel (1995) beschriebenen Prinzip. Das Resistenz-Gen wurde durch homologe Rekombination in das chromosomale *endA* eines Wildtyps inseriert und von dort durch P1-Transduktion auf den Stamm WA234 übertragen. Die resultierenden *E. coli*-Stämme wurden BT267 (*endA*::Km^R), BT281 (*endA*::Tc^R) und BT297 (*endA*::Cm^R) genannt. Bei der Konstruktion des Stammes BT333 ($\Delta endA$::Tc^R) wurde ca. 83% des *endA*-Gens deletiert (Cherepanov und Wackernagel, 1995). Die verschiedenen Konstruktionen sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 5: Konstruktion der *endA*-Nullmutanten von *E. coli*

Stamm	Antibiotikum-Resistenz	Herkunft	Insertionsort im <i>endA</i> -Gen
BT267	Kanamycin	<i>HindIII/BamHI</i> -Fragment aus pSY343	<i>NsiI</i>
BT281	Tetracyclin	<i>EcoRI/PvuII</i> -Fragment aus pBR322	<i>NsiI</i>
BT297	Chloramphenicol	<i>HindII/XmnI</i> -Fragment aus pACYC184	<i>NsiI</i>
BT333	Tetracyclin	<i>SmaI/HindIII</i> -Fragment aus pCP15	$\Delta PvuII(688bp)$

Die Endo I-Aktivität im Periplasma der Zellen von WA234 (*endA*⁺), DH5 α (*endA1*), BT267, BT281, BT297 und BT333 wurde bestimmt. Im Kälteschocküberstand von DH5 α war trotz der *endA1*-Punktmutation eine mit der Endo I identische endonukleolytische Aktivität vorhanden (Abb. 3). Wurde die superhelikale pSY343-DNA mit Kälteschocküberstand von WA234 behandelt, nahm sowohl die lineare Plasmid-DNA (Doppelstrangbruch-Produkt) als auch die relaxierte Plasmid-DNA (Einzelstrangbruch-Produkt) zu. Durch die erhöhte Menge zugegebenen Kälteschocküberstandes ist die Konzentration monovalenter Ionen im Enzymansatz größer als bei den Standardbedingungen (0,15 M anstatt 0,05 M), sodaß die Endo I Doppelstrangbrüche und Einzelstrangbrüche erzeugt (vergl. 5.2.4). Gleiche Spaltprodukte entstanden nach der Behandlung der Plasmid-DNA mit Kälteschocküberstand von DH5 α . Die Endo I-Restaktivität in der *endA1*-Mutante betrug etwa 0,1% der Aktivität vom Wildtyp. Im Kälteschocküberstand der nicht charakterisierten *endA*-Mutante WA165 und der *endA*-Nullmutanten (BT267, BT281, BT297, BT333) war hingegen keine endonukleolytische Aktivität nachweisbar (Abb. 3). Dies zeigt, daß die endonukleolytische Aktivität der *endA*-Punktmutanten auf

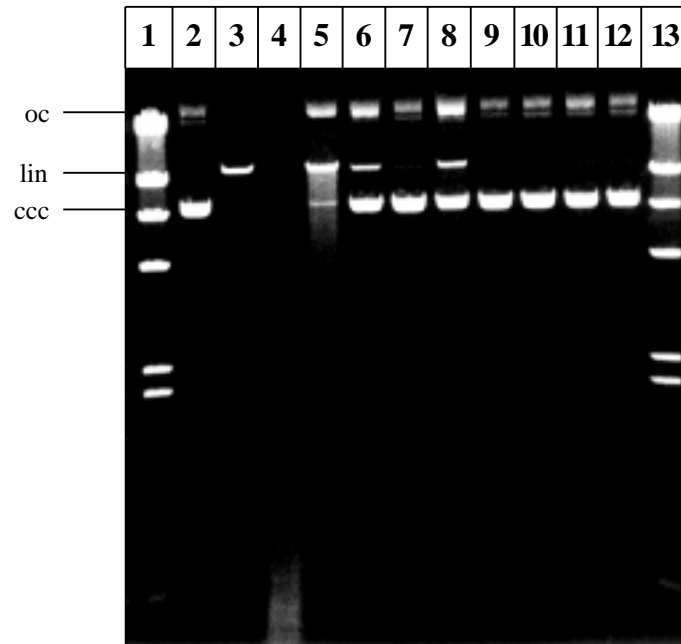


Abb. 3: Endonuklease I-Aktivität in Kälteschocküberständen verschiedener *endA*-Mutanten und eines Wildtyps von *E. coli*. Zehnfach konzentrierte Kälteschocküberstände wurden, wie in 4.8 beschrieben, hergestellt. Im Endonuklease-Test (4.13) wurde pSY343-DNA mit je 5 μ l Kälteschocküberstand (freigesetztes Protein aus ca. 1×10^7 Zellen) für 2 h bei 37°C inkubiert. Spur 1, 13: 145 ng *Hind*III-behandelte λ -DNA; Spur 2: 100 ng unbehandelte pSY343-DNA; Spur 3: 17 ng lineare pSY343-DNA; Spur 4-7: 100 ng pSY343-DNA nach Behandlung mit verschiedenen Verdünnungen des Kälteschocküberstandes von WA234 (*endA*⁺), 4: 10^{-1} , 5: 10^{-2} , 6: 10^{-3} , 7: 10^{-4} ; Spur 8-12: 100 ng pSY343-DNA nach Behandlung mit unverdünnten Kälteschocküberständen von verschiedenen *endA*-Mutanten, 8: DH5 α (*endA*1); 9: BT267 (*endA*::Km^R), 10: BT281 (*endA*::Tc^R), 11: BT297 (*endA*::Cm^R), 12: BT333 (Δ *endA*::Tc^R). oc: relaxierte Plasmid-DNA; lin: lineare Plasmid-DNA; ccc: superhelikale Plasmid-DNA.

einer „leaky“-Mutation beruht und außer der Endo I offenbar keine andere DNA-spezifische Endonuklease im Periplasma von *E. coli* vorhanden ist.

Unter den vorherrschenden Kulturbedingungen (LB, 37°C) ist die Endo I offenbar für die Vermehrung der Zellen unbedeutend. Die Generationszeit der *endA*-Nullmutanten unterschied sich vom Wildtyp nur unwesentlich (Tab. 4), und es konnte kein Unterschied in der Länge der lag-Phase festgestellt werden.

5.2 Biochemische Charakterisierung der Endo I von *E. coli*

5.2.1 Bestimmung der Signalpeptid-Spaltstelle von Endo I

Der Hauptweg des Exports von Proteinen ist der Signalpeptid-vermittelte Transport durch die Zellmembran. Das aminoternale Signalpeptid ist dafür unbedingt notwendig und wird von einer Signalpeptidase nach erfolgtem Membrandurchtritt des Proteins

abgespalten (Wickner et al., 1991). Aufgrund der Spezifität des Exportprozesses liegt bei den Signalpeptiden und den Spaltstellen ein Konsensus vor, der die Vorhersage solcher Strukturen ermöglicht (von Heijne, 1986). Ein typisches Signalpeptid wurde auch in der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Endo I gefunden (Jekel und Wackernagel, 1995). Die Abtrennung des Signalpeptids könnte zwischen den Aminosäureresten der Position 22 (Alanin) und 23 (Glutaminsäure) oder zwischen Position 24 (Glycin) und 25 (Isoleucin) erfolgen (s. Abb. 8). Für die Konstruktion eines Suizidsystems war geplant, durch die Entfernung des Signalpeptids eine intrazellulär aktive Endo I zu produzieren. Die exakte Spaltstelle mußte identifiziert werden, da möglicherweise die ersten aminoterminalen Aminosäuren für die Aktivität des prozessierten Enzyms wichtig sind. Hierfür wurde Endo I im Periplasma von *E. coli* überproduziert, gereinigt und der Aminoterminus des Enzyms teilweise sequenziert.

Überproduktion der Endo I. Für eine maximale Überproduktion der Endo I wurde das *endA*-Gen in das Plasmid pSY343 kloniert (Yasuda und Takagi, 1983), dessen Kopiezahl durch Temperaturerhöhung von ca. 20-50 bei 30°C auf bis zu 2000 Kopien pro Zelle („runaway copy“) bei 37°C gesteigert werden kann (Uhlin et al., 1979). Das Plasmid, in dem die Orientierung des *endA* und des *nptII* (Km^R aus Tn5) übereinstimmen, wurde pMJ16 genannt (Abb. 4) und im Stamm WA165 (*endA*) etabliert.

Zur Bestimmung der Endo I-Überproduktion unter runaway copy-Bedingungen wurden Zellen von WA115 (*endA*⁺), WA165 (*endA*) pMJ16 (*endA*⁺) und WA165 (*endA*) pSY343 zwei Generationen bei 30°C bis zu einem Zelltitert von ca. 1×10^8 vermehrt und dann 5 h bei 37°C weiter inkubiert. Die Endo I wurde in einem Teil der Kultur durch Kälteschock und im anderen Teil durch Lysozym/EDTA-Behandlung aus dem Periplasma freigesetzt (s. 4.8). Bei der Kälteschock-Methode wurden die Zellen in nur 0.01 Vol. Kälteschock-Puffer aufgenommen, und die Lysozym/EDTA-Behandlung erfolgte in 0,02 Vol. der eingesetzten Kulturmenge. In den Extrakten von WA165 pMJ16 wurde ca. 175 mal so viel Endo I-Aktivität gemessen wie in den Extrakten des *endA*-Wildtyp WA115, und in WA165 pSY343 war keine endonukleolytische Aktivität nachweisbar (s. Tab. 4). Eine ähnliche Überproduktion (ca. zweihundertfach) wurde erzielt, wenn das *dnaA*-Gen von *E. coli* in pSY343 vorlag (Yasuda und Takagi, 1983).

Um die Endo I in einem Polyacrylamidgel detektieren zu können, wurden die Proteine der Extrakte in Microcon-Ultrafiltrationseinheiten (Ausschlußgröße $M_r=10.000$; Amicon, Witten) bei 4°C fünfzigfach konzentriert. Die Proteine unterschiedlicher Konzentrationen wurden aufgetrennt (s. 4.11), der Anteil der Endo I am gesamten Protein durch densitometrische Auswertung des gefärbten Polyacrylamidgels bestimmt und die Proteinkonzentration in den Extrakten ermittelt (s. 4.10). Werden gleiche Konzentrationen der Lysozym/EDTA-Extrakte verglichen, dann war bei WA165 pMJ16 eine schwache Bande zu erkennen, die bei WA165 pSY343 und WA115 nicht auftrat

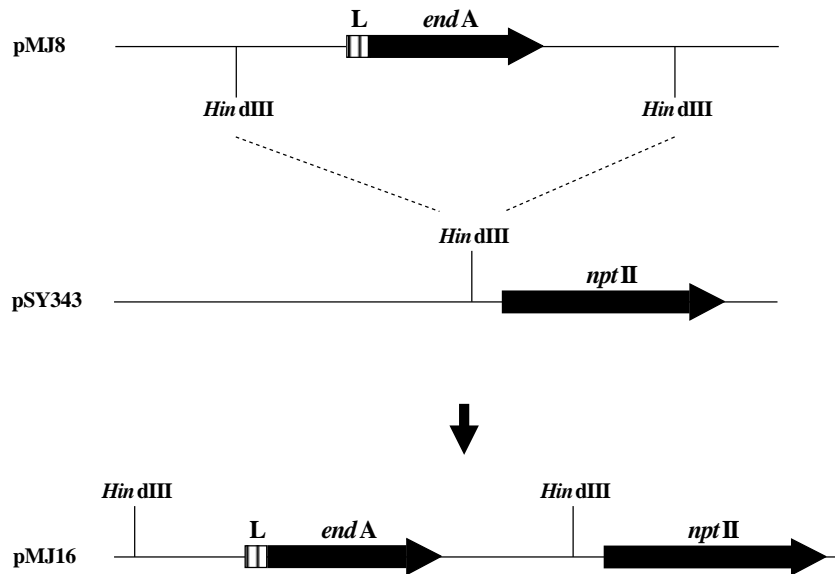


Abb. 4: Konstruktion des Plasmids pMJ16. *endA*: für die Endonuklease I von *E. coli* kodierende Nukleotidsequenz; L: für das Signalpeptid der Endonuklease I kodierende Nukleotidsequenz; *nptII*: für die Neomycin-Phosphotransferase II (Kanamycin-Resistenz) von Tn5 kodierende Nukleotidsequenz; horizontale Linien symbolisieren einen Teil der Nukleotidsequenz von Plasmiden; vertikale Linien zeigen die Position von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen; horizontale Pfeile geben die Position und Transkriptionsrichtung von proteinkodierenden Regionen an; schraffierte Rechtecke symbolisieren den für das Signalpeptid kodierenden Bereich des *endA*-Gens.

(Abb. 5A). Das relative Molekulargewicht an dieser Position beträgt ca. 25.000 und entspricht dem Molekulargewicht der Endo I (24.454), das von der Nukleotidsequenz des *endA*-Gens abgeleitet werden kann (Jekel und Wackernagel, 1995). Die densitometrische Auswertung ergab, daß im Lysozym/EDTA-Überstand der Anteil der Endo I am Gesamtprotein (ohne Lysozym) nur ca. 0,7% beträgt. Im Kälteschock-Überstand macht Endo I dagegen ca. 4,2% des Gesamtproteins aus. Dies bestätigt, daß durch Kälteschock bevorzugt Endo I freigesetzt wird (Ananthaswamy, 1977). Durch die Lysozym/EDTA-Behandlung von WA165 pMJ16 wurde 0,53 µg (ca. $1,3 \times 10^{13}$ Moleküle) Endo I aus ca. $2,6 \times 10^{10}$ Zellen freigesetzt. Wird kein Verlust bei der Aufarbeitung angenommen, befinden sich demnach ungefähr 450 Endo I-Moleküle in einer induzierten Zelle von WA165 pMJ16. In einer entsprechenden *endA*-Wildtypzelle befinden sich dann ca. 3 Moleküle Endo I, wenn von einer hundertfünfundsiebzighfachen Überproduktion im WA165 pMJ16 ausgegangen wird. Wahrscheinlich ist die maximale Molekülzahl pro Wildtypzelle beim Übergang von der stat- in die log-Phase höher, denn zum Zeitpunkt der Endo I-Freisetzung hatte die Kultur die stat-Phase erreicht (vergl. Abb. 2).

Reinigung der Endo I. Die Endo I wurde aus 6 h induzierten Zellen des WA165 pMJ16 durch Kälteschock freigesetzt (s. o.) und durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt (s. 4.9). Nach der Vorreinigung mit einem Anionenaustauscher (DEAE)

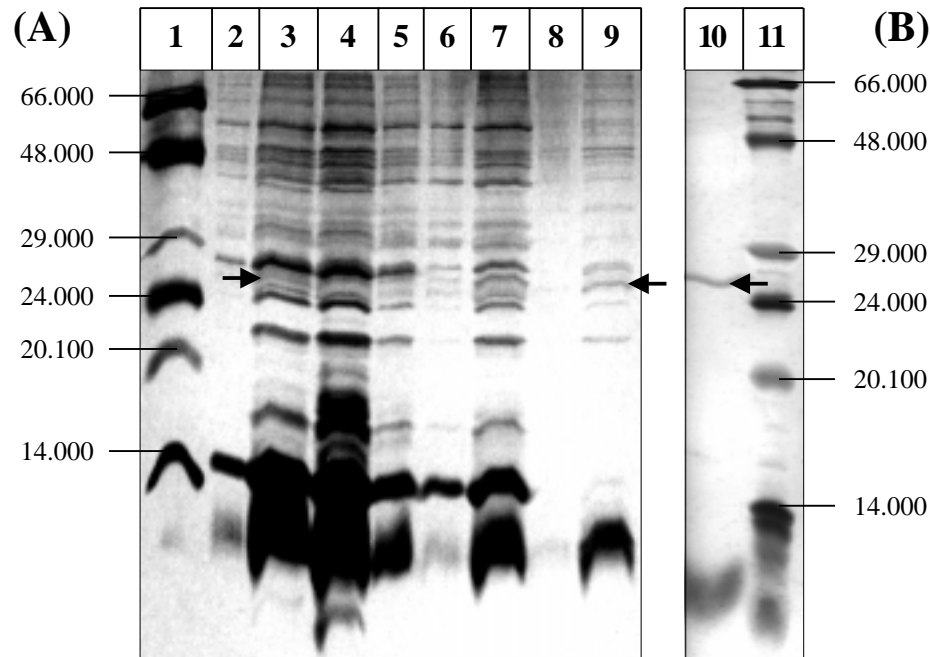


Abb. 5: Überproduktion der Endo I im Periplasma von *E. coli* WA165 pMJ16 und Reinigung des prozessierten Enzyms. Aus Zellen von WA165 pMJ16 mit induzierter „runaway-copy“-Replikation des Plasmids wurden die periplasmatischen Proteine durch Kälteschock- oder Lysozym/EDTA-Behandlung freigesetzt (4.8). Die Endo I des Kälteschocküberstandes wurde gereinigt (5.2.1). Die Proben wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. **(A)** Rohextrakte ; **(B)** Gereinigte Endo I (CM-Säuleneluat des KCl-Gradienten). Die aufgetragenen Rohextraktvolumina sind in Zellzahläquivalenten angegeben, aus denen die Proteinmengen gewonnen wurden. Spur 1, 11: Molekulargewichtsstandards BSA ($M_r=66.000$), Ovalbumin ($M_r=48.000$), Carboanhydrase ($M_r=29.000$), Trypsinogen ($M_r=24.000$), Trypsininhibitor ($M_r=20.100$), Lactalbumin ($M_r=14.000$); Spur 2-7: Lysozym/EDTA-Extrakte; Spur 8-9: Kälteschock-Extrakte; Spur 10: gereinigte Endo I. 2 bzw. 3: WA165 (*endA*) pMJ16 (pSY343::*endA*⁺), $2,6 \times 10^8$ bzw. $2,6 \times 10^9$ Zellen; 4 bzw. 5: WA165 pSY343, $2,8 \times 10^9$ bzw. $2,8 \times 10^8$ Zellen; 6 bzw. 7: WA115 (*endA*⁺), 1×10^9 bzw. 1×10^{10} Zellen; 8 bzw. 9: WA165 pMJ16, 5×10^8 bzw. 5×10^9 Zellen. Pfeile zeigen die Position, die dem abgeleiteten M_r der prozessierten Endo I entspricht.

wurde der größere Teil der Endo I-Menge und die größte spezifische Aktivität mit 0,28-0,37 M $[K]^+$ von einem Kationenaustauscher (CM) eluiert (Tab. 6). Die Ausbeute relativ zur ursprünglich eingesetzten Endo I-Aktivität betrug 15,5%. Die spezifische Aktivität dieser Fraktion ($1,9 \times 10^8$ EE_{dsb}/mg Protein) war etwa sechsmal so hoch wie im Kälteschocküberstand. Das Präparat ist mit nur einem anderen Protein (ca. $M_r=11.000$) verunreinigt (Abb. 5B). Die densitometrische Auswertung ergab, daß ca. 9% des Gesamtproteins Endo I ist. Das ermittelte Molekulargewicht des Enzyms (ca. $M_r=25.000$) ist dem aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Molekulargewicht ($M_r=24.454$) sehr ähnlich. Die Steigerung der spezifischen Aktivität ist offenbar so gering, da einerseits der Endo I-Anteil im Kälteschocküberstand mit 4,2% schon relativ groß war (s. o.) und andererseits zwar fast alle anderen Proteine des Kälteschocküberstandes beseitigt wurden,

Tab. 6: Reinigung der Endo I aus dem Periplasma von *E. coli*

Reinigungsstufe ^a	[K ⁺]-Konzentration [M] ^b	Volumen [ml]	Gesamtaktivität [EE _{dsb}] ^c	Gesamtprotein [μg]	Spezifische Aktivität [EE _{dsb} /mg Protein]	Ertrag [%]
Kälteschock-Überstand ^d		1500	1,1 x 10 ⁷	354	3 x 10 ⁷	100
1. Elution der CM-Säule ^e	0,16-0,19	0,1	5,8 x 10 ⁵	390	1,5 x 10 ⁶	5,3
2. Elution der CM-Säule ^f	0,28-0,37	0,1	1,7 x 10 ⁶	9	1,9 x 10 ⁸	15,5

^a Die Durchführung der Reinigung erfolgte wie in 4.9 beschrieben.

^b Kaliumionen-Konzentration in den vereinigten Endo I-Hauptfraktionen.

^c Enzymeinheiten DNA-doppelstrangbrechender Aktivität.

^d Es sind die Werte vor der Reinigung und RNase-Zugabe (4.9) angegeben.

^e 1. linearer Elutionsgradient der CM-Säule: 0,04 - 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer; pH 7,4.

^f 2. linearer Elutionsgradient der CM-Säule: 0 - 1 M KCl in 0,02 M Kaliumphosphat-Puffer; pH 7,4 .

aber die Menge der Hauptkomponente sich lediglich verringerte (vergl. Abb. 5A, 5B).

Sequenzierung des Aminoterminus der periplasmatischen Endo I. Von der gereinigten Endo I wurde die Sequenz der ersten 15 aminoterminalen Aminosäuren (aa) ermittelt (4.12). Sie ist mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der prozessierten Endo I identisch, wenn die Abspaltung des Signalpeptids zwischen Ala²² und Glu²³ erfolgt (s. Abb. 8). Demnach besteht das unprozessierte Protein vermutlich aus 235 aa ($M_r=26.708$) und das reife Enzym aus 213 aa ($M_r=24.454$). Der vorhersagbare isoelektrische Punkt des prozessierten Enzyms befindet sich bei pH 9,17. Im pH-Optimum der Aktivität (pH 7,5-8,5 ; Lehman et al., 1962a) ist das Enzym vermutlich schwach positiv geladen, sodaß eine schwache Bindung des negativ geladenen Substrats (DNA) bzw. Inhibitors (RNA) durch ionische Wechselwirkungen möglich ist.

5.2.2 Thermostabilität der nukleolytischen Aktivität von Endo I

Im Hinblick auf die Verwendung der Endo I als Suizidfunktion war es von Interesse, ob die Aktivität des Enzyms in einer induzierten Zelle ausreichend stabil ist. Zur Beurteilung der Stabilität wurde der Aktivitätsverlust nach unterschiedlich langer Thermobehandlung des aus dem Periplasma freigesetzten Enzyms untersucht. Die Aktivität der Endo I war im Temperaturbereich von 0-42°C noch nach mehreren Tagen nachweisbar (Abb. 6). Nach 3 Tagen bei 0-16°C war noch ca. 40-45% der Endo I aktiv und bei 28-42°C war es noch 16-25%. Ein separates Experiment zeigte, daß innerhalb der ersten 5 h bei 37°C kein Aktivitätsverlust eintritt. Die Endo I ist demnach unter diesen Bedingungen deutlich stabiler als die *Serratia*-Nuklease. In Anwesenheit von BSA (0,5 mg/

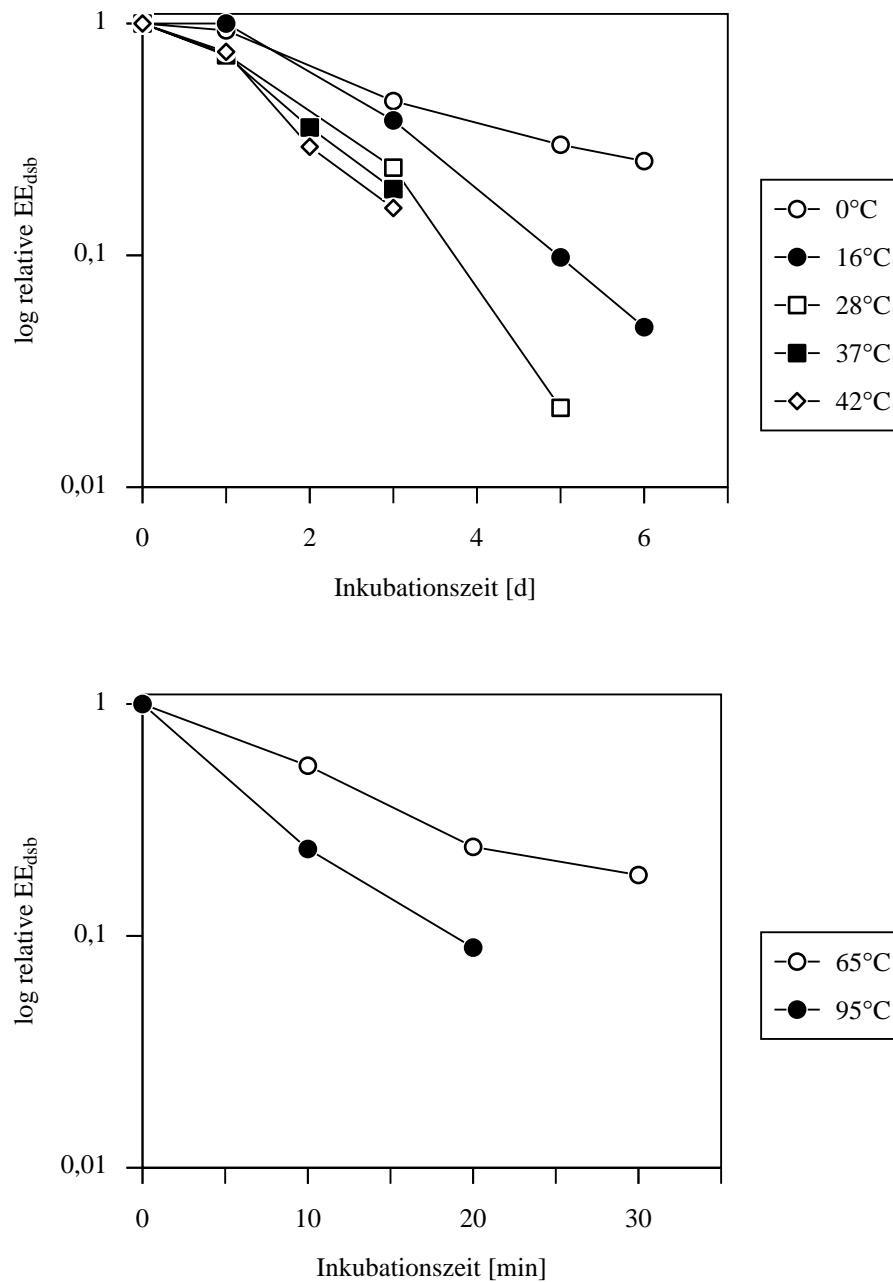


Abb. 6: Stabilität der Endo I-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen. Kälteschocküberstand von *E. coli*-WA234 (*endA*⁺) mit zehnfach konzentrierter Endo I-Aktivität (4.8) wurde nach der Behandlung mit 40 µg/ml RNase (30 min, 37°C) bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde die doppelstrangbrechende Endo I-Aktivität (EE_{dsb}) in den thermobehandelten Extrakten quantifiziert (4.13). Die Endo I-Aktivität ist relativ zu der Aktivität angegeben, die vor der Thermobehandlung gemessen wurde.

ml) ist nach 5 h bei 37°C noch ca. 60% der *Serratia*-Nuklease aktiv, und ohne BSA ist schon nach 1 h über 90% der Aktivität nicht mehr meßbar (Ahrenholtz et al. 1994a). Endo I hingegen war nach 20 min bei 65°C noch zu ca. 25% aktiv und nach 20 min bei 95°C noch zu ca. 10% (Abb. 6).

5.2.3 Bedeutung der Disulfidbrücken für die nukleolytische Aktivität der Endo I

Der Transport von Proteinen durch die Zellmembran erfolgt im ungefalteten oder nicht vollständig gefalteten Zustand (Wickner et al., 1991). Die endgültige Struktur erhalten periplasmatische Proteine erst nach ihrem Export (Wülfing und Plückthun, 1994); d. h., daß auch die Disulfidbrücken der Tertiärstruktur im Periplasma gebildet werden. Als Suizidfunktion sollte eine intrazellulär aktive Endo I dienen. Es war jedoch unbekannt, ob das Enzym auch intrazellulär korrekt gefaltet wird. Deshalb wurde zunächst untersucht, welche Bedeutung Disulfidbrücken für die Aktivität des Enzyms haben. Hierfür wurde zu einem Kälteschocküberstand von WA234 mit zehnfach konzentrierter Endo I-Aktivität (s. 4.8) SDS bzw. ein Gemisch aus SDS und β -Mercaptoethanol (β -ME) gegeben, um das Enzym zu denaturieren (s. 4.14). Die Proteinstruktur wird durch SDS zwar partiell aufgelöst, aber die Disulfidbrücken werden nur durch die reduzierende Eigenschaft des β -ME gespalten. Nach Entfernung der denaturierenden Agenzien wurde das Ausmaß der Renaturierung von Endo I durch den Vergleich der endonukleolytischen Aktivität mit einer unbehandelten und identisch aufgearbeiteten Probe abgeschätzt. Unmittelbar nach der Zugabe der Agenzien war keine Endo I-Aktivität im Zellextrakt detektierbar ($\leq 1\%$ der insgesamt eingesetzten $1,2 \times 10^4$ EE_{dsb}). Am Ende der Renaturierung wurden in der unbehandelten Probe insgesamt ca. 1100 EE_{dsb} (100%), in der SDS-behandelten Probe 280 EE_{dsb} (25%) und in der mit SDS/ β -ME denaturierten Probe 14 EE_{dsb} (1,3%) gemessen. Dies Ergebnis zeigt, daß die Tertiärstruktur der Endo I für die Aktivität des Enzyms unbedingt erforderlich ist. Ohne korrekte Disulfidbrücken entsteht offenbar nur sehr selten ein natives Enzym, oder es wird ein geringfügig aktives Enzym gebildet. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Endo I-homologen Enzymen aus *V. cholerae* (Focareta und Manning, 1987) und *A. hydrophila* (Chang et al., 1992) gefunden.

5.2.4 Die DNA-strangbrechenden Eigenschaften der Endo I

Um eine wirksame Abtötung von Zellen zu bewirken, muß Endo I intrazellulär Doppelstrangbrüche erzeugen. Zur Klärung, ob eine erhöhte Salzkonzentration oder tRNA den Wechsel von doppelstrangbrechender zu einzelstrangbrechender Aktivität der Endo I hervorruft (s. Goebel und Helinski, 1970), wurde Kälteschocküberstand von WA234 im Endonuklease-Test mit entsprechend variierten Reaktionsbedingungen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 dargestellt.

Bei niedrigen Salzkonzentrationen besaß Endo I ausschließlich Doppelstrangbruch-Aktivität (dsb). Wurde das Enzym vor dem Endonuklease-Test mit RNase behandelt, war die Aktivität zwar erhöht, aber es war immer noch nur dsb meßbar. Eine Vorbehandlung

Tab. 7: DNA-strangbrechende Aktivität von RNA-freier und RNA-komplexierter Endo I bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen^a

NaCl-Konzentration [M]		Endo I-Aktivität [EE/μl Kälteschocküberstand]			
		- nat RNA ^b	+ natRNA ^b	+ natRNA ^b , +tRNA	+ natRNA ^b , + BSA
0,05	dsb ^c	14,6 [±2,5]	6,3 [±0,5]	n. d. ^f	6,3 [±0,1]
	ssb ^d	n. d. ^e	n. d. ^e	n. d. ^e	n. d. ^e
0,15	dsb ^c	15,6 [±2,9]	13,6 [±3]	0,08	
	ssb ^d	23,1 [1,2]	23,1 [1,8]	0,138	
0,5	dsb ^c	n. d. ^f	n. d. ^f	n. d. ^f	
	ssb ^d	2,1 [±0,4]	2,1 [±0,1]	0,5 [±0,06]	

^a Kälteschocküberstand von WA234 mit zehnfach konzentrierter Endo I-Aktivität (s. 4.8) wurde mit RNase (40 μg/ml) vorbehandelt (- natRNA) oder unbehandelt (+ natRNA) in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Endonuklease-Test eingesetzt (4.13). Bei Bedarf wurde dem Testansatz vor der Endo I-Reaktion tRNA aus *E. coli* (20μg/ml) oder BSA (40 μg/ml) zugefügt. Es sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung [±x] dargestellt.

^b natRNA: mit periplasmatische Endo I komplexierte RNA

^c dsb: DNA-doppelstrangbrechende Aktivität

^d ssb: DNA-einzelstrangbrechende Aktivität

^e nicht detektierbar: unterhalb der Nachweisgrenze von 0,5 EE/μl

^f nicht detektierbar: unterhalb der Nachweisgrenze von 0,03 EE/μl

mit BSA (anstatt RNase) bewirkte hingegen keine Veränderung der nukleolytischen Aktivität. Die Erhöhung der Endo I-Aktivität nach der RNase-Behandlung ist also durch einen Abbau von RNA zustande gekommen und war nicht die Folge eines allgemeinen Stabilisierungseffektes durch Anwesenheit zusätzlicher Proteine, wie dies z. B. im Fall der *Serratia*-Nuklease beobachtet wurde (Ahrenholtz et al., 1994a). Diese Ergebnisse bestätigen, daß Endo I aus dem Periplasma nur im Komplex mit einer inhibitorischen RNA (im folgenden natRNA genannt) freigesetzt wird (Cordonnier und Bernardi, 1965). Möglicherweise wird die Aktivität der Endo I bei niedrigen Salzkonzentrationen durch natRNA reguliert. Die periplasmatische RNase I, deren Funktion bisher unbekannt ist, könnte als Aktivator wirken, indem sie die natRNA der Endo I degradiert. Die Ergebnisse zeigen, daß die Endo I-Aktivität allein durch die Salzkonzentration gesteuert werden kann. Der inhibitorische Effekt der natRNA wurde durch eine Erhöhung der Salzkonzentration aufgehoben (Tab. 7). Nur bei 0,05 M NaCl war die Aktivität von natRNA-komplexierter Endo I und RNA-freiem Enzym unterschiedlich. Bei 0,15 M bzw. 0,5 M NaCl war die Aktivität jedoch nahezu identisch. Desweiteren nahm die inhibitorische Wirkung von tRNA mit steigender Salzkonzentration ab. Bei niedrigen Salzkonzentrationen war zwar keine Endo I-Aktivität mehr feststellbar, doch bei 0,5 M NaCl wurde noch ca. 25% der Aktivität gemessen. Möglicherweise wird durch Erhöhung der Salzkonzentration die Affinität der Endo I zum kompetitiven Inhibitor (RNA)

verringert, während die Affinität zum Substrat (DNA) unverändert bleibt. Dadurch könnte bei erhöhter Salzkonzentration bevorzugt das Substrat gebunden und umgesetzt werden. In Abb. 7 ist zu erkennen, daß allein die Salzkonzentration eine Änderung der strangbrechenden Aktivität bewirken kann. Die Zugabe von tRNA bewirkte dagegen keinen Aktivitätswechsel, sondern inhibierte beide strangbrechenden Aktivitäten gleichermaßen. Bei 0,15 M NaCl betrug sowohl die dsb als auch die ssb der Endo I in Anwesenheit von tRNA 0,6 % der Aktivität, die ohne tRNA gemessen wurde (Tab. 7).

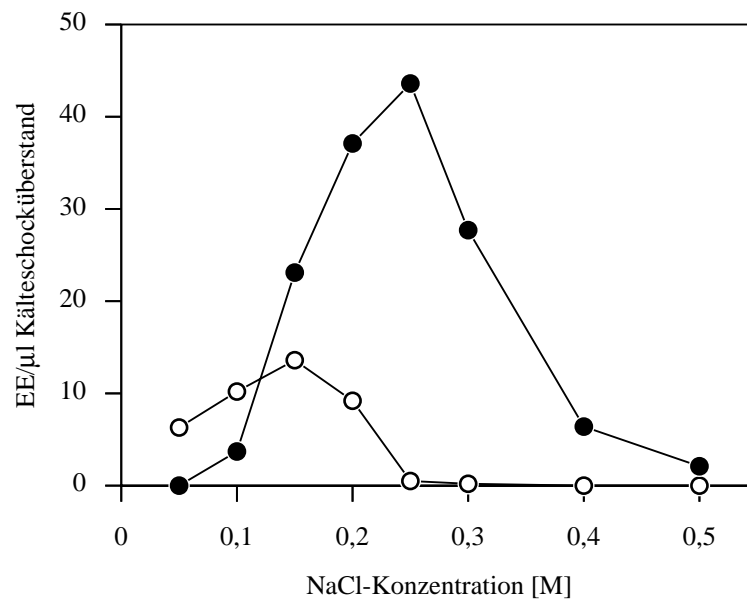


Abb.7: DNA-strangbrechende Aktivität der Endo I bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Kälteschocküberstand von *E. coli*-WA234 (*enda*⁺) mit zehnfach konzentrierter Endo I-Aktivität (4.8) wurde nach der RNase-Behandlung in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Endonuklease-Test eingesetzt, und die DNA-doppelstrangbrechende (-O-) bzw. DNA-einzelstrangbrechende Aktivität (-●-) wurde quantifiziert (4.13). Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Aufgrund der Ergebnisse ist zu erwarten, daß intrazellulär wirksame Endo I Doppelstrangbrüche im Chromosom erzeugen kann. Intrazelluläre RNA wird das Enzym vermutlich inhibieren, aber die tödlichen DNA-Schäden werden dadurch nicht verhindert.

5.3 Vergleich der Endo I aus *E. coli* mit entsprechenden Enzymen anderer Bakterien

Mit dem Computerprogramm FASTA (Pearson und Lipman, 1988) wurde in den Datenbanken SWISSPROT und PIR nach Proteinen gesucht, deren Aminosäuresequenz ho-

molog zur Endo I ist. Die periplasmatische DNase von *Erwinia chrysanthemi* (Moulard et al., 1993) ist ca. 77%, die extrazelluläre DNase von *Vibrio cholerae* (Focareta und Manning, 1987) ca. 60% und die extrazelluläre DNase von *Aeromonas hydrophila* (Chang et al., 1992) ca. 54% mit der Endo I identisch. Ein typisches Signalpeptid (v. Heijne, 1985) wurde für alle homologen Proteine am Aminoterminus des primären Translationsproduktes vorhergesagt. Demnach scheint der Transport der Enzyme durch die Cytoplasmamembran auf *sec*-abhängige Weise zu erfolgen (Wickner et al., 1991). Die Signalpeptid-Spaltstelle der Endo I wurde eindeutig identifiziert (s. 5.2.1), die Spaltstellen der homologen Proteine wurden jedoch nur mit den von v. Heijne (1986) aufgestellten Regeln aus der Aminosäuresequenz abgeleitet. Ein „multiple alignment“ der Aminosäuresequenzen zeigt, daß die Abspaltung des Signalpeptids wahrscheinlich bei allen Proteinen an der gleichen Position erfolgt (Abb. 8). Die Signalpeptide der

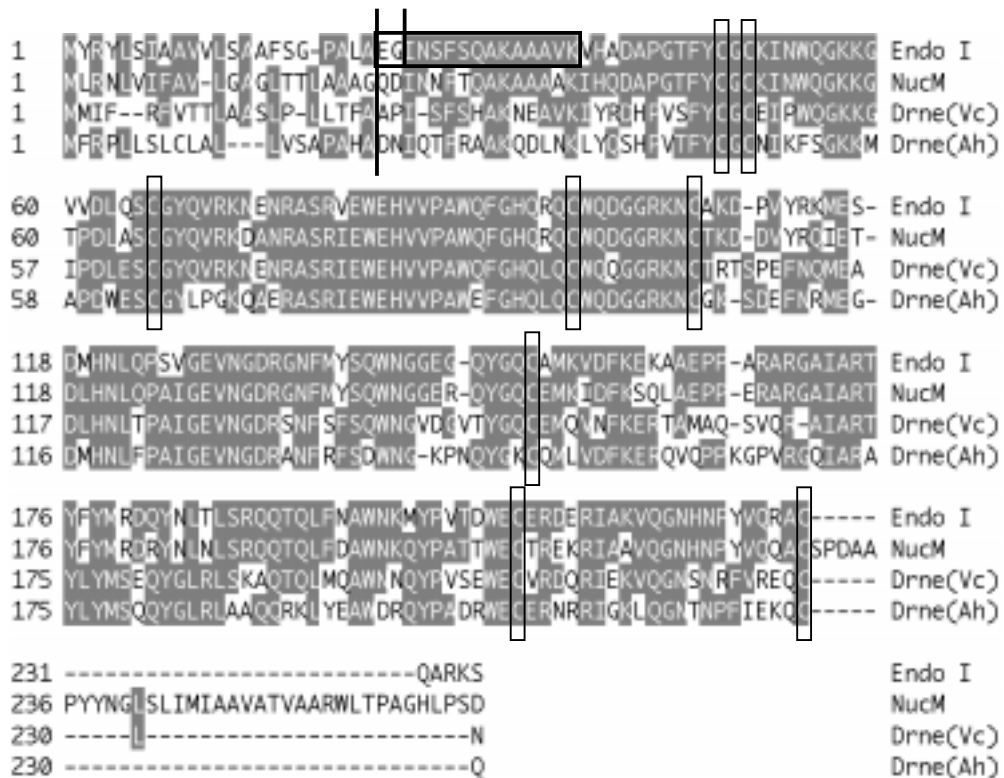


Abb. 8: „Multiple Alignment“ der Endo I von *E. coli* mit homologen DNasen aus anderen Gram⁻-Bakterien. Die Aminosäuresequenzen der DNasen wurden aus den Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene abgeleitet, und mit dem Computerprogramm CLUSTAL (Higgins und Sharp, 1988) wurde ein Alignment erstellt. Endo I: Endonuklease I von *E. coli*; NucM: periplasmatische Nuklease von *E. chrysanthemi*; Drne(Vc): extrazelluläre DNase von *V. cholerae*; Drne(Ah): extrazelluläre DNase von *A. hydrophila*. Identische Aminosäuren an derselben Position sind grau hinterlegt. Vorhersagbare Signalpeptid-Spaltstellen (v. Heijne; 1986) sind durch vertikale Linien gekennzeichnet. Das horizontale Rechteck zeigt die experimentell bestätigte Aminosäuresequenz der prozessierten Endo I (5.2.1). Vertikale Rechtecke geben die Position der Cystein-Reste in den reifen Proteinen an.

DNasen gleichen sich kaum, aber zwischen den prozessierten Proteinen besteht eine sehr große Identität. Endo I ist wie die DNase von *E. chrysanthemi* periplasmatisch lokalisiert, aber die homologen Enzyme von *V. cholerae* und *A. hydrophila* werden ins Umgebungsmedium sekretiert. Anhand der Aminosäuresequenz ist kein Unterschied zwischen den prozessierten Proteinen zu erkennen, der auf ein Signal für den Transport durch die äußere Zellmembran hindeuten würde. Vermutlich sind in *E. coli* und *E. chrysanthemi* keine Mechanismen vorhanden, die den Transport der DNasen durch die äußere Zellmembran ermöglichen. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, daß die DNasen aus *V. cholerae* und *A. hydrophila* von *E. coli*-Zellen nicht ins Umgebungsmedium abgegeben werden können, sondern im Periplasma lokalisiert sind (Focareta und Manning, 1987; Chang et al., 1992). Alle Homologen haben im prozessierten Enzym acht Cystein-Reste an identischen Positionen, die maximal vier Disulfidbrücken ausbilden können. Die sehr starke Konservierung der Cystein-Reste ist im Einklang damit, daß die Disulfidbrücken der homologen DNasen für die endonukleolytische Aktivität unbedingt erforderlich sind. Die Homologie der Proteine ist ein Indiz für eine ähnliche Struktur und einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der DNasen. Am Carboxyterminus der DNase von *E. chrysanthemi* befinden sich zusätzlich ca. 25 Aminosäuren. Möglicherweise verleiht dieser verlängerte Teil des Enzyms zusätzliche Fähigkeiten. Die DNase von *E. chrysanthemi* degradiert außer DNA auch RNA (Moulard et al., 1995). Endo I und die anderen Homologen können RNA hingegen nicht abbauen.

5.4 Identifizierung eines möglichen Promoters des *endA*-Gens von *E. coli*

Vor dem *endA*-Gen befinden sich zwei Bereiche, die homolog zu typischen σ^{70} -Promotern von *E. coli* sind (Jekel und Wackernagel, 1995). Um festzustellen, ob von diesen Bereichen tatsächlich eine Promoteraktivität ausgeht, wurde die gesamte Region vor das *lacZ*-Gen des Plasmids pTL61T (Linn und St. Pierre, 1990) kloniert (Abb. 9). Dabei wurde ca. 93% der „multiple cloning site“ in pTL61T entfernt, um die Hintergrundexpression des *lacZ* zu reduzieren. Die Plasmide wurden im *E. coli*-Stamm BT124 ($\Delta lacZ$) etabliert. Das Plasmid, in dem die vermuteten *endA*-Promoter die *lacZ*-Transkription initiieren können, wurde pMJ24 genannt, und das Kontrollplasmid mit der teildeletierten „multiple cloning site“ wurde mit pTL61Ta bezeichnet.

Die β -Galaktosidase-Menge in den Klonen mit pMJ24, pTL61T und pTL61Ta wurde, wie in 4.17 beschrieben, ermittelt. Gleichzeitig wurde der Anteil der plasmidhaltigen Zellen durch paralleles Ausplattieren auf selektivem und nicht-selektivem Medium bestimmt. Die Expression der β -Galaktosidase war in BT124 pMJ24 fünfmal so groß (745 EE) wie bei der Kontrolle BT124 pTL61Ta (149 EE), und in BT124 pTL61T wurden 499 EE β -Galaktosidase gemessen. In allen Kulturen waren mehr als 90% der Zellen

Ampicillin-resistent, besaßen also ein Plasmid. Diese Ergebnisse zeigen, daß die klonierte Region des *endA* eine Promoteraktivität besitzt, die in den untersuchten Zellen der exponentiellen Wachstumsphase allerdings nur relativ schwach war. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die mit Endo I-überproduzierenden Zellen erzielt wurden. Offenbar findet beim Übergang von der lag- in die log-Phase eine Repression des *endA*-Gens statt (vergl. 5.1.2). Erfolgt die Regulation auf Transkriptionsebene, dann ist die *endA*-Promoterregion des pMJ24 in Zellen der log-Phase reprimiert, sodaß nur geringfügig mehr β -Galaktosidase produziert wird als in Zellen mit dem Vektorplasmid.

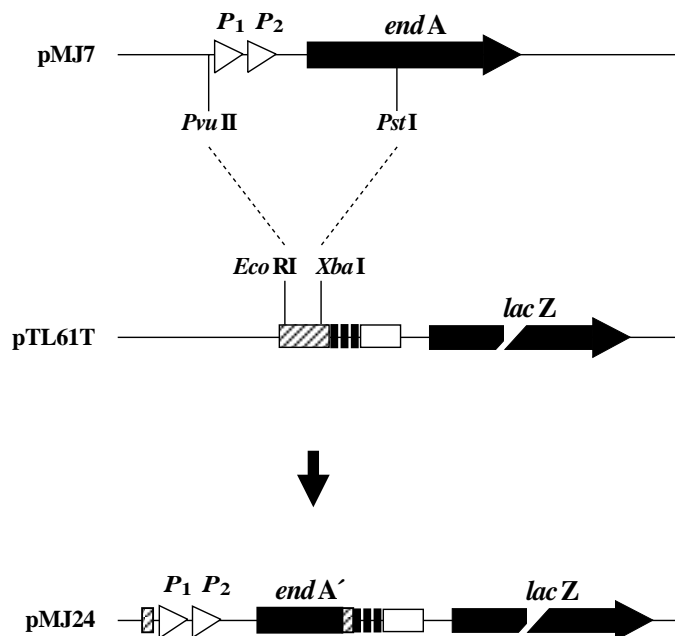


Abb. 9: Klonierung der *endA*-Promoterregion in pTL61T. *endA*: für die Endonuklease I von *E. coli* kodierende Nukleotidsequenz; *lacZ*: für die β -Galaktosidase von *E. coli* kodierende Nukleotidsequenz (es ist nur das 5'- und das 3'-Ende des *lacZ* dargestellt); P_1 , P_2 : Nukleotidsequenzbereiche mit Homologie zu σ^{70} -Promotern von *E. coli*; *endA'*: für den aminoterminalen Teil der Endonuklease I von *E. coli* kodierende Nukleotidsequenz; horizontale Pfeile geben die Position und Transkriptionsrichtung von proteinkodierenden Regionen an; Dreiecke zeigen die Position und Orientierung der Promoter; Rechtecke symbolisieren die „multiple cloning site“ (schraffiert), die RNase III-Schnittstelle und Stopcodons in allen drei Leserahmen (schwarze Füllung); horizontale Linien stellen einen Teil der Nukleotidsequenz von Plasmiden dar; vertikale Linien zeigen die Position von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

Suizidsysteme mit Endonuklease I als Tötungsfunktion

5.5 Die Anwendung der Endo I in einem Suizidsystem für *E. coli*

In dieser Arbeit wurde ein kontrollierbares System entwickelt, das ein effizientes Abtöten der Zellen durch intrazelluläre DNA-Degradierung bewirkt. Hierzu wurde das *endA*-Gen, das die periplasmatische Endo I von *Escherichia coli* kodiert, erfolgreich verwendet (Jekel und Wackernagel, 1996). Vom primären Translationsprodukt des *endA*-Gens wird nach dem Transport durch die Zellmembran ein Signalpeptid abgespalten, das aus 22 Aminosäuren besteht (s. 5.2.1). Damit Endo I nicht mehr exportiert wird, sondern ein intrazellulär aktives Enzym entsteht, wurde die Signalpeptid kodierende Sequenz aus dem *endA*-Gen entfernt. Dem verkürzten Gen (*endAΔL*) wurde eine Ribosomenbindestelle (RBS) zugefügt, und es wurde schließlich unter die Kontrolle des P_L -Promoters (P_L) vom Phagen λ gestellt. Dieser Promoter besitzt ein extrem niedriges Basalniveau der Expression (Lanzer und Bujard, 1988) und ist daher besonders gut für die Kontrolle toxischer Gene geeignet.

5.5.1 Konstruktion des Suizidsystems mit dem Kill-Gen *endAΔL* unter Kontrolle des λ - P_L -Promoters

Zunächst wurde das Signalpeptid der Endo I entfernt, indem die Nukleotidsequenz, die für das prozessierte Protein kodiert, in die Expressionskassette des Plasmids pET81F+ (Tanhauser et al., 1992) kloniert wurde. Hierfür wurde das *EaeI/TfiI*-Fragment aus pMJ8 in das mit *NcoI* und *BamHI* geschnittene pET81F+ inseriert (Abb. 10). Da die einzelsträngigen DNA-Enden des Vektors vor der Ligation mit Klenow-Polymerase aufgefüllt wurden, ist das erste Kodon des reifen Proteins mit dem Startkodon der Expressionskassette im korrekten Leserahmen verbunden. Außerdem stellt das pET81F+ eine RBS, den $\Phi 10$ -Promoter ($P_{T7\Phi 10}$) und einen Transkriptionsterminator des Phagen T7 bereit. Das entstandene Plasmid wurde pMJ18 genannt. Die Transkription des Expressionssystems erfolgt durch T7-RNA-Polymerase, deren Gen im Chromosom von *E. coli* lokalisiert ist und vom P_{lac} kontrolliert wird (Studier und Moffat, 1986). Der verwendete Wirtstamm DH5 α kodiert jedoch keine T7-RNA-Polymerase, sodaß das *endAΔL* nicht exprimiert wird und von ihm keine toxische Wirkung ausgehen kann. Die Induktion des T7-Expressionssystems durch T7-RNA-Polymerase wirkt auch dann letal, wenn allein der $P_{T7\Phi 10}$ in hoher Kopiezahl vorliegt (Tabor und Richardson, 1985). Vermutlich ist die hohe Transkriptionsinitiation durch die überproduzierte T7-RNA-Po-

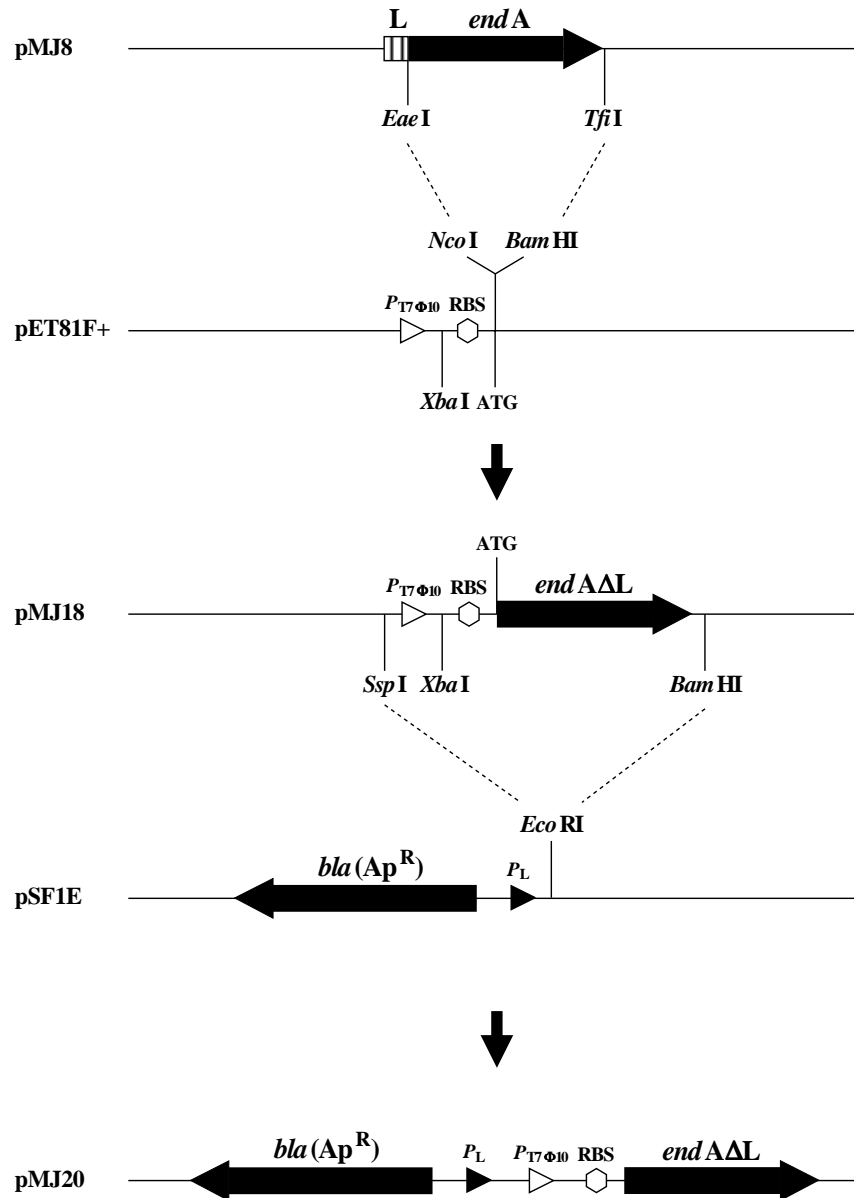


Abb. 10: Deletion des Signalpeptids der Endo I und Konstruktion des Suizidplasmids pMJ20. *endA*: für die Endo I kodierende Nukleotidsequenz; L: für das Signalpeptid der Endo I kodierende Nukleotidsequenz; *endAΔL*: für das reife Protein der Endo I kodierende Nukleotidsequenz; *bla*(Ap^R): für die β -Laktamase (Ampicillin-Resistenz) von pBR322 kodierende Nukleotidsequenz; $P_{17\Phi10}$: $\Phi10$ -Promoter des Phagen T7; RBS: Ribosomenbindestelle; P_L : linker Promoter des Phagen λ ; horizontale Pfeile geben die Position und Transkriptionsrichtung von proteinkodierenden Regionen an; die für das Signalpeptid kodierende Nukleotidsequenz ist durch ein schraffiertes Rechteck dargestellt; Dreiecke zeigen die Position und Orientierung der Promoter; Achtecke geben die Position der RBS an; horizontale Linien stellen einen Teil der Nukleotidsequenz von Plasmiden dar; vertikale Linien zeigen die Position von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

lymerase hierfür der Grund. Eine Untersuchung der zelltötenden Wirkung nach Induktion des *endAΔL* wäre mit diesem Expressionssystem nicht möglich. Daher wurde das *endAΔL* unter die Kontrolle des P_L im Plasmid pSF1E gestellt (Abb. 10). Werden nicht-

toxische Gene in diesem Expressionssystem induziert, dann wirkt sich dies nicht letal aus (Ahrenholtz et al., 1994b). Als Wirtstamm diente TGE900 (Courtney et al., 1984), der ein chromosomal lokalisiertes Allel des thermosensiblen λ -Repressors (*cI857*) besitzt. Die Expression des *endA Δ L* ist in diesem Stamm bei 28°C reprimiert und kann durch Temperaturerhöhung auf 42°C induziert werden. Die Funktion der Suizidkassette in den bei 28°C selektierten Transformanten wurde durch paralleles Ausstreichen und anschließender Inkubation bei 28°C bzw. 42°C überprüft. Die Klone, bei denen das *endA Δ L* in korrekter Orientierung stromabwärts des P_L inseriert war und die eine intrazellulär aktive Endo I produzierten, wuchsen nur bei 28°C. Von 51 untersuchten Transformanten waren 11 thermosensibel. Die Restriktionsanalyse der Plasmide ergab, daß in allen thermosensiblen Klonen die Orientierung des *endA Δ L* und des P_L identisch ist. Das Plasmid wurde pMJ20 genannt.

Zwischen dem P_L und der RBS in pMJ20 befindet sich noch der $P_{T7\Phi10}$. Außerdem kann die mRNA dieses Bereiches eine Haarnadelstruktur ausbilden, die die Translation und die Stabilität der mRNA beeinflussen kann (Studier et al, 1990). Um den Einfluß der Region auf die Wirksamkeit des Suizidsystems zu untersuchen, wurde das *endA Δ L* ohne den $P_{T7\Phi10}$ (*XbaI/BamHI*-Fragment aus pMJ18, s. Abb. 10) in pSF1E kloniert. Von 48 untersuchten Transformanten des TGE900 waren 13 thermosensibel. Die Restriktionsanalyse zeigte, daß in den Plasmiden von 11 thermosensiblen Klonen ein *endA Δ L*-Fragment in korrekter Orientierung inseriert war (pMJ21). Die beiden anderen thermosensiblen Klone besaßen Plasmide mit zwei *endA Δ L*-Fragmenten in Tandemanordnung und korrekter Orientierung bezüglich des P_L (pMJ22).

5.5.2 Überleben verschiedener *E. coli* -Stämme nach Induktion des Suizidsystems

Das Überleben des TGE900 mit den Plasmiden pMJ20, pMJ21, pMJ22 oder mit dem Kontrollplasmid pSF1E nach der Thermoinduktion wurde bestimmt (s. 4.15). Mit dem pMJ20 nahm das Überleben der Zellen rasch ab und war nach 1 h bei 42°C ca. 1×10^{-5} (Abb. 11). Eine längere Inkubation bei 42°C verringerte das Überleben nicht wesentlich, der Lebendtitel stieg jedoch auch nicht wieder an, wie es nach der Induktion eines entsprechenden Suizidsystems mit der *Serratia*-Nuklease beobachtet wurde (Ahrenholtz et al., 1994b). Selbst nach 24 h bei 42°C war das Überleben des TGE900 pMJ20 unverändert gering. Es fand hingegen keine Zelltötung statt, wenn TGE900 pMJ20 durchgehend bei 28°C inkubiert wurde. Enthielten TGE900-Zellen Konstrukte, die anstatt des *endA Δ L* das nicht-toxische *ssb*-Gen von *E. coli* (pSF1) bzw. keine proteinkodierende Sequenz (pSF1E) inseriert haben, war die Vermehrung nach der Thermoinduktion jedoch nur geringfügig bzw. nicht beeinträchtigt (Ahrenholtz et al, 1994b). Dies bedeutet,

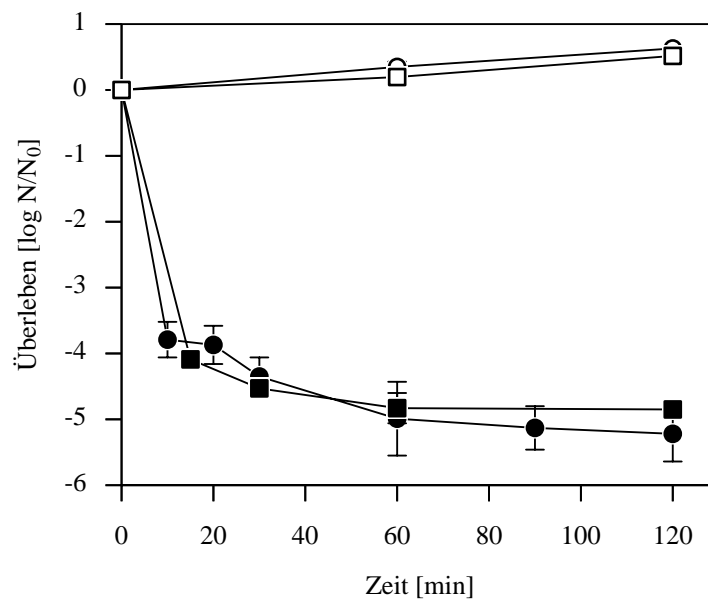


Abb. 11: Überleben der *E. coli*-Stämme TGE900 (*recA*⁺) pMJ20 und AH1 (*recA*) pMJ20 nach Thermoinduktion (●,■) oder ohne Induktion des Suizidsystems (○,□). Kreise symbolisieren das Überleben von TGE900 pMJ20, und Quadrate stellen das Überleben von AH1 pMJ20 dar. Die Durchführung und Auswertung der Experimente erfolgte wie in 4.15 beschrieben. Zur Induktion des Suizidsystems wurden die Zellen vorübergehend (0-120 min) bei 42°C anstatt bei 28°C inkubiert. Es sind die Mittelwerte aus zwei (AH1) bzw. drei (TGE900) unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Abweichung vom Mittelwert bzw. die Standardabweichung an.

daß die abtötende Wirkung beim TGE900 pMJ20 ausschließlich auf die thermische Derepression des *endAΔL* zurückzuführen ist und nicht durch die Induktion einer anderen Aktivität oder durch die hohe Proteinproduktion an sich zustande kommt.

Fehlt die T7Φ10-Region vor dem *endAΔL* (pMJ21), ist das Überleben nach der Thermoinduktion deutlich höher als das Überleben induzierter Zellen mit der T7Φ10-Region (pMJ20). Nach 1 h bei 42°C ist das Überleben ca. um den Faktor 2300 und nach 2 h immer noch ca. sechzigfach höher. Mit zwei *endAΔL*-Genen ohne T7Φ10-Region in Tandemanordnung (pMJ22) nähert sich das thermoinduzierte Abtöten der Zellen zwar der Abtötung mit pMJ20, das Überleben ist aber immer noch ca. zwanzigfach höher. Die Ergebnisse zeigen, daß die T7Φ10-Region die Abtötungseffizienz erhöht. Möglicherweise bewirkt die von der Region kodierte Haarnadelstruktur eine erhöhte Stabilität der mRNA, oder die Region fördert die Translationsinitiation, sodaß nach der Thermoinduktion eine stärkere Endo I-Produktion stattfindet. Die erhöhte Kopiezahl des *endAΔL* in Zellen mit pMJ22 kann wiederum eine gesteigerte Abtötungseffizienz bewirken, da mehr Endo I als in Zellen mit pMJ21 gebildet wird. Vermutlich ist die Endo I-Konzentration im Falle des duplizierten *endAΔL* jedoch nicht doppelt so hoch wie in Zellen mit

nur einem *endAΔL* im Suizidsystem. Bei einer Poisson-Verteilung der Doppelstrangbrüche im Chromosom ist nach der Verdopplung der nukleolytischen Aktivität eine abtötende Wirkung zu erwarten, die dem Produkt der Zelltötung aus zwei unabhängig wirkenden Systemen mit jeweils einem *endAΔL* entspricht. Dies ist beim Vergleich des minimalen Überlebens mit pMJ21 ($3,8 \times 10^{-4}$) bzw. pMJ22 ($1,1 \times 10^{-4}$) jedoch nicht der Fall. Möglicherweise werden die *endAΔL*-Gene des pMJ22 verschieden stark translatiert. Werden beide Genkopien des *endAΔL* in eine gemeinsame mRNA transkribiert, könnte an der frei zugänglichen RBS am 5'-Ende der mRNA häufiger eine Translation initiiert werden als an der RBS in der Mitte der mRNA.

Mit einer *recA*-Mutante des TGE900 (AH1, Ahrenholtz et al., 1994b) wurde untersucht, ob Doppelstrangbrüche auch in Zellen mit reprimiertem *endAΔL* erzeugt werden und ob die DNA-Reparaturfähigkeit der Zelle die Abtötungseffizienz vermindern kann. Doppelstrangbrüche in der DNA führen zum Verlust der Vermehrungsfähigkeit von Zellen. Sie können jedoch von dem *recA*-abhängigen Rekombinationssystem in *E. coli* repariert werden. Mutanten ohne intaktes RecA-Protein sind daher besonders empfindlich gegenüber Agenzien, die Strangbrüche in der DNA erzeugen (Sargentini und Smith, 1986). Sollte die intrazelluläre Endo I auch in uninduzierten Zellen Doppelstrangbrüche erzeugen, dann würde dies bei einer *recA*-Mutante zu einer geringeren Wachstumsrate als beim Wildtyp führen, und es ist eine größere Empfindlichkeit gegenüber einer Thermoinduktion des Suizidsystems zu erwarten. Nach der Transformation des AH1 mit pMJ20 (4.5) wurde die *recA*-Mutation der thermosensiblen Transformanten durch Bestimmung der UV-Sensibilität überprüft (4.18) und das Überleben der Klone bei 28°C bzw. 42°C bestimmt (4.15). Das Überleben der *recA*-Mutante AH1 pMJ20 und des Wildtyps TGE900 pMJ20 war nach der Thermoinduktion identisch (Abb. 11). Die geringere Wachstumsrate des AH1 pMJ20 bei 28°C ist typisch für *recA*-Mutanten. Sie wurde auch bei AH1 pSF1E (Vektor) beobachtet (Ahrenholtz et al., 1994b). Dies bedeutet, daß die intrazelluläre Endo I, die durch das Basalniveau der Expression vom P_L bei 28°C gebildet wird, nur äußerst selten oder keine Doppelstrangbrüche erzeugt. Offenbar ist die Endo I-Menge bei 28°C noch so gering, daß alle Moleküle des Enzyms sehr wirksam durch intrazelluläre RNA (z.B. freie tRNA) inhibiert werden. Erst bei einer starken Überexpression des *endAΔL* nach der Thermoinduktion reicht die frei verfügbare RNA in den Zellen nicht mehr aus, um die doppelstrangbrechende Aktivität der Endo I effizient zu inhibieren. Folglich kommt es zur Abtötung der Zellen, weil die Anzahl der erzeugten Doppelstrangbrüche die Reparaturkapazität der Zelle überschreitet.

Während oder nach der Inkubation bei 42°C ist keine mikroskopisch erkennbare Lyse der Zellen eingetreten. Offenbar führt die Thermoinduktion des Suizidsystems nicht zu einer Freisetzung der zellulären DNA in die Umwelt.

5.5.3 Charakterisierung der überlebenden Klone

Von den Zellen des TGE900 pMJ20 überlebten nur ca. 0,001% die Thermoinduktion des Suizidsystems. Diese Überlebenden konnten keine plasmidfreien Segreganten sein, da sie auf LB mit Ampicillin wuchsen. Die Zahl der Überlebenden war ca. zwanzigfach höher, wenn die Zellen der thermoinduzierten Kultur auf LB ohne Ampicillin plattiert wurde. Das heißt, daß ohne Selektion ca. 0,02% der Zellen einer thermoinduzierten Kultur noch Kolonien bilden können, von denen ca. 95% das Suizidplasmid segregiert haben und dadurch der Tötung entkommen.

Es wurde untersucht, ob die überlebenden Klone mit dem Suizidplasmid durch eine Mutation thermoresistent geworden sind oder eine unzureichende Induktion des Suizidsystems der Grund für das Überleben war. Hierfür wurden Ampicillin-resistente Klone von TGE900 pMJ20, die eine sechzigminütige Inkubation bei 42°C überlebt haben, in drei aufeinander folgenden Durchgängen parallel auf selektivem LB ausgestrichen und bei 28°C bzw. 42°C inkubiert. Von scheinbar weniger thermosensiblen Klonen wurde das Überleben nach Thermoinduktion genauer bestimmt (s. 4.15). Bei nur 5 der 35 untersuchten Klone war der Verlauf der Abtötung im Vergleich zum Ausgangsstamm verändert (Tab. 8). Vier dieser Klone (Nr. 2, 7, 14, 20) zeigten nach 1 h bei 42°C ein mindestens zehnfach höheres Überleben, und der Lebendtitel stieg im Gegensatz zum TGE900 pMJ20 nach längerer Inkubation bei 42°C wieder an. Der Phänotyp dieser Klone wurde mit „mittel resistent“ bezeichnet. Die Abtötung eines Klons (Nr. 18) war zwar

Tab. 8: Thermoinduziertes Abtöten von TGE900 pMJ20-Klonen, die eine Induktion des Suizidsystems überlebt haben*

Stamm bzw. Mutanten-Nr. von TGE900 pMJ20	Phänotyp	Überleben [N/N ₀] nach Thermoinduktionszeit	
		1 h	2 h
TGE900 pMJ20	sensibel	1 x 10 ⁻⁵	6 x 10 ⁻⁶
2	mittel resistent	1,6 x 10 ⁻⁴	4,6 x 10 ⁻⁴
7	mittel resistent	1,4 x 10 ⁻⁴	3,6 x 10 ⁻⁴
14	mittel resistent	1,2 x 10 ⁻⁴	1,6 x 10 ⁻⁴
18	gering resistent	6 x 10 ⁻⁴	1,9 x 10 ⁻⁵
20	mittel resistent	9,6 x 10 ⁻⁵	1,8 x 10 ⁻⁴
TGE900 pSF1E	resistent	2	4,2

* Zellen von *E. coli*-TGE900 pMJ20 wurden, wie in 4.15 beschrieben, thermoinduziert. Die Klone, die eine Inkubation für 1 h bei 42°C überlebten, wurden parallel ausgestrichen und bei 28°C bzw. 42°C inkubiert. Von solchen Klonen, die weniger thermosensibel als TGE900 pMJ20 waren, wurde erneut das Überleben nach Thermoinduktion bestimmt (4.15).

deutlich verlangsamt, aber nach 2 h bei 42°C überlebten ebenso wenig Zellen wie beim Ausgangsstamm. Der Phänotyp des Klons ist „gering resistent“. In einer gelelektrophoretischen Analyse unterschied sich die Größe der Plasmide aus den gering und mittel resistenten Klonen nicht vom pMJ20. Größere Deletionen konnten daher als Ursache für das schlechtere Abtöten der Zellen ausgeschlossen werden, nicht aber kleinere Deletionen oder Punktmutationen. Theoretisch könnte außer der Mutation des Suizidplasmids auch eine Mutation des Bakterienchromosoms das verbesserte Überleben bewirken. Eine Mutation des chromosomalen *cI857*-Gens könnte z. B. zur Produktion eines weniger thermosensiblen Repressors führen, oder es könnte eine Überproduktion des CI-Repressors aufgrund einer Mutation in Promoterbereichen vor dem *cI857* eingetreten sein. Nach der Untersuchung von ähnlich resistenten Überlebenden des entsprechenden Suizidsystems mit der *Serratia*-Nuklease als Tötungsfunktion wurde jedoch eine Veränderung des Bakterienchromosoms als Ursache für ein verbessertes Überleben ausgeschlossen (Ahrenholtz et al., 1994b). Dies ist vermutlich auch für die teilresistenten Klone des TGE900 pMJ20 zutreffend.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ca. 85% der Zellen, die die Thermoinduktion überlebten und das Suizidplasmid besitzen, aufgrund einer unzureichenden Induktion des *endAΔL* dem Tötungsprozeß entkommen sind. Nur ein geringer Teil der Überlebenden war dauerhaft weniger empfindlich gegenüber einer Thermoinduktion. Ein Klon mit einem unwirksamen Suizidsystem wurde jedoch nicht gefunden ($\leq 3\%$).

5.5.4 Intrazelluläre Degradierung der DNA nach Induktion des Suizidsystems

Die Degradierung intrazellulärer DNA, die mit ^3H -Thymidin radioaktiv markiert war, wurde durch Messung des säurepräzipitierbaren Anteils zellulärer DNA bestimmt (s. 4.16). Wurden Zellen von TGE900 mit dem Suizidplasmid pMJ20 (*endAΔL*) bzw. pAH12 (*nucΔL*, Ahrenholtz et al., 1994b) ausschließlich bei 28°C inkubiert, dann war nach 24 h der Anteil säurepräzipitierbarer DNA nahezu unverändert (Abb. 12). Nach der Thermoinduktion der Suizidsysteme fand hingegen ein Abbau der zellulären DNA in säurelösliche Fragmente statt, deren Länge geringer als 16 Basenpaare ist (Cleaver und Boyer, 1992). Die DNA-Degradierung war nach der Induktion des *nucΔL*-Systems deutlich schneller als in Zellen mit induziertem *endAΔL*-System. Der DNA-Abbau setzte in TGE900 pAH12 (*nucΔL*) während der einstündigen 42°C-Inkubation sofort ein, und nach weiteren 2 h bei 28°C war mehr als 80% bzw. nach 24 h mehr als 90% der zellulären DNA von der *Serratia*-Nuklease in säurelösliche Produkte gespalten. In Zellen mit pMJ20 (*endAΔL*) fand in den ersten 3 h keine Degradierung der DNA in säurelösliche Produkte statt, sondern die relative Menge säurepräzipitierbarer DNA nahm zu.

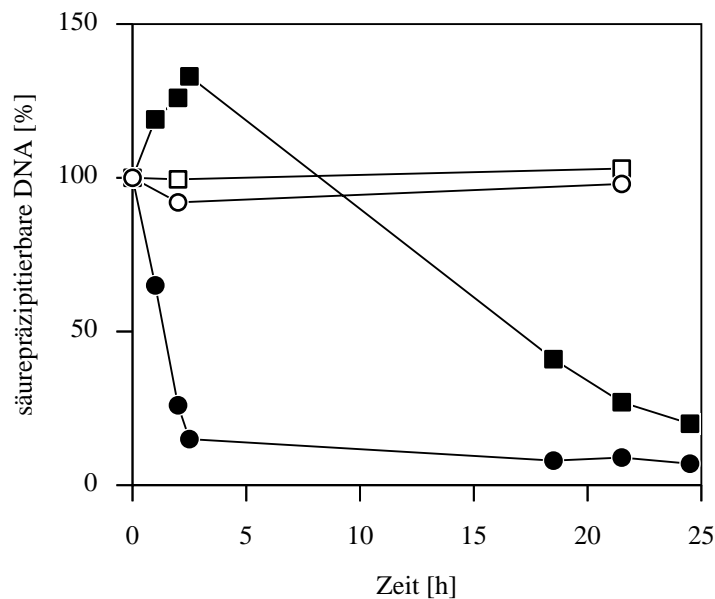


Abb. 12: Intrazellulärer Abbau von zellulärer DNA in *E. coli*-TGE900 mit pAH12 oder pMJ20 nach Thermoinduktion. Die DNA der Zellen wurde mit ^3H -Thymidin bei 28°C markiert (4.16). Nach der Thermoinduktion durch eine Inkubation für 60 min bei 42°C (0-1 h) wurden die Zellen bei 28°C weiter inkubiert (1-24 h), oder die Zellen wurden durchgängig bei 28°C belassen. Zu verschiedenen Zeiten wurde das säurepräzipitierbare ^3H -Thymidin in einer induzierten (●) bzw. uninduzierten Kultur (○) von TGE900 pAH12 und in einer induzierten (■) bzw. uninduzierten Kultur (□) von TGE900 pMJ20 gemessen.

In diesem Zeitraum könnten relativ wenige DNA-Doppelstrangbrüche zwar zu einem rapiden Absterben der Zellen geführt haben (vergl. Abb. 11), aber es entstehen keine säurelöslichen DNA-Fragmente. Der Einbau freier Nukleotide durch fortschreitende Replikation der chromosomalen DNA-Fragmente und noch intakter Plasmide könnte die Zunahme der säurepräzipitierbaren DNA bewirken. Zu einem späteren Zeitpunkt wird die DNA-Degradierung jedoch wirksamer als die Replikation. Erst nach 18 h war ca. 60% der DNA zu säurelöslichem Material umgewandelt. Der Anteil säurepräzipitierbarer DNA sank stetig weiter, bis nach 24 h mehr als 80% und nach 48 h mehr als 90% der DNA von der Endo I abgebaut war. Wahrscheinlich ist die Inhibition des Enzyms durch intrazelluläre RNA (s. 5.5.5) der Grund dafür, daß die DNA nach Induktion des *endAΔL*-Systems langsamer abgebaut wird als bei induziertem *nucΔL*-System.

Mit der Bestimmung des Anteils säurepräzipitierbarer DNA ist es nicht möglich, eine sehr geringe Endonuklease-Aktivität zu bestimmen, und es kann nicht zwischen der Degradierung chromosomaler DNA und Plasmid-DNA unterschieden werden. Anhand der Konformation bzw. der Menge zellulärer Plasmide sollte untersucht werden, ob schon während der Thermoinduktion des *endAΔL* von Endo I Strangbrüche erzeugt werden. Hierfür wurden Zellen von TGE900 pMJ20 thermoinduziert (s. 4.15). Die Plasmid-

DNA wurde nach verschiedenen Induktionszeiten isoliert (s. 4.1) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.3). Sowohl bei 28°C als auch bei 42°C nahm die isolierbare Plasmidmenge kontinuierlich zu. Offenbar ist die Aktivität der Endo I in den ersten beiden Stunden der Thermoinduktion sehr gering. Möglicherweise werden in dieser Zeit zwar Doppelstrangbrüche erzeugt, die zum Zelltod führen, aber die Anzahl ist so gering, daß sie mit der hier angewendeten Methode nicht nachgewiesen werden können. Die Zunahme der Plasmid-DNA könnte bedeuten, daß hauptsächlich das Chromosom das Ziel der Endo I ist und die unversehrten Plasmide in den vermehrungsunfähigen Zellen weiter repliziert werden. Dies wird besonders plausibel, wenn die Größe der Zielmoleküle für die Endo I miteinander verglichen wird. Das pMJ20 ist ein ColE1-Replikon, dessen Kopiezahl mit 20-50 pro Zelle angegeben wird (Sambrook et al., 1989). Dies bedeutet bei einer Plasmidgröße von 4,9 kb, daß in einer Zelle insgesamt ca. 100-250 kb Plasmid-DNA vorliegt. Dem gegenüber befindet sich zum Zeitpunkt der Thermoinduktion ein vielfaches an chromosomaler DNA in einer Zelle. Bei einer ungefähren Chromosomengröße von 4700 kb und ca. 4 Chromosomenkopien in einer Zelle der exponentiellen Wachstumsphase (Bremer und Dennis, 1996) liegt ca. hundertmal mehr chromosomales Substrat als Plasmid-, „target“ für die Endo I vor.

5.5.5 Intrazelluläre Endo I-Aktivität nach Induktion des Suizidsystems

Um nachzuweisen, daß die Expression des *endAΔL* zur Produktion einer intrazellulär aktiven Endo I führt, wurde die Endonuklease-Aktivität in Ultraschallextrakten von thermoinduzierten TGE900-Zellen mit pMJ20 bzw. pSF1E (Vektor) quantifiziert. Im Extrakt der thermoinduzierten Zellen von TGE900 pMJ20 war die spezifische Endonuklease-Aktivität mindestens hundertfach höher als im Extrakt uninduzierter Zellen bzw. in Extrakten der Kontroll-Zellen (Tab. 9). Dies bedeutet, daß nach der Derepression des *endAΔL* aktive Endo I produziert wurde. Außerdem ist zu erkennen, daß in uninduzierten Zellen von TGE900 pMJ20 und AH1 (*recA*) pMJ20 ca. zehnmal soviel Endonuklease-Aktivität vorhanden war wie in uninduzierten Zellen von TGE900 pSF1E. Dies zeigt, daß in Zellen mit reprimierten Suizidsystem eine basale *endAΔL*-Expression stattfindet. Diese Basalexpression der Endo I ist jedoch selbst für solche Zellen unschädlich, die unfähig zur DNA-Reparatur sind, denn bei 28°C fand eine ungehinderte Vermehrung der *recA*-Mutante statt (s. Abb. 11). Vermutlich ist die geringe Menge Endo I in uninduzierten Zellen durch intrazelluläre RNA (z.B. freie tRNA) so stark inhibiert (vergl. 5.2.4), daß von dem Enzym nur sehr selten ein Doppelstrangbruch im Bakterienchromosom erzeugt wird. Dies wird dadurch bestätigt, daß die Endo I-Aktivität der Ultraschallextrakte durch eine RNase-Behandlung erhöht werden konnte (Tab. 9). Der inhibitorische Effekt verringert sich jedoch, wenn die Endo I-Konzentration in der Zelle zu-

Tab. 9: Endonuklease-Aktivität in Extrakten von thermoinduzierten Zellen mit pMJ20 oder pSF1E^a

Stamm	Induktions- temperatur	spezifische Endonuklease-Aktivität [EE _{endo} /mg Protein] ^b	
		- RNase ^c	+ RNase ^c
TGE900 pSF1E	28°C	1	37
	42°C	1	28
TGE900 pMJ20	28°C	10	143
	42°C	1652	6087
AH1 pMJ20	28°C	11	108
	42°C	1174	5652

^a Die Zellen wurden 60 min bei 42°C thermoinduziert oder entsprechend bei 28°C belassen (4.15) und anschließend mit Ultraschall behandelt (4.19). In den Extrakten wurden die endonukleolytische Aktivität (4.13) und der Proteingehalt (4.10) quantifiziert.

^b EE_{endo}: Summe aus DNA-doppelstrangbrechender und -einzelstrangbrechender Aktivität. Die spezifische Endonuklease-Aktivität ist relativ zur spezifischen Aktivität im TGE900 pSF1E-Extrakt (2.200 EE_{endo}/mg Protein) angegeben.

^c Die Extrakte wurden mit oder ohne RNase-Vorbehandlung im Endonuklease-Test eingesetzt.

nimmt. Die RNA in den Extrakten des *endA*-Wildtyps (TGE900 pSF1E) reichte aus, die Aktivität der Endo I um den Faktor 30-40 zu verringern. Die Endo I-Aktivität in Extrakten von uninduzierten Zellen mit pMJ20 war jedoch nur auf ca. ein Zehntel gesenkt, und in Extrakten von induzierten Zellen mit pMJ20 war der inhibitorische Effekt der RNA am geringsten. Möglicherweise wird nach der Thermoinduktion des *endAΔL* die stark überproduzierte Endo I von der unveränderten RNA-Konzentration weniger wirksam inhibiert. Das Enzym kann dann häufig Doppelstrangbrüche in die DNA einführen, die schließlich zum Tod der Zelle führen (vergl. 5.5.2). Vermutlich bewirkt die Inhibition der Endo I in den thermoinduzierten Zellen, daß die Degradierung der intrazellulären DNA in säurelösliche Produkte langsamer ist als nach der Induktion des Suizidsystems mit der *Serratia*-Nuklease (s. 5.5.4). Die *Serratia*-Nuklease wird durch RNA nicht inhibiert, sondern kann sie degradieren (Nestlé und Roberts, 1969).

5.6 Kombination der Suizidfunktion von Endo I und *Serratia*-Nuklease

Die Wirksamkeit der Suizidsysteme mit jeweils einem Nuklease-Gen (*endAΔL* bzw. *nucΔL*) schien durch eine Kombination der Suizidfunktionen verbesserungsfähig zu sein. Das minimale Überleben der Zellen nach der Induktion der Suizidsysteme ist nahezu identisch, aber im Gegensatz zum *endAΔL*-System kommt es im Falle des *nucΔL*-Systems nach einer verlängerten Thermobehandlung zum Wiederanstieg des Zelltiters.

Aufgrund der Inhibition der Endo I durch zelluläre RNA ist die Degradierung der DNA nach der Induktion des *endAΔL*-Systems wesentlich langsamer als in Zellen mit induziertem *nucΔL*-System. Außerdem werden die Plasmide der Zellen selbst von der hohen nukleolytischen Aktivität nach der Induktion des *nucΔL*-Systems ungenügend abgebaut (Ahrenholtz et al., 1994b; Ahrenholtz, 1995). Die koordinierte Expression beider Nuklease-Gene könnte die Wirksamkeit des Suizidsystems verbessern. Die Inhibition der Endo I durch intrazelluläre RNA könnte verringert werden, da die *Serratia*-Nuklease außer DNA auch RNA degradiert (Nestlé und Roberts, 1969). Dies könnte zu einer verbesserten Degradierung der zellulären DNA, also auch der Plasmide, führen. Der überwiegende Teil der Zellen, die die Induktion des Suizidsystems mit einer Nuklease überlebten, produzierte offenbar nicht genügend intrazelluläre Endonuklease-Aktivität (s. 5.5.3). Mit der Nuklease-Kombination wurde eine Verbesserung der Abtötung erwartet, da schon eine geringfügige Induktion des Suizidsystems eine hohe intrazelluläre Endonuklease-Aktivität zur Folge haben sollte. Für einen direkten Vergleich der Wirksamkeit sollte die Kontrolle des Suizidsystems und die Expression des *endAΔL* unverändert bleiben. Daher wurden die Nuklease-Gene in der Reihenfolge *endAΔL-nucΔL* stromabwärts eines gemeinsamen P_L kloniert. Durch die Insertion einer RNase III-Schnittstelle zwischen die Gene sollte eine gleichmäßige Translation der Nukleasen erreicht werden. Die RNase III von *E. coli* führt an diesen RNA-Strukturen spezifisch eine endonukleolytische Spaltung durch (Dunn, 1982), sodaß die Ribosomenbindestellen der Nuklease-Gene frei zugänglich sind und eine unabhängige Translationsinitiation stattfinden kann.

5.6.1 Konstruktion eines Systems zur gleichzeitigen Produktion intrazellulär wirksamer Endo I und *Serratia*-Nuklease

Zunächst wurde das 3'-Ende des *endAΔL* aus pMJ18 mit der RNase III-Schnittstelle des pTL61T verknüpft (Abb. 13). Dabei blieb der $P_{T7\Phi10}$ vor dem *endAΔL* erhalten. Damit keine toxischen Endo I-Konzentrationen in den Zellen entstehen, wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (*endA*; *recA*), der keine T7-RNA-Polymerase produziert, mit dem Ligationsgemisch transformiert. Das Plasmid mit identisch orientiertem *endAΔL* und *lacZ* (ca. 50% der Transformanten) enthält die korrekte Verknüpfung zwischen *endAΔL* und RNase III-Schnittstelle und wurde mit pMJ25 bezeichnet. In „rapid-boiling“-Präparaten (s. 4.1) der rekombinanten Plasmide war unabhängig von der Orientierung des *endAΔL*-Inserts eine erhebliche Endonuklease-Aktivität vorhanden, die in Präparaten von DH5 α mit pTL61T nicht auftrat. Die Endonuklease-Aktivität kann daher nur durch Expression des *endAΔL* erklärt werden. Obwohl keine T7-RNA-Polymerase vorhanden ist, findet vermutlich in dem DNA-Segment mit $P_{T7\Phi10}$ eine Transkriptionsinitiation statt. Ähnli-

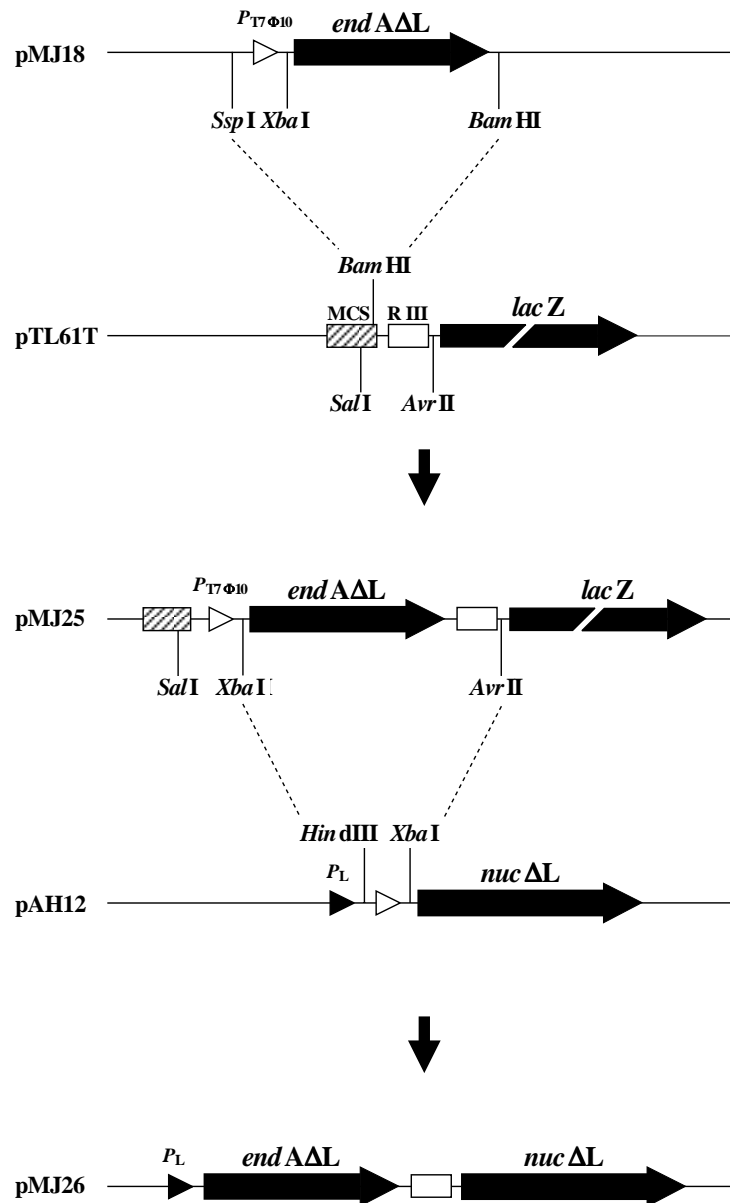


Abb.13: Konstruktion eines Suizidsystems mit *endAΔL* und *nucΔL* unter Kontrolle eines gemeinsamen P_L -Promoters. *endAΔL*: für das reife Protein der Endonuklease I von *E. coli* kodierende Nukleotidsequenz; *nucΔL*: für das reife Protein der extrazellulären Nuklease von *S. marcescens* kodierende Nukleotidsequenz; *lacZ*: für die β -Galaktosidase von *E. coli* kodierende Nukleotidsequenz (es ist nur der Anfang und das Ende des Gens dargestellt); $P_{T7\Phi10}$: $\Phi10$ -Promoter des Phagen T7; P_L : linker Promotor vom Phagen λ . Horizontale Pfeile geben die Position und Transkriptionsrichtung von proteinkodierenden Regionen an; Rechtecke zeigen die Position der „multiple cloning site“ (MCS) bzw. der RNase III-Schnittstelle (RIII) von pTL61T; Dreiecke geben die Position und Orientierung der Promoter an; horizontale Linien symbolisieren einen Teil der Nukleotidsequenz von Plasmiden; vertikale Linien zeigen die Position von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

che Ergebnisse wurden von Somerville et al. (1991) beschrieben. In einem zweiten Klonierungsschritt wurde das *endAΔL* mit der RNase III-Schnittstelle zwischen den P_L und das *nucΔL* in pAH12 kloniert (Abb. 13). Dabei wurden die T7 $\Phi10$ -Regionen vor den

Nuklease-Genen entfernt, damit die vermutete Transkriptionsinitiation ausbleibt und ein minimales Basalniveau der Expression erreicht wird. Um das Basalniveau weiter zu minimieren, wurde der *E. coli*-Stamm BT297 pRK248cIts mit dem Ligationsgemisch transformiert. Dieser Stamm besitzt ein Derivat des Plasmids RK2, dessen Replikon kompatibel zum ColE1-Replikon des Suizidplasmids ist und das ein thermosensibles *cI*-Repressorallel enthält. In diesen Zellen sind beide Replikons gleichzeitig etablierbar, und der *CI*-Repressor wird aufgrund der erhöhten Genkopiezahl überproduziert. Von 12 thermosensiblen Transformanten mit rekombinanten Plasmiden hatten 8 Klone das Insert in der gewünschten Orientierung. Das Plasmid wurde mit pMJ26 bezeichnet.

In weiteren Klonierungen sollte die T7 Φ 10-Region vor den Nuklease-Genen erhalten bleiben. Hierzu wurde das *SalI/AvrII*-Fragment aus pMJ25 in die *HindIII*-Schnittstelle des pAH12 inseriert ($P_{T7\Phi10}$ vor beiden Nuklease-Genen) bzw. das identische *endA Δ L*-Fragment mit dem *XbaI/HindIII*-Fragment des pAH12 ligiert ($P_{T7\Phi10}$ nur vor dem *endA Δ L*). Offenbar sind diese Konstrukte jedoch in Zellen des BT297 pRK248cIts nicht etablierbar, denn keiner der jeweils 100 thermosensiblen Transformanten besaß ein Plasmid mit Insert. Vermutlich ist das Basalniveau der Nukleasen so hoch, daß die Zellen selbst bei reprimiertem P_L getötet werden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß im Bereich des $P_{T7\Phi10}$ eine Transkription in *E. coli* initiiert wird, obwohl keine T7-RNA-Polymerase in den Zellen vorliegt. Außerdem wurde offensichtlich die toxische Wirkung des Suizidsystems durch die Kombination der Nuklease-Gene erhöht. Das Basalniveau der Expression eines Nuklease-Gens mit der T7 Φ 10-Region (pMJ20, pAH12) wird von Zellen mit nur einer *cI*-Kopie (z.B. von TGE900) toleriert. Sind jedoch *endA Δ L*, *nuc Δ L* und eine T7 Φ 10-Region kombiniert, dann ist das Basalniveau sogar in Zellen mit erhöhter *CI*-Produktion (BT297 pRK248cIts) tödlich.

5.6.2 Überleben nach Induktion der Nuklease-Kombination

Um die Wirksamkeit der Suizidsysteme untereinander vergleichen zu können, mußten jeweils identische Bedingungen hinsichtlich der *CI*-Repressor-Situation in den Zellen geschaffen werden. Hierzu wurden die Plasmide pAH12 (*nuc Δ L*), pMJ20 (*endA Δ L*) und pMJ26 (*endA Δ L-nuc Δ L*) in BT297 pRK248cIts (multicopy *cI*) bzw. in TGE900 (monocopy *cI*) etabliert. Das Überleben der Zellen nach der Thermoinduktion der Suizidsysteme ist in Tab. 10 dargestellt.

Spätestens nach einer Stunde bei 42°C ist das Überleben der Zellen mit der Nuklease-Kombination deutlich geringer als das Überleben von Zellen mit einer Nuklease als Tötungsfunktion. Im Stamm BT297 pRK248cIts beträgt der Unterschied ca. eine Größenordnung. Das Überleben des TGE900 pMJ26 ist nach 1h bei 42°C so niedrig, daß bei

Tab. 10: Überleben des TGE900 und BT297 pRK248cIts mit pAH12 oder pMJ26 nach Thermoinduktion

Stamm	Kill-Gene des Suizidsystems ^a	Überleben [$\log N/N_0$] nach Thermoinduktionszeit bei 42°C ^b	
		30 min	60 min
BT297 pRK248cIts pAH12	<i>nucΔL</i>	-1,3 [±0,3]	-1,4 [±0,2]
BT297 pRK248cIts pMJ26	<i>endAΔL-nucΔL</i>	-2,2 [±0,1]	-2,3 [±0,1]
TGE900 pMJ20	<i>endAΔL</i>	-4,4 [±0,3]	-5 [±0,6]
TGE900 pAH12	<i>nucΔL</i>	-4,4 [±0,1]	-4,3 [±0,1]
TGE900 pMJ26	<i>endAΔL-nucΔL</i>	-4,5 [±0,6]	≤-5,4 [±0,3]

^a Signalpeptid-deletierte Strukturgene der Endo I (*endAΔL*), der Serratia-Nuklease (*nucΔL*), oder die Kombination der beiden Gene (*endAΔL-nucΔL*) unter Kontrolle des P_L .

^b Das Überleben der Zellen wurde wie in 4.15 beschrieben ermittelt. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung in Klammern angegeben.

der noch auswertbaren Verdünnung der Kultur keine Kolonien entstehen. Wird eine höher konzentrierte Zellsuspension ausplattiert, können auch plasmidfreie Zellen Kolonien bilden, weil die aus dem Periplasma entweichende β -Laktamase-Menge relativ hoch ist und das Ampicillin im Medium abbaut. Für eine genaue Bestimmung des Überlebens von TGE900 pMJ26 muß daher ein Gen in das Plasmid integriert werden, das eine intrazellulär wirksames Prinzip der Antibiotikum-Resistenz kodiert.

In der Tab. 10 wird deutlich, dass eine Erhöhung der *cI*-Kopiezahl die Wirksamkeit der Suizidsysteme erniedrigt. Zellen mit dem Suizidplasmid und dem pRK248cIts wurden nach der Thermoinduktion ca. tausendfach seltener abgetötet als entsprechende Zellen mit chromosomal lokalisiertem Repressor-Gen. Dieser Effekt tritt sowohl mit der Nuklease-Kombination (pMJ26) als auch mit nur einer Nuklease im Suizidsystem (pAH12) auf. Von den Überlebenden Klonen des BT297 pRK248cIts pAH12 waren ca. 85% (17/20) im Ausstrichtest genauso sensibel wie der Ausgangsstamm, und keiner der getesteten Klone war thermoresistent. Dies zeigt, daß wiederum der größte Teil der Überlebenden ungenügend induziert war und daß die Zellen nicht aufgrund einer Mutation überlebten. Aufgrund der höheren *cI*-Kopiezahl wird in Zellen von BT297 pRK248cIts mehr Repressor gebildet als in TGE900-Zellen. Möglicherweise wird durch die 42°C-Behandlung ein konstanter Teil der Repressoren nicht inaktiviert, sodaß mit Zunahme der Repressor-Menge in den Zellen die Anzahl noch aktiver Repressor-Moleküle ansteigt. Bleibt die P_L -Anzahl gleichzeitig unverändert, dann erhöht sich die Chance, daß trotz der Induktionsbedingungen eine tödliche Nuklease-Produktion ausbleibt.

Die Erhöhung der Kopiezahl des Repressor-Gens verbessert die Lebensfähigkeit der Zellen mit reprimiertem Suizidsystem. Dies wird besonders im Fall der Nuklease-Kombination deutlich. In einer bei 28°C exponentiell wachsenden Kultur von TGE900

pMJ26 waren nur ca. 50% der mikroskopisch erkennbaren Zellen koloniebildungsfähig. Der Anteil vermehrungsfähiger Zellen betrug hingegen mindestens 90%, wenn das Suizidsystem nur ein Nuklease-Gen enthielt oder pMJ26 mit pRK248cIts zusammen in der Zelle etabliert war. Ähnliche Unterschiede bestehen auch bezüglich der Vermehrungsgeschwindigkeit bei 28°C und der Lagerfähigkeit der Zellen bei 4°C. Einerseits ist die Basalexpression der Suizidfunktionen in Zellen mit chromosomalem Repressor-Gen offenbar so hoch, daß die hochtoxische Nuklease-Kombination häufig zum Zelltod führt. Andererseits kann das Basalniveau des P_L durch eine Überexpression des Repressors so weit gesenkt werden, daß die Lebensfähigkeit der Zellen mit reprimierter Nuklease-Kombination nicht beeinträchtigt ist.

5.7 Verbesserung der Stabilität von plasmidkodierten Suizidsystemen in den Wirtszellen

Die überlebenden Zellen einer thermoinduzierten Kultur von TGE900 mit pMJ20 bzw. pAH12 hatten zu ca. 95% das Suizidplasmid segregiert (s. 5.5.3). Dieses Entkommen der Zellen vom Tötungsprozeß wurde in den bisherigen Untersuchungen durch Selektion der plasmidhaltigen Zellen verhindert. Bei einem großtechnischen Einsatz und bei einer Anwendung des Systems in der Umwelt ist eine Selektion durch Antibiotika hingegen nicht praktikabel. Um die Segregationshäufigkeit auch ohne Antibiotikum möglichst gering zu halten, wurde die *hok/sok*-Region (*parB*) des Plasmids R1 in die Suizidplasmide integriert. Das *parB* gehört zu einer Familie sehr ähnlich strukturierter und funktionell gleicher Genregionen, die die Stabilität von Plasmiden in den Zellen durch postsegregatives Abtöten plasmidfreier Zellen erhöht (Gerdes et al., 1990). Außerdem wurde das Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) durch ein Kanamycin-Resistenzgen (*nptI*) ersetzt. Das *nptI*-Genprodukt ist ausschließlich intrazellulär lokalisiert. Ein extrazellulärer Abbau des Antibiotikums, wie im Falle der Selektion mit Ampicillin, kann nicht stattfinden, sodaß sich plasmidfreie Zellen bei einer Selektion mit Kanamycin keinesfalls vermehren. Dadurch wurde es möglich, sehr geringe Überlebenshäufigkeiten zu bestimmen, weil hochkonzentrierte Zellsuspensionen zur Lebendtitrierbestimmung eingesetzt werden konnten (vergl. 5.6.2).

5.7.1 Integration des *parB* vom Plasmid R1 in die Suizidplasmide

Das *Bam*HI-Fragment aus dem Plasmid pKG1022 (Gerdes, 1988) wurde mit dem *Bsp*HI-Vektorfragment des pSF1E (keine Tötungsfunktion) bzw. mit dem entsprechenden Fragment der Suizidplasmide pMJ20 (*endAΔL*), pAH12 (*nucΔL*) und pMJ26 (*endAΔL-nucΔL*) ligiert (Abb. 14). Die Plasmide mit dem *parB* zwischen dem Ka-

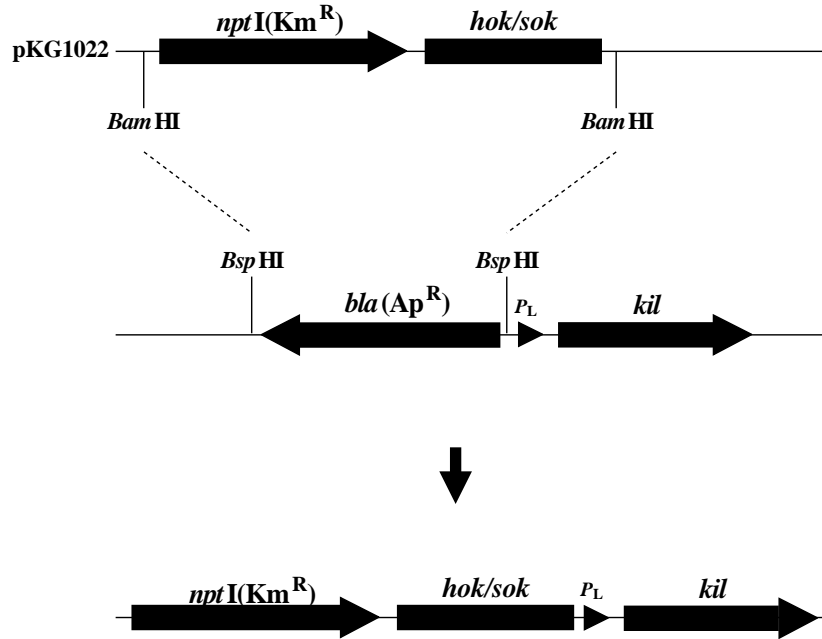


Abb. 14: Integration des *parB*-locus (*hok/sok*) vom Plasmid R1 in die Suizidplasmide.

nptI: für die Neomycin-Phosphotransferase I (Kanamycin-Resistenz) vom Tn903 kodierende Nukleotidsequenz; *hok/sok*: der locus aus dem Plasmid R1, der postsegregatives Abtöten plasmidfreier Zellen vermittelt; *bla*: für die β -Laktamase (Ampicillin-Resistenz) vom Plasmid pBR322 kodierende Nukleotidsequenz; *kil*: Nukleotidsequenz der Suizidfunktionen *endA* Δ L (reifes Protein der Endo I), *nuc* Δ L (reifes Protein der *Serratia*-Nuklease) oder Kombination des *endA* Δ L mit *nuc* Δ L; P_L : linker Promoter vom Bakteriophagen λ . Horizontale Linien symbolisieren einen Teil der Nukleotidsequenz von Plasmiden; vertikale Linien zeigen die Position von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen; horizontale Pfeile geben die Position und Transkriptionsrichtung proteinkodierender Regionen an; das Rechteck zeigt die Position des *hok/sok*; Dreiecke geben die Position und Orientierung von Promotern an.

Suizidfunktion (<i>kil</i>)	Plasmidbezeichnung	
	ohne <i>hok/sok</i>	mit <i>hok/sok</i>
ohne	pSF1E	pMJ27a
<i>endA</i> Δ L	pM20	pMJ28a
<i>nuc</i> Δ L	pAH12	pMJ29a
<i>endA</i> Δ L- <i>nuc</i> Δ L	pMJ26	pMJ30a

namycin-Resistenzgen und dem P_L wurden respektiv pMJ27a, pMJ28a, pMJ29a und pMJ30a genannt und in TGE900 etabliert. Die teilweise Sequenzierung und eine Restriktionskartierung des klonierten Fragmentes ergab, daß das Resistenzgen nicht, wie in der Literatur angegeben, das *nptII* vom Tn5 ist (Gerdes, 1988), sondern das *nptI* vom Tn903 bzw. Tn6 (Oka et al., 1981) ist. Das *nptI* und die Nuklease-Gene sind in den Suizidplasmiden zwar identisch orientiert, aber offenbar erfolgt vom *nptI*-Promoter keine Transkription bis in die Nuklease-Gene, denn auch Zellen mit der extrem toxische Nuklease-Kombination im Suizidplasmid sind lebensfähig.

Die Wirkung des *parB* auf die Stabilität der Suizidplasmide in den Wirtszellen wurde beispielhaft an dem *nuc* Δ L-System untersucht. Hierfür wurde die Segregationshäufigkeit des pAH12 (ohne *parB*) bzw. des pMJ29a (mit *parB*) in Antibiotikum-freien Kulturen von TGE900 bestimmt (s. 4.20). Nach 67 Generationen konnten ca. 0,7% der Zellen

von TGE900 pAH12 bei 42°C Kolonien bilden. Alle der einhundert getesteten thermo-resistenten Klone waren Ampicillin-sensibel, und von acht untersuchten Klonen besaß keiner ein Plasmid. Dies bedeutet, daß alle thermoresistenten Klone das pAH12 segregiert haben. Im Falle des pMJ29a waren nur ca. 0,002% der Zellen nach 67 Generationen thermoresistent. Von diesen Klonen waren ca. 85% Kanamycin-sensibel und Plasmid-frei. Die Klone, die thermo- und Kanamycin-resistent waren, besaßen alle unterschiedlich große Plasmide, die ausnahmslos kleiner waren als das pMJ29a. Dies zeigt, daß die Segregation der Suizidplasmide durch Hinzufügen des *parB* ca. vierhundertfach vermindert wurde. Die Zellen, die bei fehlender Selektion trotz des *parB* der Abtötung dauerhaft entkommen, sind größtenteils Segreganten. Nur ein geringer Teil sind offenbar Mutanten, bei denen größere Deletionen im Suizidplasmid vorliegen.

Ohne Selektion plasmidhaltiger Zellen war das Überleben von TGE900-Zellen mit pMJ20 (*endAΔL* ohne *parB*) nach der Thermoinduktion ca. hundertfach größer als das Überleben unter Selektionsbedingungen (Tab. 11). Ist das *parB* jedoch in den Suizid-

Tab. 11: Überleben von *E.coli*-Zellen mit dem Suizidsystem nach Thermoinduktion unter selektiven und unselektiven Bedingungen^a

Stamm	Suizidsystem ^b	Überleben [N/N ₀] nach 60 min Thermoinduktion	
		+ Antibiotikum	- Antibiotikum
TGE900 pMJ20	<i>endAΔL</i>	2 x 10 ⁻⁵	3,2 x 10 ⁻³
TGE900 pMJ28a	<i>endAΔL-parB</i>	6,3 x 10 ⁻⁵	7,9 x 10 ⁻⁵
TGE900 pMJ29a	<i>nucΔL-parB</i>	1,3 x 10 ⁻⁴	2 x 10 ⁻⁴
TGE900 pMJ30a	<i>endAΔL-nucΔL-parB</i>	1 x 10 ⁻⁶	2 x 10 ⁻⁶
WA385 pMJ36	<i>endAΔL-nucΔL-parB-cI857</i>	2,5 x 10 ⁻⁵	3,3 x 10 ⁻⁵
WA385 pMJ39	<i>endAΔL-nucΔL-parB-cI857</i>	4 x 10 ⁻⁵	1,3 x 10 ⁻⁵

^a Das Überleben der Zellen nach der Thermoinduktion wurde wie in 4.15 beschrieben ermittelt. Entweder war zu jeder Zeit des Experiments ein Antibiotikum zur Selektion plasmidhaltiger Zellen anwesend (+ Antibiotikum), oder das Experiment wurde vollständig ohne Selektion (- Antibiotikum) durchgeführt.

^b Signalpeptid-deletierte Strukturgene der Endo I (*endAΔL*), der Serratia-Nuklease (*nucΔL*), oder die Kombination der beiden Gene (*endAΔL-nucΔL*) unter Kontrolle des *P_L*. Wenn angegeben, dann war die *hok/sok*-Region des R1 (*parB*) bzw. das Repressor-Gen (*cI857*) im Suizidplasmid integriert.

plasmiden integriert, dann ist das Überleben unabhängig von der Selektion. Die Stabilität der Suizidplasmide mit dem *parB* ist offenbar so hoch, daß auch ohne Antibiotikum nur ein minimales Entkommen der Zellen vom Tötungsprozeß möglich ist.

5.7.2 Wirksamkeit der Suizidsysteme mit integriertem *parB*

Überleben nach Induktion der Suizidsysteme. Das Überleben von TGE900-Zellen mit den Suizidplasmiden nach der Thermoinduktion ist in Abb. 15 dargestellt.

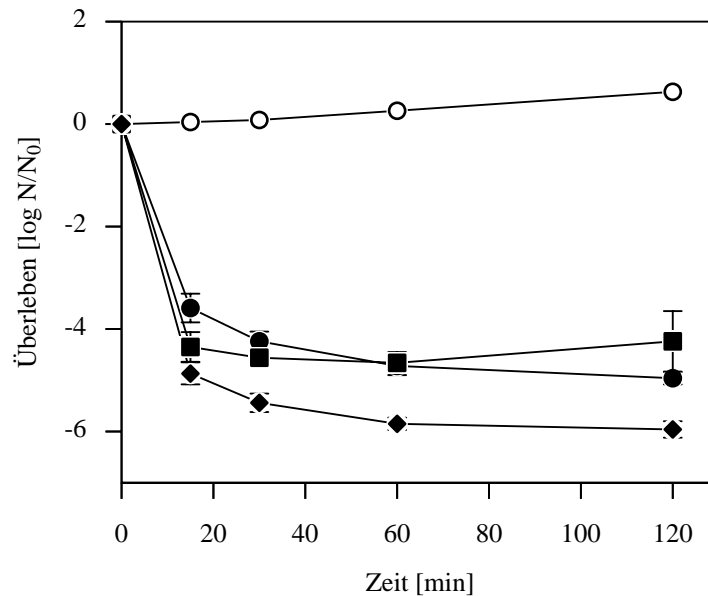


Abb. 15: Überleben des *E. coli*-TGE900 mit *parB*-stabilisierten Suizidplasmiden nach Thermoinduktion. Das Überleben von TGE900-Zellen mit pMJ27a (ohne Suizidfunktion, -○-), pMJ28a (*endA*ΔL, -●-), pMJ29a (*nuc*ΔL, -■-) oder pMJ30a (*endA*ΔL-*nuc*ΔL, -◆-) nach Thermoinduktion wurde, wie in 4.15 beschrieben, ermittelt. Die Induktion der Suizidsysteme erfolgte durch vorübergehende Temperaturerhöhung (0-120 min) von 28°C auf 42°C. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Mit der *Serratia*-Nuklease als Tötungsfunktion (*nuc*ΔL-System) war das Überleben nach 60 min bei 42°C am geringsten ($2,5 \times 10^{-5}$), und bei einer längeren Thermobehandlung stieg der Lebendtitel wieder an. Ist Endo I die Tötungsfunktion (*endA*ΔL-System), nahm das Überleben zwar etwas langsamer ab, aber selbst nach einer zweistündigen Thermoinduktion war bei einem Überleben von nur $1,3 \times 10^{-5}$ noch kein Minimum zu erkennen. Die unterschiedliche Thermostabilität der beiden Nucleasen und die Inhibition der Endo I durch intrazelluläre RNA könnten für den unterschiedlichen Verlauf der Abtötung verantwortlich sein. Bei relativ schwacher Expression der Nuklease-Gene (nach sehr kurzen Induktionszeiten) überleben Zellen mit dem *endA*ΔL-System geringfügig häufiger als Zellen mit dem *nuc*ΔL-System, weil Endo I im Gegensatz zur *Serratia*-Nuklease durch intrazelluläre RNA inhibiert wird. Aufgrund der erhöhten Nuklease-

Produktion nach ca. 60 min bei 42°C ist die Inhibition der Endo I so gering, daß die abtötende Wirkung der beiden Suizidfunktionen identisch ist. Da die *Serratia*-Nuklease thermolabiler als Endo I ist (s. 5.2.2), könnten nach einer zweistündigen 42°C-Behandlung geringfügig induzierte Zellen mit dem *nucΔL* häufiger überleben, als Zellen, die eine geringe Menge der stabileren Endo I produzieren. Möglicherweise ist ein großer Teil der *Serratia*-Nuklease nach 2 h bei 42°C inaktiviert, sodaß es zur Vermehrung dieser Zellen kommt. In gering induzierbaren Zellen mit dem *endAΔL*-System könnte hingegen die Endo I-Aktivität 71stetig zunehmen, da nur wenig Enzym thermisch inaktiviert wird. Mit Verlängerung der Induktion kommt es zu einer weiteren Abtötung der Zellen, die jedoch sehr viel weniger drastisch ist als bei den stark induzierbaren Zellen. Die abtötende Wirkung der Nuklease-Kombination war deutlich größer als bei den Suizidsystemen mit nur einer Nuklease. Das Überleben nahm am schnellsten ab, und nach 2 h bei 42°C war noch kein Minimum zu erkennen, obwohl das Überleben nur noch $1,1 \times 10^{-6}$ betrug. Durch die Kombination der Nuklease-Gene wurde die Abtötung der Zellen jedoch nicht im erwarteten Maße verbessert. Im Falle der Verdopplung der nukleolytischen Aktivität ist bei einer Poisson-Verteilung der letalen DNA-Schäden eine abtötende Wirkung zu erwarten, die dem Produkt der Zelltötung aus zwei unabhängig wirkenden Systemen mit jeweils einem Nuklease-Gen entspricht. Nach 2 h Thermoinduktion eines *endAΔL*-Gens (ohne T7Φ10-Region) beträgt das Überleben $1,1 \times 10^{-4}$ (vergl. pMJ21 in 5.5.2). Nach der Induktion eines Tandems aus zwei *endAΔL*-Genen wurde folglich ein Überleben von ca. 10^{-8} erwartet. Die Beseitigung des intrazellulären Inhibitors der Endo I (RNA) durch die RNase-Funktion der *Serratia*-Nuklease sollte die abtötende Wirkung sogar noch weiter verbessern. Die unerwartet geringe Steigerung der Abtötung könnte folgendermaßen zustande kommen: 1. Die Expression der Nuklease-Gene ist konstruktionsbedingt vermindert. Durch die Insertion der RNase III-Schnittstelle zwischen die Nuklease-Gene ist das 3'-Ende der *endAΔL*- und das 5'-Ende der *nucΔL*-mRNA nicht mit den Enden der mRNA identisch, die nach der Induktion der entsprechenden Suizidsysteme mit einer Nuklease entsteht. Möglicherweise ist dadurch die Translation oder die Stabilität der mRNA vermindert, sodaß nur eine relativ geringe Nuklease-Menge in den Zellen produziert wird. 2. Eine Mutation des Vektors, die eine Verringerung der Plasmid-Kopiezahl oder eine geringere Expression der Nuklease-Gene bewirkt, führt zu einer verminderten Produktion der Nukleasen. 3. Die überlebenden Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Induktion in einem physiologischen Zustand, in dem nur eine unzureichende thermische Inaktivierbarkeit des Repressors möglich oder die Transkription bzw. Translation allgemein sehr eingeschränkt ist. In diesem Fall würden zusätzliche Nuklease-Gene die abtötende Wirkung nicht wesentlich steigern. Die Lebensfähigkeit der Zellen war unbeeinträchtigt, wenn nur das Expressionssystem

(ohne Nuklease-Killfunktion) thermoinduziert wurde (Abb. 15). Dies zeigt, daß die Abtötung der Zellen nach der Thermoinduktion spezifisch durch die Induktion der Nuklease-Gene erfolgt und keine zusätzliche toxische Wirkung vom inserierten *parB* ausgeht.

Intrazellulärer DNA-Abbau nach Induktion der Suizidsysteme. Die Degradierung zellulärer DNA in TGE900 mit pMJ28a (*endAΔL*), pMJ29a (*nucΔL*) oder pMJ30a (*endAΔL-nucΔL*) nach einstündiger Thermoinduktion ist in Abb. 16 dargestellt.

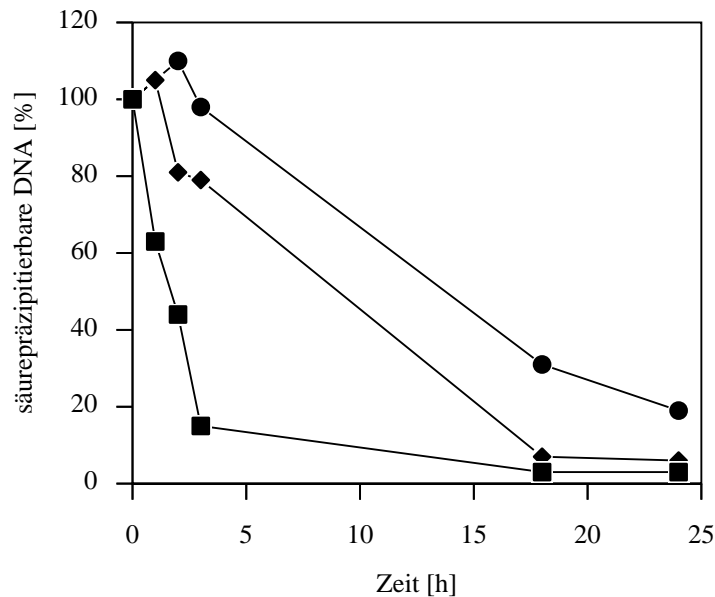


Abb. 16: Intrazellulärer Abbau von zellulärer DNA in *E. coli*-TGE900 mit pMJ28a, pMJ29a oder pMJ30a nach Thermoinduktion. Die DNA der TGE900-Zellen mit pMJ28a (*endAΔL*, -●-), pMJ29a (*nucΔL*, -■-) oder pMJ30a (*endAΔL-nucΔL*, -◆-) wurde mit ^3H -Thymidin bei 28°C markiert (4.16). Nach der Thermoinduktion durch eine Inkubation für 60 min bei 42°C (0-1 h) wurden die Zellen bei 28°C weiter inkubiert (1-24 h). Zu verschiedenen Zeiten wurde das säurepräzipitierbare ^3H -Thymidin in den induzierten Kulturen gemessen.

Die Insertion des *parB* hat keine Auswirkung auf den DNA-Abbau. Nach Induktion der Suizidsysteme, die eine Nuklease kodieren, war die DNA-Degradierung mit oder ohne *parB* im Suizidplasmid identisch (vergl. Abb. 16 und Abb. 12). Wurde die Nuklease-Kombination induziert, verlief der DNA-Abbau im Vergleich zur rapiden oder langsamen DNA-Degradierung durch *Serratia*-Nuklease bzw. Endo I intermediär. Nach 3 h war über 20% der DNA degradiert, und nach 18 h war genauso viel [^3H]-Thymidin säurelöslich wie beim *nucΔL*-System. Möglicherweise ist die Produktion der Endo I bzw. der *Serratia*-Nuklease in Zellen mit der Nuklease-Kombination geringer als in Zellen mit den Suizidsystemen, die nur eine Nuklease kodieren. Aufgrund der geringen Menge *Serratia*-Nuklease und der effizienten Inhibition der Endo I durch intrazelluläre RNA

werden in der DNA nur relativ wenig Doppelstrangbrüche erzeugt. Die Zellen werden folglich zwar getötet, aber es entstehen keine säurelöslichen Spaltprodukte. Wie in den Zellen mit induziertem *endA* Δ L-System kommt es daher zunächst zu einem weiteren Einbau freier Nukleotide (s. 5.5.4). Mit zunehmender Degradierung des Inhibitors der Endo I durch die RNase-Aktivität der *Serratia*-Nuklease steigt die DNase-Aktivität in den Zellen, und könnte größer als in Zellen mit induziertem *endA* Δ L-System sein. Folglich beginnt die Umwandlung der DNA in säurelösliche Produkte mit der Nuklease-Kombination früher und ist wesentlich schneller. Dadurch findet im Vergleich zum *endA* Δ L-System vermutlich zwar ein verbesserter Abbau der Plasmide statt, aber im Vergleich zum *nuc* Δ L-System wird eine langsamere Plasmid-Degradierung erwartet.

5.8 Systeme mit plasmidkodierter Suizidkontrollfunktion

Durch die Lokalisierung des Repressor-Gens (*cI857*) im Chromosom der Bakterienzelle ist die Anwendbarkeit des Suizidsystems sehr beschränkt. Ist ein bestimmter Genotyp eines Bakterienstammes erforderlich, muß zunächst das Repressorallel im Chromosom integriert werden, bevor das Suizidplasmid in den Zellen etabliert werden kann. Mit dem Ziel, eine größere Flexibilität bei der Anwendung des Suizidsystems zu erreichen, wurde das Repressor-Gen in Plasmide kloniert. In einem Kontrollsystem befinden sich das Repressor-Gen und die Suizidfunktion in getrennten Plasmiden, die beide gleichzeitig in einer Zelle existieren können. Im anderen Fall wurde das *cI857* in das Suizidplasmid integriert. Es wurde untersucht, ob durch diese Veränderung der Expressionskontrolle die Wirksamkeit und Induzierbarkeit der Suizidsysteme beeinträchtigt wird.

5.8.1 Integration der Suizidkontrollfunktion in das Suizidplasmid und in kompatible Plasmide

Das *cI857*-Allel vom Phagen λ wurde zunächst in die Plasmide pBBR1MCS (Kovach et al., 1994) und pRK248cIts (Bernard et al., 1979) kloniert, die kompatibel zum ColE1-Replikon der Suizidplasmide sind. Das *Bgl*III-Fragment der zentralen Region einer λ -Mutante (*cI857 sam7*) wurde in die „multiple cloning site“ vom Plasmid pBBR1MCS inseriert (Abb. 17). Das klonierte Fragment enthält neben dem *cI857* die zugehörige *P*_{RM}-Promoterregion und das *rexA*-Gen von λ . Der *P*_R wird wie der *P*_L vom CI-Repressor reguliert. Das *rexA* kodiert eine der Komponenten, die die Superinfektion mit anderen Phagen ausschließen (Snyder, 1995). Das Plasmid, in dem das *cI857* in gleicher Orientierung wie das *lacZ* des pBBR1MCS vorliegt, wurde pMJ31 und das Plasmid mit entgegengesetzter Insertorientierung pMJ31a genannt. Da aus der Literatur nicht hervor-

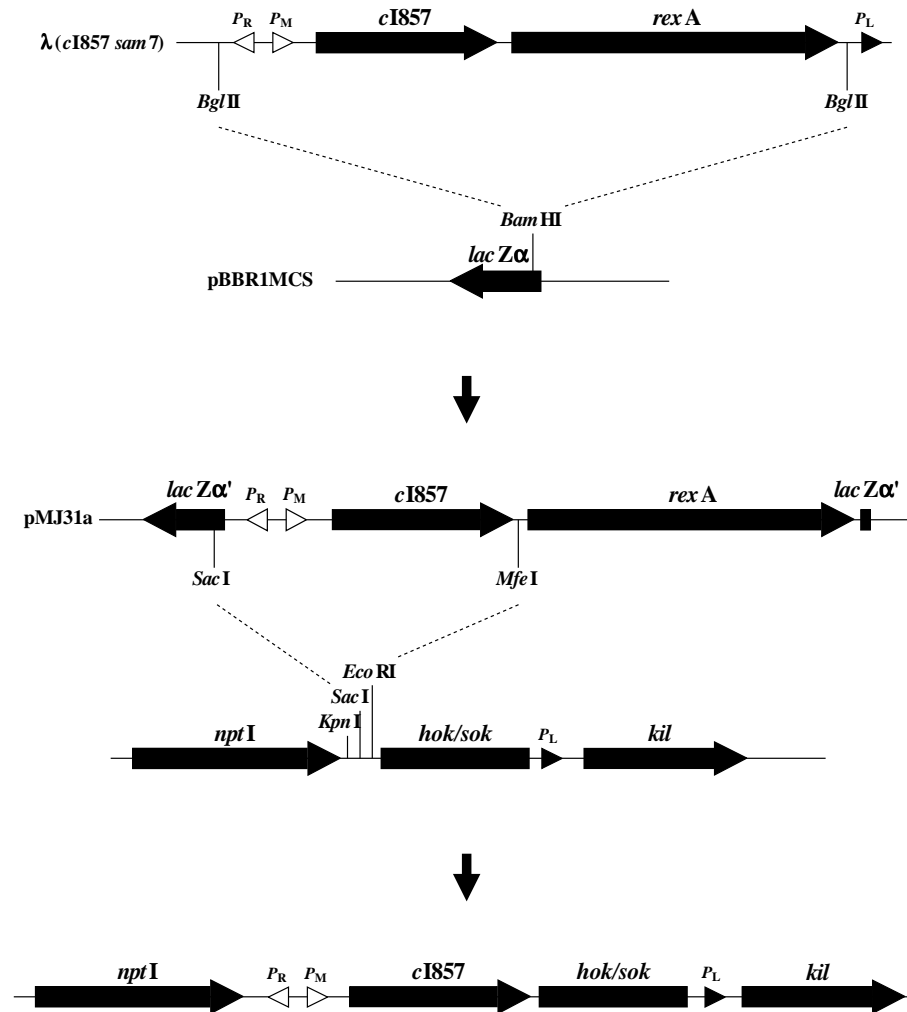


Abb. 17: Konstruktion von Suizidsystemen mit plasmidkodiertem Repressor.

λ : Bakteriophage Lambda; *cI857*: Allel des thermosensiblen CI-Repressors von λ ; P_R : rechter Promotor von λ ; P_L : linker Promotor von λ ; P_M : zentraler Promotor von λ ; *rexA*: für das RexA-Protein von λ kodierendes Gen; *lacZ α* : für das α -Peptid der β -Galaktosidase von *E. coli* kodierende Nukleotidsequenz; *lacZ α '*: Teile von *lacZ α* ; *hok/sok*: Bereich aus dem Plasmid R1, der postsegregatives Abtöten plasmidfreier Zellen vermittelt; *npt*I: für die Neomycin-Phosphotransferase I (Km^R) von Tn903 kodierende Nukleotidsequenz; *kil*: Nukleotidsequenz der Suizidfunktion (*endA Δ L*: für das reife Protein der Endo I kodierende Nukleotidsequenz, *nuc Δ L*: für das reife Protein der *Serratia*-Nuklease kodierende Nukleotidsequenz oder *endA Δ L-nuc Δ L*); horizontale Linien symbolisieren einen Teil der Nukleotidsequenz von Plasmiden bzw. vom λ -Genom; vertikale Linien zeigen die Position von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen; Pfeile geben die Position und Transkriptionsrichtung von protein-kodierenden Bereichen und Dreiecke die Position und Orientierung der Promoter an; das Rechteck symbolisiert die *hok/sok*-Region.

Suizidfunktion (<i>kil</i>)	Plasmidbezeichnung	
	ohne <i>cI857</i>	mit <i>cI857</i>
ohne	pMJ27a	pMJ33
<i>endAΔL</i>	pMJ28a	pMJ34
<i>nucΔL</i>	pMJ29a	pMJ35
<i>endAΔL-nucΔL</i>	pMJ30a	pMJ36

geht, ob das *cI*-Allel des pRK248cIts identisch mit dem *cI857* ist, wurde das *Bgl*III-Fragment des Plasmids durch das oben beschriebene *Bgl*III-Fragment der λ -Mutante ersetzt. Das Plasmid mit der identischen Insertorientierung wie in pRK248cIts wurde pMJ32 und das Plasmid mit entgegengesetzter Insertorientierung pMJ32a genannt. Als Wirts-

stamm wurde DH5 α verwendet, der λ -sensibel ist. Die biologische Aktivität des *cI857* in den Plasmiden wurde nach der Klonierung, wie in 4.21 beschrieben, überprüft. Alle getesteten Klone mit den rekombinanten Plasmiden besaßen ein intaktes *cI857*-Allel. In einer weiteren Klonierung wurde das *cI857*-Allel mit der P_{RM} -Region zwischen die Kanamycin-Resistenz und das *parB* der Suizidplasmide eingefügt (Abb. 17) und zur Transformation des Stammes WA234 eingesetzt. Da die Zellen kein *cI*-Gen besitzen, konnten sich nur Transformanten vermehren, die ein rekombinantes Plasmid enthalten. Von jeweils zehn untersuchten Transformanten besaßen alle das Insert in der Orientierung, bei der keine Transkription vom P_R in das *parB* stattfinden kann. Die Plasmide wurden mit pMJ34 (*endA Δ L*), pMJ35 (*nuc Δ L*) und pMJ36 (*endA Δ L-nuc Δ L*) bezeichnet. Wurde das gleiche Fragment entsprechend in pM27a (ohne Nuklease-Gen) inseriert, war hingegen bei jeweils ca. 50% der Transformanten das Insert wie in den Plasmiden mit den Nuklease-Genen (pMJ33) oder entgegengesetzt orientiert (pMJ33a). Vermutlich sind Zellen mit gleichzeitiger basaler Produktion der Nukleasen und der Tötungsfunktion vom *parB* (*Hok*) nicht lebensfähig. Daher wurde nur die Orientierung des Inserts gefunden, bei der keine Transkription vom P_R ins *parB* erfolgt. Mit dem pMJ33 vermehrten sich die Zellen bei 42°C unbeeinträchtigt. Wurde bei dieser Temperatur jedoch im pMJ33a die Transkription vom P_R ins *parB* induziert, entstanden keine Kolonien. Ein ähnliches Suizidsystem, das eine Zelltötung durch Überexpression des *hok*-Gens vom *parB* verursacht, wurde von Schweder et al. (1992) beschrieben.

5.8.2 Einfluß der Kopiezahl des Repressor-Gens auf die Wirksamkeit der Suizidsysteme

Befindet sich das Repressor-Gen im Suizidplasmid oder in einem kompatiblen Plasmid, wird in den Zellen aufgrund der erhöhten Genkopiezahl eine größere Repressormenge gebildet als in den Zellen mit chromosomal lokalisiertem *cI857* (1 Kopie). Die Auswirkung der erhöhten Repressorkonzentration auf die Abtötungseffizienz und die intrazelluläre DNA-Degradierung wird im folgenden gezeigt.

Einfluß auf die abtötende Wirkung der Suizidsysteme. Mit dem Suizidsystem, das die *Serratia*-Nuklease als Tötungsfunktion kodiert (*nuc Δ L*-System), wurde beispielhaft untersucht, ob die Kopiezahl des Repressor-Gens die abtötende Wirkung beeinträchtigt. Hierfür wurde das Überleben von Zellen mit unterschiedlich lokalisiertem *cI857* nach der Thermoinduktion des *nuc Δ L*-Systems in pMJ29a bestimmt (Abb. 18). Das Überleben war ca. fünfzigfach höher, wenn das *cI857* im Suizidplasmid (WA234 pMJ35) anstatt im Bakterienchromosom (TGE900 pMJ29a) vorlag. Durch die Erhöhung der Kopiezahl des *cI857* wurde die Wirksamkeit des Suizidsystems verschlechtert. Die Ver-

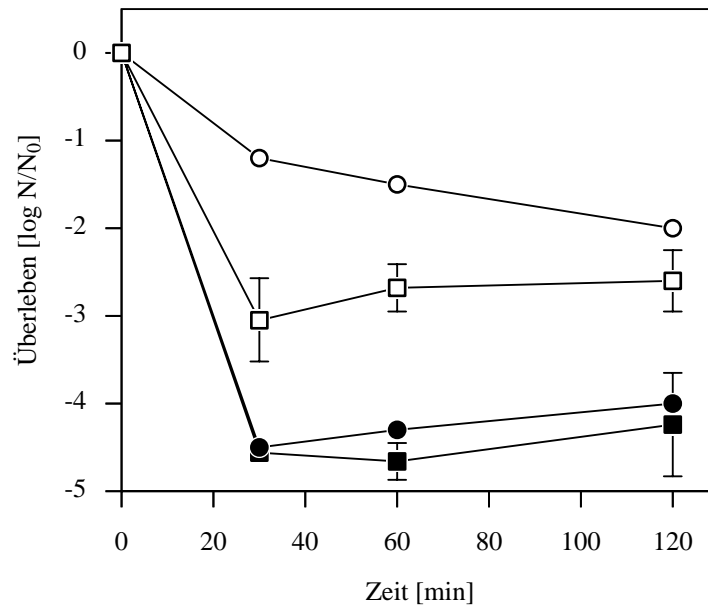


Abb. 18: Überleben von *E. coli* mit dem *nuc*ΔL-Suizidsystem (pMJ29a) und unterschiedlich lokalisiertem Repressor-Gen (*cI857*) nach Thermoinduktion. Das Überleben von TGE900 pMJ29a (chromosomales *cI857*, -■-), WA234 pMJ31 pMJ29a (pBBR1MCS::*cI857*, -●-), WA234 pMJ32 pMJ29a (pRK248::*cI857*, -○-) und WA234 pMJ35 (pMJ29a::*cI857*, -□-) nach Thermoinduktion wurde, wie in 4.15 beschrieben, ermittelt. Zur Induktion des Suizidsystems wurden die Kulturen vorübergehend (0-120 min) bei 42°C anstatt bei 28°C inkubiert. Bei entgegengesetzter Orientierung des *cI857* in den Repressorplasmiden war die abtötende Wirkung identisch. Von TGE900 pMJ29a und WA234 pMJ35 ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

minderung der Abtötungseffizienz entspricht ungefähr der Erhöhung der Kopiezahl des Repressor-Gens. Wird für das pMJ29a die Kopiezahl des ColE1-Replikons angenommen, liegen in den Zellen von WA234 pMJ35 ca. 20-50 Kopien des *cI857* vor (vergl. Sambrook et al., 1989). Folglich ist das stöchiometrische Verhältnis von Repressor zu Promoter deutlich größer als in Zellen von TGE900 pMJ29a. Die meisten Zellen mit chromosomalem *cI857* überlebten eine 42°C-Behandlung, weil das Suizidsystem unzureichend induziert war (s. 5.5.3). Möglicherweise wird durch die Vergrößerung des Verhältnisses von Repressor- zu Promotermenge die Induzierbarkeit noch weiter verringert. War das *cI857* im pRK248-Replikon (pMJ32 bzw. pMJ32a) inseriert, überlebten die Zellen die Thermoinduktion am häufigsten. Vermutlich wird in Zellen mit pMJ32 bzw. pMJ32a die höchste Repressorkonzentration gebildet, da die Kopiezahl des pRK248 am größten ist. Eine verstärkte Expression des *cI857* scheint nicht die Ursache für das verbesserte Überleben zu sein, denn die Abtötung der Zellen war unabhängig von der Orientierung des Repressor-Gens im pRK248. Mit dem Repressor-Gen im pBBR1-Replikon (pMJ31 bzw. pMJ31a) war die Abtötung der Zellen nach der Thermoinduktion genauso effizient wie mit chromosomal lokalisiertem *cI857*. Offenbar liegen hier nahezu

identische Verhältnisse hinsichtlich der Suizidkontrolle vor. Vermutlich ist die Kopiezahl des pBBR1-Derivats deutlich geringer als die Kopiezahl der anderen Plasmide. Die Abtötungseffizienz des Suizidsystems war unabhängig von der kodierten Tötungsfunktion verringert, wenn sich das *cI857* anstatt im Chromosom im Suizidplasmid befand (Tab. 12). Mit dem *cI857* im Suizidplasmid war das Überleben der Zellen nach der

Tab. 12: Überleben von *E. coli* mit verschiedenen Suizidsystemen und unterschiedlicher Lokalisierung des Repressor-Gens nach Thermoinduktion^a

Suizidsystem ^b	Lokalisierung des Repressor-Gens (<i>cI857</i>) ^c	Minimales Überleben nach Thermoinduktion ^d [N N ₀]
ohne Nuklease	Chromosom	>1
<i>endAΔL</i>	Chromosom	1,1 x 10 ⁻⁵
	Suizidplasmid	4,7 x 10 ⁻⁴
<i>nucΔL</i>	Chromosom	2,2 x 10 ⁻⁵
	Suizidplasmid	8,9 x 10 ⁻⁴
<i>endAΔL-nucΔL</i>	Chromosom	1,1 x 10 ⁻⁶
	Suizidplasmid	7,2 x 10 ⁻⁶

^a Das Überleben wurde wie in 4.15 beschrieben ermittelt.

^b Signalpeptid-deletierte Strukturgene der Endo I (*endAΔL*), der Serratia-Nuklease (*nucΔL*), oder die Kombination der beiden Gene (*endAΔL-nucΔL*) unter Kontrolle des *P_L*.

^c Das *cI857* befand sich im Chromosom des *E. coli*-TGE900 mit pMJ27a (ohne Nuklease), pMJ28a (*endAΔL*), pMJ29a (*nucΔL*) oder pMJ30a (*endAΔL-nucΔL*) bzw. war in den entsprechenden Suizidplasmiden pMJ34, pMJ35 oder pMJ36 im *E. coli*-WA234 integriert.

^d Es ist das geringste Überleben nach einer vorübergehenden Temperaturerhöhung (0-120 min) von 28°C auf 42°C angegeben.

Thermoinduktion der Nuklease-Kombination (pMJ36) ca. hundertfach geringer (7,2 x 10⁻⁶) als in Zellen mit induziertem *endAΔL*-System (pMJ34) bzw. *nucΔL*-System (pMJ35). Offenbar ist nur die Nuklease-Kombination für ein Suizidsystem geeignet, in dem die Tötungsfunktion und alle Kontrollelemente in einem Plasmid vorliegen, weil dann auch bei relativ geringer Induzierbarkeit (z. B. durch hohe Repressorkonzentration) noch ausreichend DNase-Aktivität produziert wird, um die Zellen effizient zu töten.

Einfluß auf die intrazelluläre DNA-Degradierung. Ein Suizidsystem, dessen Elemente alle von einem Plasmid kodiert werden, ist sehr flexibel einsetzbar. Da in diesem Fall nur mit der Nuklease-Kombination ein effizientes Abtöten erfolgt, wurde ausschließlich für dieses System geklärt, ob die erhöhte Kopiezahl des Repressor-Gens die DNA-Degradierung in den Zellen beeinträchtigt. Hierzu wurde der DNA-Abbau in induzierten und uninduzierten Kulturen von TGE900 pMJ30a (chromosomales *cI857*) und WA234 pMJ36 (*cI857* im Suizidplasmid) gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt.

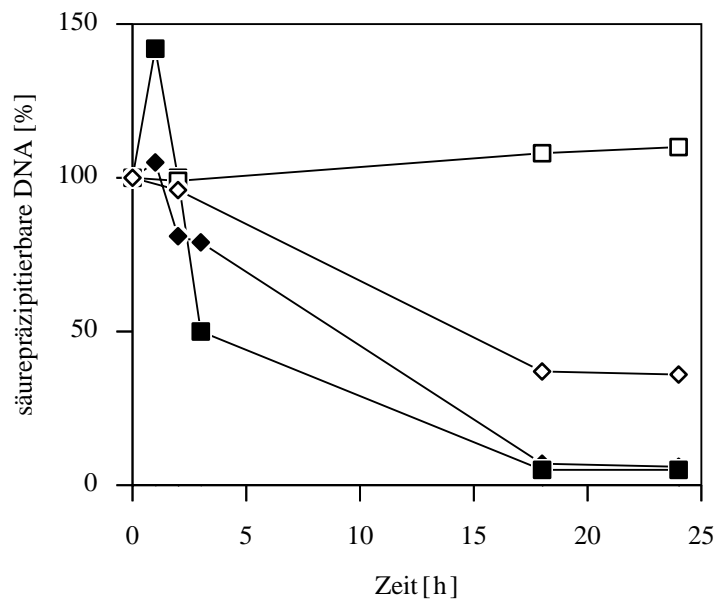


Abb. 19: Intrazellulärer DNA-Abbau in *E. coli*-Zellen mit chromosomal- oder plasmidkodiertem Repressor nach Thermoinduktion der *endAΔL-nucΔL*-Kombination. Die DNA der Zellen wurde mit ^3H -Thymidin bei 28°C markiert (4.16). Nach der Thermoinduktion für 60 min bei 42°C (0-1 h) wurden die Zellen bei 28°C weiter inkubiert (1-24 h), oder die Zellen wurden durchgängig bei 28°C belassen. Zu verschiedenen Zeiten wurde das säurepräzipitierbare ^3H -Thymidin einer induzierten (◆) bzw. uninduzierten Kultur (◇) von TGE900 pMJ30a (chromosomales *cI857*) oder einer induzierten (■) bzw. uninduzierten Kultur (□) von WA234 pMJ36 (*cI857* im Suizidplasmid) gemessen.

Zunächst nimmt die hochmolekulare DNA in den thermoinduzierten Kulturen zu, weil in den Zellen der Einbau freier Nukleotide stärker ist als der Abbau der DNA in säurelösliches Material. Diese Zunahme war größer, wenn das Repressor-Gen im Suizidplasmid integriert ist, da zum Zeitpunkt der Induktion in der Kultur mehr Zellen replikationsfähig sind (> 90% koloniebildungsfähig) als in der Kultur mit chromosomalem *cI857* (ca. 50% koloniebildungsfähig; s. 5.6.2). Erst wenn die maximale Zelltötung erreicht und der Endo I-Inhibitor (RNA) von der *Serratia*-Nuklease ausreichend degradiert ist, überwiegt die Spaltung der DNA in säurelösliche Produkte. Die DNA-Degradierung war dann in der Kultur mit plasmidkodiertem Repressor-Gen schneller (nach 3 h war 50% der DNA säurelöslich) als in der Kultur mit chromosomalem *cI857* (nach 3 h war 20% der DNA säurelöslich). Möglicherweise kann das Suizidsystem in den Zellen, die nicht koloniebildungsfähig sind, nicht induziert werden. Folglich wurden in der Kultur von WA234 pMJ36 mehr Zellen induziert als in der Kultur von TGE900 pMJ30a.

In den Zellen, die auch ohne Thermoinduktion nicht mehr vermehrungsfähig sind, wird die DNA vermutlich durch die basal produzierte Nuklease-Menge langsam degradiert. Dementsprechend nimmt mit chromosomalem Repressor-Gen auch in der uninduzierten

Kultur die hochmolekulare DNA ab. In uninduzierten Zellen mit plasmidkodiertem *cI857* findet hingegen keine DNA-Degradierung statt (Abb. 19), da durch die erhöhte Repressorkonzentration eine stärkere Repression des Suizidsystems erfolgt.

5.9 Entkommen der Zellen vom Tötungsprozeß durch Mutation des Suizidsystems

Die Zellen mit dem Suizidsystem können außer durch ungenügende Induktion und Segregation auch durch Mutation des Suizidsystems dem Tötungsprozeß entkommen. Zur Bestimmung der Rate suizidresistenter Mutanten wurden Fluktuationstests durchgeführt (s. 4.21). Die Ergebnisse sind in Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13: Entkommen vom Tötungsprozeß durch Mutation der Nuklease-Suizidsysteme

Stamm	Suizidsystem ^a	<i>cI857</i> - Lokalisierung	Mutationsrate ^b
TGE900 pMJ28a	<i>endAΔL</i>	Chromosom	$1,7 \times 10^{-9}$
TGE900 pMJ29a	<i>nucΔL</i>	Chromosom	$1,5 \times 10^{-6}$
TGE900 pMJ30a	<i>endAΔL-nucΔL</i>	Chromosom	$2,3 \times 10^{-9}$
WA234 pMJ36	<i>endAΔL-nucΔL</i>	Suizidplasmid	$1,9 \times 10^{-9}$

^a Signalpeptid-deletierte Strukturgene der Endo I (*endAΔL*), der *Serratia*-Nuklease (*nucΔL*), oder die Kombination der beiden Gene (*endAΔL-nucΔL*) unter Kontrolle des P_L .

^b Die Mutationsrate (pro Zelle und Generation) wurde, wie in 4.21 beschrieben, ermittelt.

Die Rate suizidresistenter Mutanten mit dem *nucΔL*-System und chromosomal lokalisiertem Repressor-Gen (ca. 10^{-6} pro Zelle und Generation) ist ähnlich wie bei den bisher beschriebenen Suizidsystemen mit einer Kopie der Suizidfunktion (vergl. Tab. 1). Die Mutationsrate des entsprechenden *endAΔL*-Systems ist jedoch tausendfach geringer. Dies beruht vermutlich auf der sehr geringen toxischen Wirkung der Endo I in Zellen mit reprimiertem Suizidsystem. Die basal produzierte Endo I wird durch intrazelluläre RNA inhibiert (vergl. Tab. 9) und erzeugt deshalb wahrscheinlich nur sehr selten mutationsauslösende DNA-Schäden. Für alle anderen bisher verwendeten Suizidfunktionen (einschließlich der *Serratia*-Nuklease) sind jedoch keine intrazellulären Inhibitoren bekannt. Möglicherweise werden von der subletalen Aktivität dieser Suizidfunktionen relativ häufig DNA-Schäden hervorgerufen, die Mutationen auslösen. Die Verdopplung der Kill-Gene verminderte der Mutationsrate nicht. Vermutlich resultiert die Mutationsrate der Nuklease-Kombination aus sich neutralisierenden Effekten. Einerseits ist die Wahrscheinlichkeit einer suizidresistenten Mutante geringer als bei dem *endAΔL*-Sy-

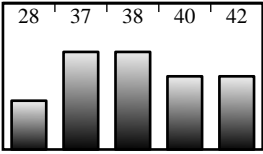
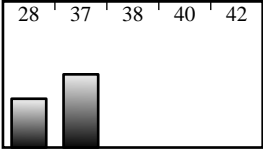
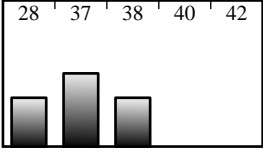
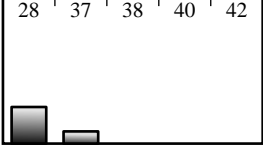
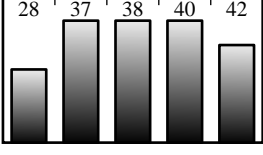
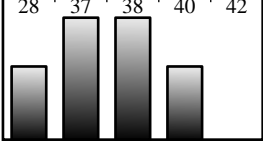
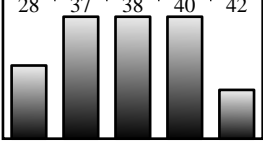
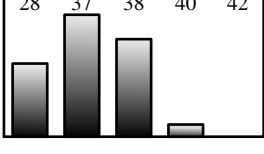
stem, da beide Nuklease-Gene mutieren müssen, um eine Suizidresistenz zu erlangen. Andererseits ist die DNA-schädigende Aktivität der basal produzierten Nuklease-Kombination größer, sodaß vermutlich relativ häufig Mutationen ausgelöst werden.

5.10 Thermosensibilität von *E. coli* mit den Suizidsystemen

Eine Kopiezahlerhöhung des Repressor-Gens verringert die Abtötungseffizienz der Suizidsysteme (s. 5.8.2). Im folgenden sollte untersucht werden, ob eine erhöhte *cI857*-Kopiezahl die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Temperaturerhöhungen verändert. Hierfür wurden Ausstriche von Zellen, deren Suizidsysteme von einem im Chromosom oder einem im Suizidplasmid lokalisierten Repressor-Gen kontrolliert werden, parallel bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Größe und Anzahl der Kolonien wurden miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Tab. 14 dargestellt.

Die Zellen mit den Suizidsystemen sind bei hoher *cI857*-Kopiezahl deutlich weniger temperaturempfindlich als entsprechende Zellen mit nur einer Kopie des Repressor-Gens. Mit dem *endAΔL*-System und chromosomalem *cI857* (TGE900 pMJ28a) vermehrten sich die Zellen z. B. zwar noch bei 37°C, aber schon bei 38°C entstanden keine Kolonien mehr. War das Repressor-Gen jedoch im Suizidplasmid integriert (WA234 pMJ34), vermehrten sich Zellen mit diesem Suizidsystem auch bei 40°C noch relativ gut, und erst bei 42°C entwickelten sich keine Kolonien mehr. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den Suizidsystemen mit *der Serratia*-Nuklease oder mit der Nuklease-Kombination. Der Vergleich der Systeme mit unterschiedlicher Tötungsfunktion, aber gleicher Kopiezahl des Repressor-Gens, zeigt, daß die Temperaturempfindlichkeit der Zellen mit der Nuklease-Kombination am größten ist. Die Nuklease-Kombination ist demnach deutlich toxischer als die einzelnen Nukleasen. Die Zellen des Stammes WA234 pMJ36 (*endAΔL-nucΔL*) vermehrten sich bei 37-38°C zwar sehr gut, aber schon bei einer Temperatur von 40-42°C entwickelten sich keine Kolonien mehr. Mit dem pMJ34 (*endAΔL*) oder pMJ35 (*nucΔL*) war jedoch bei 40°C noch eine gute bzw. sehr gute Vermehrung der Zellen möglich. Die größere Toxizität der Nuklease-Kombination bewirkt allerdings auch, daß bei einer niedrigen Repressorkonzentration die Vermehrungsfähigkeit von uninduzierten Zellen beeinträchtigt ist. Die Kolonien von TGE900 pMJ30a (*endAΔL-nucΔL*) waren bei 28°C deutlich kleiner als bei TGE900 pMJ28a (*endAΔL*) bzw. TGE900 pMJ29a (*nucΔL*). Das Suizidsystem mit *endAΔL* ist offenbar geringfügig wirksamer als das *nucΔL*-System, denn Zellen mit pMJ28a waren thermosensibler als Zellen mit pMJ29a. Wird das System von einem chromosomalen *cI857* kontrolliert, dann war bei 38°C zwar eine Vermehrung von Zellen mit pMJ29a möglich, aber Zellen mit pMJ28a bildeten bei dieser Temperatur keine Kolonien. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei 42°C, wenn das Repressor-Gen im Suizidplasmid in-

Tab. 14: Thermosensibilität von *E. coli* mit den Nuklease- Suizidsystemen^a

Stamm	Suizidsystem ^b	<i>cI857</i> -Lokalisierung	Wuchs bei verschiedenen Temperaturen [°C] ^c
TGE900 pMJ27a	ohne Nuklease	Chromosom	
TGE900 pMJ28a	<i>endAΔL</i>	Chromosom	
TGE900 pMJ29a	<i>nucΔL</i>	Chromosom	
TGE900 pMJ30a	<i>endAΔL-nucΔL</i>	Chromosom	
WA234 pMJ33	ohne Nuklease	Suizidplasmid	
WA234 pMJ34	<i>endAΔL</i>	Suizidplasmid	
WA234 pMJ35	<i>nucΔL</i>	Suizidplasmid	
WA234 pMJ36	<i>endAΔL-nucΔL</i>	Suizidplasmid	

^a Zellen wurden parallel ausgestrichen und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Nach 18 h wurde die Größe und Anzahl der Kolonien miteinander verglichen.

^b Signalpeptid-deletierte Strukturgene der Endo I (*endAΔL*), der Serratia-Nuklease (*nucΔL*), oder die Kombination der beiden Gene (*endAΔL-nucΔL*) unter Kontrolle des P_L .

^c Die Zahlen in den Diagrammen geben die Inkubationstemperatur an, und die Balkenhöhe symbolisiert die Größe und Anzahl der Kolonien.

tegiert war. Dies könnte durch die unterschiedliche Thermostabilität der Enzyme zustande kommen. Eine ständig geringfügige Induktion des Suizidsystems durch eine langfristige subletale Temperaturerhöhung könnte zur Anreicherung aktiver Endo I und ab einem Schwellenwert zum Zelltod führen. Die Menge aktiver *Serratia*-Nuklease könnte jedoch wegen der geringeren Thermostabilität des Enzyms bei solchen Induktionsbedingungen auf einem tolerablen Niveau bleiben.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob Zellen mit der Nuklease-Kombination und im Suizidplasmid integriertem *cI857* bei 37°C lebensfähig sind und die Temperatur vor der Thermoinduktion die Zelltötung beeinflusst. Hierzu wurde zunächst das Überleben des WA234 pMJ36 nach der Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C bzw. von 28°C auf 37°C bestimmt (s. 4.15). Nach der 42°C-Behandlung sank das Überleben der Zellen auf ca. 1×10^{-5} (Abb. 20). Die Temperaturerhöhung auf 37°C beeinträchtigte die Vermehrung der Zellen jedoch nicht. Das Suizidsystem wird bei 37°C offenbar nicht ausreichend induziert, um die Zellen zu töten. In einer zweiten Serie von Experimenten wurden Zellen von WA234 pMJ36 bei 37°C (anstatt 28°C) vermehrt, und die Induktion des Suizidsystems erfolgte durch Temperaturerhöhung auf 42°C. Das minimale Überleben war ca. zehnfach höher als nach einer Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C (Abb. 20). Vermutlich ist die Induzierbarkeit des Suizidsystems vom physiologischen

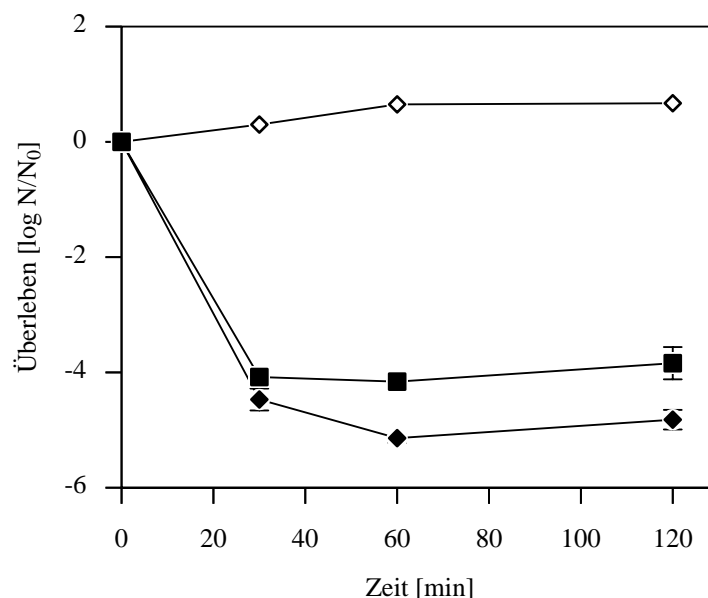


Abb. 20: Überleben des *E. coli*-WA234 mit plasmidkodierter Kontrolle der *endAΔL-nucΔL*-Kombination nach Thermoinduktion bei 42°C oder 37°C. Das Überleben wurde, wie in 4.15 beschrieben, ermittelt. Die Zellen von WA234 pMJ36 (*endAΔL-nucΔL-cI857*) wurden durch Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C (-◆-), von 28°C auf 37°C (-◇-) oder von 37°C auf 42°C (-■-) thermoinduziert. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung abhängig. Die Zellen waren bei 37°C nur etwa halb so lang wie bei 28°C und vermehrten sich schneller. Möglicherweise führt die größere physiologische Aktivität bei 37°C zu einer höheren *cI857*-Expression als bei 28°C, sodaß die Induzierbarkeit des Suizidsystems vermindert ist.

5.11 Erprobung des Suizidsystems in verschiedenen Gram⁻-Bakterien

Durch die Integration der Suizidkontrollfunktion in Plasmide wurde der Anwendungsbereich des Suizidsystems zwar erweitert, aber der Einsatz ist auf die Bakterien beschränkt, die das Suizidplasmid (ColE1-Replikon) replizieren können. Um das Suizidsystem in möglichst vielen Bakterien anwenden zu können, wurde eine Kassette mit allen Elementen für den kontrollierbaren Selbstmord konstruiert, die in beliebige Vektoren integriert werden kann. Diese Suizidkassette wurde anschließend in ein Plasmid mit weitem Wirtsbereich inseriert und sollte in natürlich transformierbare Gram⁻-Bakterien etabliert werden.

5.11.1 Konstruktion eines Suizidplasmides mit weitem Wirtsbereich

Konstruktion einer Suizidkassette. Es sollte eine Kassette konstruiert werden, die die Nuklease-Kombination als Tötungsfunktion, das *cI857* zur Suizidkontrolle, das *parB* zur Plasmidstabilisierung und das *nptI* als Selektionsmarke kodiert. In pMJ36 sind zwar alle Elemente der Suizidkassette vorhanden (s. Abb. 17), aber eine Restriktionskartierung zeigte, daß für ein Ausschneiden der Kassette keine geeigneten Schnittstellen in den angrenzenden Bereichen vorhanden sind. Solche Schnittstellen wurden daher durch gerichtete ortsspezifische Mutagenese erzeugt.

Zunächst wurden die Vektorbereiche sequenziert, in denen die Schnittstellen entstehen sollten. Mit einem Primer, der komplementär zum Ende des *bla*-Gens ist, und einem Primer, der mit dem P_L hybridisiert, wurden die entsprechenden Sequenzen des pSF1E (vergl. Abb. 10), wie in 4.6 beschrieben, ermittelt. Durch einen Austausch weniger Nukleotide können in den angrenzenden Bereichen *Bam*HI-Schnittstellen erzeugt werden, die im pMJ36 nicht vorkommen. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen des pMJ36 wurden beide gleichzeitig, wie in 4.7 beschrieben, verändert. Der Stamm WA385 ($r_k^- r_m^+$) wurde mit den unmodifizierten Mutageneseprodukten elektroporiert. Die Selektion der Transformanten mit Kanamycin gewährleistete, daß das *nptI*-Gen während der Mutagenese keine sekundäre Mutation erhalten hat, die die biologische Aktivität des Resistenzgens beeinträchtigt. Weiterhin wurde die Funktion des Suizidsystems durch paralleles Ausstreichen der Transformanten und Inkubation bei 28°C bzw. 42°C überprüft.

Eine Restriktionskartierung zeigte, daß ca. 45% der thermosensiblen Klone eine, 15% zwei und 40% keine *Bam*HI-Schnittstellen im Plasmid besitzen. Eine Sequenzierung ergab, daß genau die geplanten Nukleotidaustausche eingetreten sind. Das Plasmid, in dem die Suizidkassette von den beiden *Bam*HI-Schnittstellen flankiert ist, wurde pMJ39 genannt (s. Abb. 21).

Zur genaueren Überprüfung der Wirksamkeit der Suizidfunktion wurde das Überleben

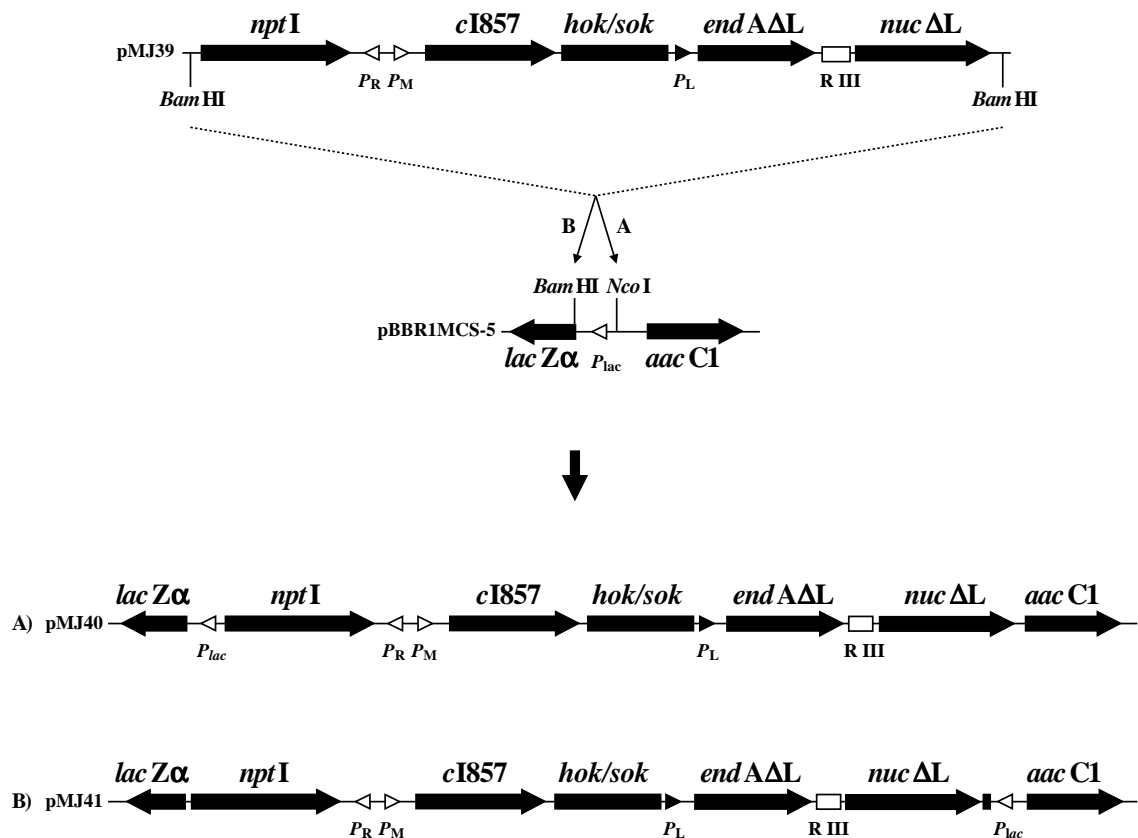


Abb. 21: Konstruktion von Suizidplasmiden mit weitem Wirtsbereich. *nptI*: für die Neomycin-Phosphotransferase I (Km^R) vom Tn903 kodierende Nukleotidsequenz; *hok/sok*: Bereich aus dem Plasmid R1, der postsegregatives Abtöten plasmidfreier Zellen vermittelt; *cI857*: Allel des thermosensiblen CI-Repressors vom Bakteriophagen Lambda (λ); P_R : rechter Promoter von λ ; P_L : linker Promoter von λ ; P_M : zentraler Promoter von λ ; *endAΔL*: für das reife Protein der Endo I kodierende Nukleotidsequenz; *nucΔL*: für das reife Protein der *Serratia*-Nuklease kodierende Nukleotidsequenz; RIII: RNase III-Schnittstelle; *lacZα*: für das α -Peptid der β -Galaktosidase von *E. coli* kodierende Nukleotidsequenz; *aacC1*: für die Gentamycin-3-acetyltransferase (Gm^R) vom Tn1696 kodierende Nukleotidsequenz; P_{lac} : Promoter des *lac*-Operons von *E. coli*. Horizontale Linien symbolisieren einen Teil der Nukleotidsequenz von Plasmiden; vertikale Linien zeigen die Position von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen; horizontale Pfeile geben die Position und Transkriptionsrichtung von proteinkodierenden Regionen und Dreiecke die Position und Orientierung von Promotern an; Rechtecke symbolisieren die *hok/sok*-Region bzw. der RNase III-Schnittstelle. Die *Bam*HI-Schnittstellen im pMJ39 wurden durch gerichtete Mutagenese erzeugt (s. 5.11.1). Die Suizidkassette wurde in die *Nco*I- oder *Bam*HI-Schnittstelle des pBBR1MCS-5 inseriert.

von WA385 mit pMJ36 bzw. pMJ39 nach 1h bei 42°C verglichen (s. 4.15). Da die abtötende Wirkung identisch war, ist während der Mutagenese offenbar keine sekundäre Mutation entstanden, die die Wirksamkeit des Suizidsystems vermindert.

Klonierung der Suizidkassette in ein Plasmid mit weitem Wirtsbereich. Zur Konstruktion eines Suizidsystems mit großem Anwendungsbereich wurde die Suizidkassette in das Plasmid pBBR1MCS-5 (Kovach et al., 1995) kloniert. Das Plasmid repliziert in vielen verschiedenen Gram⁻-Bakterien und kodiert eine Gentamycin-Resistenz, die, wie die Kanamycin-Resistenz der Suizidkassette, in diesen Bakterien exprimiert wird. Desweiteren ist das Replikon kompatibel zum ColE1, das am häufigsten zur gentechnischen Veränderung von *E. coli* verwendet wird. Das Suizidplasmid könnte also neben einem schon vorhandenen ColE1-Konstrukt in einer Zelle etabliert werden.

Das *Bam*HI-Fragment mit der Suizidkassette aus pMJ39 wurde in die *Nco*I- oder in die *Bam*HI-Schnittstelle des pBBR1MCS-5 inseriert (Abb. 21). Die Plasmide, in denen die Orientierung der Nuklease-Gene und des Gentamycin-Resistenzgens übereinstimmt (ca. 50 % der Transformanten), wurden respektiv pMJ40 oder pMJ41 genannt. Entsprechend ist die Suizidkassette in den Plasmiden pMJ40a und pMJ41a entgegengesetzt orientiert.

Wirksamkeit des Suizidsystems. Das Überleben der Zellen nach Thermoinduktion der Suizidkassette im pBBR1-Replikon oder ColE1-Replikon ist in Abb. 22 dargestellt.

Die Zellen mit dem ColE1-Derivat (pMJ39) wurden ca. zehnfach häufiger abgetötet als Zellen mit der Suizidkassette im pBBR1-Replikon (pMJ40). Nach 15 min bei 42°C war das Überleben zwar identisch, aber nach längerer Thermoinduktion stieg der Lebendtitert der Zellen mit pMJ40 an, während das Überleben der Zellen mit pMJ39 unverändert gering blieb. Dies könnte durch eine unterschiedlich starke Produktion der Nukleasen zustande kommen. Vermutlich ist die Kopiezahl der pBBR1-Derivate in den Zellen relativ gering (vergl. 5.8.2), sodaß nach der Thermoinduktion weniger Nuklease produziert wird als in den Zellen mit der Suizidkassette im ColE1-Replikon. Wird bei einer verlängerten 42°C-Behandlung ein Teil der Nukleasen thermisch inaktiviert (insbesondere *Serratia*-Nuklease), könnten sich Zellen mit dem pBBR1-Derivat vermehren; in Zellen mit dem ColE1-Derivat könnte jedoch die Nuklease-Aktivität noch für eine wirksame Zelltötung ausreichen.

Die Orientierung und die Position der Suizidkassette im pBBR1-Replikon beeinflussen offenbar die abtötende Wirkung des Suizidsystems. War die Suizidkassette so orientiert, daß die Transkription der Nuklease-Gene entgegen der *lacZ*-Orientierung erfolgt, und befand sich die Kassette außerdem zwischen dem *lacZ* und der Gentamycin-Resistenz (pMJ40), betrug das minimale Überleben der Zellen nach Thermoinduktion 3×10^{-5} . Mit identisch orientierter, aber im *lacZ* inserierter Suizidkassette (pMJ41) war das Überleben der Zellen jedoch vierzehnfach höher. Vermutlich wird in diesem Fall die Expression der Nukleasen durch die basale Transkription vom P_{lac} gesenkt. Es ist z. B.

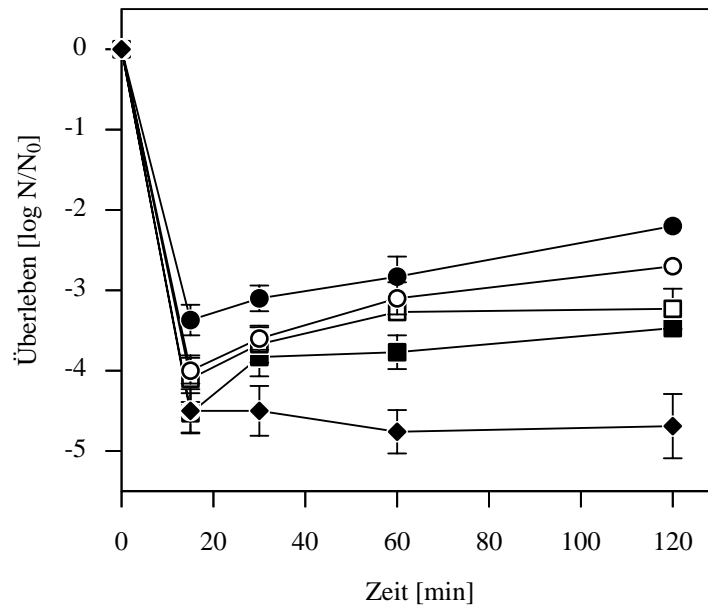


Abb. 22: Überleben von *E. coli* mit plasmidkontrolliertem *endAΔL-nucΔL*-Suizidsystem im pBBR1- oder ColE1-Replikon nach Thermoinduktion. Die Suizidkassette mit der *endAΔL-nucΔL*-Kombination und dem Repressor-Gen (*cI857*) befand sich im pBBR1MCS-5 oder im ColE1-Derivat pSF1E (s. Abb. 22). Das Überleben von *E. coli*-WA234 mit den pBBR-Suizidplasmiden pMJ40 (■), pMJ40a (□), pMJ41 (●) oder pMJ41a (○) und das Überleben von *E. coli*-WA385 mit dem ColE1-Suizidplasmid pMJ39 (◆) wurde, wie in 4.15 beschrieben, ermittelt. Zur Induktion des Suizidsystems wurden die Zellen vorübergehend (0-120 min) bei 42°C anstatt bei 28°C inkubiert. Es ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

möglich, daß vom P_{lac} eine Antisense-RNA produziert wird, die die Translation der Nukleasen vermindert. Im pMJ40 haben die Nuklease-Gene und das benachbarte Gentamycin-Resistenzgen die gleiche Orientierung, sodaß die Expression der Nukleasen nicht negativ beeinflusst werden kann. Die Tötungseffizienz des Suizidsystems war hingegen unabhängig von der Position der Suizidkassette, wenn die Nuklease-Gene in die gleiche Richtung das *lacZ* transkribiert werden (pMJ40a, pMJ41a).

5.11.2 Transfer des Suizidsystems in natürlich transformierbare Gram⁻-Bakterien

Um die Wirksamkeit des Suizidsystems in anderen Gram⁻-Bakterien zu testen, sollten das Vektorplasmid (pBBR1MCS-5) bzw. die Derivate mit der Suizidkassette (pMJ40, pMJ40a, pMJ41, pMJ41a) in *Acinetobacter* (LO22), *Pseudomonas stutzeri* (LO179) und *Pseudomonas mendocina* (LO215) etabliert werden. Da diese Bakterien natürlich transformierbar sind, wird dadurch gleichzeitig geprüft, ob das intakte Suizidplasmid auch durch horizontalen Gentransfer auf diese Bakterien übertragen werden könnte. Die

Zellen wurden mit den Plasmiden transformiert (s. 4.5), und Gentamycin-resistente Transformanten wurden bei 28°C selektiert. Nach der Elektroporation mit pBBR1MCS-5 wuchsen bei allen Bakterien Gentamycin-resistente Transformanten. Die Plasmide aus LO179 und LO215 entsprachen dem pBBR1MCS-5. Aus Transformanten des LO22 konnte jedoch mit den angewendeten Methoden keine Plasmid-DNA isoliert werden. Es ist daher unsicher, ob pBBR1MCS-5 in LO22 repliziert oder das Gentamycin-Resistenzgen im Chromosom integriert vorliegt. Die Transformationseffizienz (TFE = Gentamycin-resistente Transformanten pro μg Plasmid-DNA) betrug $3,3 \times 10^2$ für LO22, $3,9 \times 10^4$ für LO179 und $4,5 \times 10^6$ für LO215. Obwohl bei der Transformation mit den Suizidplasmiden mindestens fünfzigmal mehr DNA (1-1,4 μg) als mit pBBR1MCS-5 (0,02 μg) eingesetzt wurde, wuchsen nur nach der Transformation mit pMJ40a bei LO179 zwei (TFE = 4,4) und bei LO215 ein Klon (TFE = 2,2) in Gentamycin-Anwesenheit. Diese Klone waren zwar auch Kanamycin-resistent, aber die Zellen wurden durch eine Inkubation bei 42°C nicht getötet, und die Plasmide waren 2-4 kb kleiner als pMJ40a (ca. 9,5 kb). Vermutlich war in diesen Plasmiden der Nuklease-kodierende Bereich deletiert, sodaß keine Tötungsfunktion mehr produziert wurde. Dies zeigt, daß Plasmide mit intakter Suizidkassette in den getesteten Bakterien nicht etablierbar sind. Wahrscheinlich wird bei der Aufnahme des intakten Suizidsystems mindestens eine der beiden Nukleasen auch ohne Thermostimulation gebildet und tötet die Zellen. Möglicherweise funktioniert die Regulation des Suizidsystems nicht oder ist nicht effizient genug, um die Expression der Nuklease-Gene ausreichend zu reprimieren. In den getesteten Bakterien könnte z. B. die Expression des *cI857* ausbleiben oder zu gering sein.

6 Diskussion

Im folgenden wird zunächst die biologische Bedeutung der Endo I für die Bakterienzelle und die Eignung des Enzyms für ein bakterielles Suizidsystem erörtert. Anschließend werden die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Suizidsysteme mit Nukleasen als Tötungsfunktion im Hinblick auf einen sicheren Einsatz von gentechnisch veränderten Mikroorganismen diskutiert.

6.1 Biologische Bedeutung der Endo I von *E. coli* und entsprechender Enzyme anderer Gram⁻-Bakterien

Die Endo I wurde als nicht lebenswichtig für *E. coli* eingestuft, da sich Endo I-defiziente Mutanten hinsichtlich der Vermehrung, des Schutzes vor Phagen, der Konjugation und der Rekombination nicht vom Wildtyp unterscheiden (Dürwald und Hoffmann-Berling, 1968; Wright, 1971). In den früheren Untersuchungen wurden Mutanten mit einer geringen endonukleolytischen Restaktivität verwendet, die weder der Endo I noch einer anderen Endonuklease zugeordnet werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Aktivität als Endo I-Restaktivität (0,1%) im Periplasma der Zellen identifiziert (s. 5.1.3). Um zu verhindern, daß ein Mutantenphänotyp von der Endo I-Restaktivität maskiert wird, wurden *endA*-Nullmutanten erzeugt (Tab. 5). Endo I ist die einzige DNA-spezifische Endonuklease im Periplasma von *E. coli*, denn in den *endA*-Nullmutanten war keine endonukleolytische Aktivität mehr nachweisbar (Abb. 3). Weder die *endA*-Nullmutanten noch Zellen, die Endo I mehr als hundertfach überproduzieren, zeigten hinsichtlich der Vermehrungsgeschwindigkeit, der Dauer der lag-Phase oder der Lebensfähigkeit einen Unterschied zum Wildtyp (Tab. 4). Desweiteren fand im Vergleich zum Vektorplasmid keine erhöhte Segregation des Plasmids mit dem klonierten *endA*-Gen statt. Dies zeigt, daß zumindest bei den vorherrschenden Kulturbedingungen die Endo I weder lebenswichtig ist, noch eine Überproduktion des Enzyms toxisch oder nachteilig auf die Zelle wirkt.

Offenbar ist die Endo I jedoch nicht ohne Bedeutung für die Zelle, denn die Produktion und möglicherweise die Aktivität des Enzyms wird reguliert. Die Endo I-Menge ist in Zellen der frühen log-Phase vielfach größer als in Zellen der stat-Phase (Shortman und Lehman, 1964; Obinata und Mizuno 1968). Im Periplasma steigt die Endo I-Aktivität in der lag-Phase an, und nach der ersten Zellteilung, beim Übergang in die log-Phase, nimmt die Aktivität wieder ab (Abb. 2). Da die Endo I-Aktivität in den Zellen nicht durch eine Bildung spezifischer Inhibitoren gesteuert wird (Shortman und Lehman, 1964), erfolgt vermutlich eine transkriptionelle Regulation der Enzymproduktion. Vor

dem *endA*-Gen wurden Promoter identifiziert, deren schwache Aktivität in Zellen der log-Phase (s. 5.4) mit der geringen Endo I-Molekülzahl, die für solche Zellen berechnet wurde (s. 5.2.1), übereinstimmt. Die mutmaßlichen *endA*-Promoter besitzen eine große Homologie zu σ^{70} -Promotern, die hauptsächlich in der log-Phase genutzt werden. Dies erklärt die zunehmende Produktion der Endo I während der lag-Phase. Die *endA*-Expression könnte beim Übergang in die log-Phase reprimiert werden, sodaß *de novo* keine Endo I mehr produziert wird und infolge der anhaltenden Zellteilung die Endo I-Menge pro Zelle abnimmt. Außer Mutationen im *endA*-Gen führte die Mutation in einem weiteren Gen (*endB*) zur Endo I-Defizienz (Wright, 1971). Das *endB*-Gen wurde zwischen die 13. und 25. Minute der genetischen Karte von *E. coli* lokalisiert und ist damit deutlich vom *endA*-Gen (64. Minute) getrennt. In Zellextrakten von *endB*-Mutanten konnte keine Endo I-Aktivität nachgewiesen werden, sodaß es wie in *endA*-Mutanten nach einer Toluol-Behandlung zu keiner Degradierung der zellulären DNA kommt. Das *endB*-Gen wurde jedoch nicht weiter charakterisiert. Möglicherweise ist das Produkt dieses Gens (z. B. als Apoinduktor einer positiven Kontrolle) an der Regulation der *endA*-Expression beteiligt. Eine weitere Regulation der Endo I-Aktivität könnte post-translational im Periplasma erfolgen. Das Enzym ist aus dem Periplasma nur zusammen mit einer RNA komplexiert freisetzbare, und die endonukleolytische Aktivität der Endo I ist in diesem Zustand inhibiert (Nossal und Heppel, 1966). Die inhibierende Wirkung der komplexierten RNA wird durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration von 50 mM auf 150 mM aufgehoben. Desweiteren änderte sich die Enzymaktivität allein durch eine Zunahme der Salzkonzentration. RNA war hierfür nicht erforderlich bzw. veränderte die strangbrechende Eigenschaft des Enzyms nicht (Abb. 7; Tab. 7). Endo I erzeugt bei niedrigen Salzkonzentrationen ausschließlich Doppelstrangbrüche, bei mittleren Salzkonzentrationen Doppel- und Einzelstrangbrüche und bei hohen Salzkonzentrationen ausschließlich Einzelstrangbrüche. Ob die verschiedenen Endo I-Aktivitäten eine biologische Funktion ausüben, ist ungeklärt. Es ist jedoch deutlich, daß die Aktivität der Endo I nach der Produktion und dem Export des Enzyms von der Ionenkonzentration im Periplasma bzw. in der Umwelt abhängig ist. Möglicherweise ist auch die periplasmatische RNase I von *E. coli*, für die bisher ebenfalls keine biologische Funktion erkannt wurde, an der Regulation der Endo I-Aktivität beteiligt. Die RNase I könnte z. B. die Endo I-komplexierte RNA degradieren und dadurch die DNase-Aktivität der Endo I im Periplasma steigern.

Die Existenz von Endo I-homologen Enzymen in verschiedenen Gram⁻-Bakterien ist ein weiterer Hinweis darauf, daß das Enzym eine bedeutende biologische Funktion ausübt, die unter den bisherigen Laborbedingungen noch nicht erkannt wurde. In *V. cholerae* und *A. hydrophila* sind diese DNasen hauptsächlich extrazellulär lokalisiert (Focareta und Manning, 1987; Chang et al., 1992) und in Zellen von *E. chrysanthemi* befindet

sich ein entsprechendes Enzym größtenteils im Periplasma (Moulard et al., 1993). Außerdem wurden eine tRNA-inhibierbare Endonuklease im Periplasma von *P. mirabilis* und bei *S. typhimurium* gefunden (Goebel und Helinski, 1970; Zabel et al., 1980). Alle homologen Enzyme werden offenbar durch einen Signalpeptid-vermittelten Prozeß zunächst in das Periplasma transportiert. Die weitere Beförderung der DNasen bis ins Umgebungsmedium ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Einige Befunde sprechen dafür, daß spezifische Transportmechanismen hierfür nötig sind, die *E. coli* nicht besitzt. Es wäre auch möglich, daß durch einen unterschiedlichen Aufbau der Zellwand bzw. der äußeren Zellmembran die DNasen in *V. cholerae* und *A. hydrophila* auf passive Weise ins Medium gelangen und geringe Mengen im Periplasma zur Funktionserfüllung ausreichen. Ein ähnlicher „leaky“-Effekt wurde festgestellt, wenn das DNase-Gen von *V. cholerae* in einer *tolA*-Mutante von *E. coli* kloniert vorlag (Focareta und Manning, 1987). Eine weitere Gemeinsamkeit ist offenbar die Struktur der homologen Enzyme. Die Cystein-Reste befinden sich an identischen Positionen der Primärstruktur (Abb. 8), und die Disulfidbrücken sind bei allen untersuchten DNasen für die nukleolytische Aktivität unbedingt erforderlich (s. 5.2.3; Focareta und Manning, 1987; Chang et al., 1992).

Obwohl von allen bekannten Bakterien mit Endo I-homologen Enzymen Defizienz-Mutanten vorliegen, konnte den DNasen in keinem Fall eine biologische Funktion zugeordnet werden. Aufgrund der periplasmatischen Lokalisierung der aktiven DNasen kann eine Beteiligung der Enzyme an cytoplasmatischen Prozessen wie der Replikation, der Rekombination und DNA-Reparatur ausgeschlossen werden. Die DNasen sind zwar im Periplasma lokalisiert, aber dieses Kompartiment muß nicht zwangsläufig der Wirkungsort der Enzyme sein. Es gibt bisher keine Hinweise auf eine Beteiligung der Endo I an periplasmatischen oder extrazellulären Prozessen. Ein passiver Austausch hochmolekularer Substanzen (z. B. Proteine, Nukleinsäuren) zwischen dem Periplasma und der Umwelt wird durch die äußere Zellmembran verhindert (Ausschlußgrenze $M_r = 600$; Nikaido, 1996). Desweiteren sind keine aktiven Transportprozesse bekannt, die eine Freisetzung der Endo I oder eine Aufnahme von DNA ins Periplasma ermöglichen, so daß Enzym und Substrat nicht in Kontakt treten können. Die Endo I-Aktivität in Zellen, die in Minimalmedium vermehrt wurden, ist wesentlich geringer als in Zellen, die in Vollmedium gewachsen sind; d. h. ein Nährstoffmangel führt zu keiner erhöhten Endo I-Produktion oder -Aktivität. Eine Funktion der Endo I bei der Erschließung extrazellulärer Nährstoffe wurde daher ausgeschlossen (Shortman und Lehman, 1964). Außerdem war die Phagenvermehrung bei Endo I-defizienten Mutanten und Wildtypzellen identisch. Offenbar kann die Phagen-DNA auf dem Weg ins Cytoplasma nicht von Endo I angegriffen werden. Daraus wurde gefolgert, daß Endo I nicht an der Abwehr von Phagen beteiligt ist (Dürwald und Hoffmann-Berling, 1968).

Die Endo I-homologen Enzyme könnten allerdings in das Cytoplasma gelangen und eine postmortale Degradierung hochmolekularer DNA bewirken. Durch Toluol-Behandlung von *E. coli*-Zellen kommt es z. B. zum Verlust der Integrität der Cytoplasmamembran, woraufhin die zellulären Nukleinsäuren von Endo I und RNase I degradiert werden (Dürwald und Hoffmann-Berling, 1968; Wright, 1970). Vermutlich gibt es auch natürliche Prozesse, die eine Passage der Nukleasen durch die Cytoplasmamembran ermöglichen. So wurde z. B. nach der Induktion der Kill-Gene von *hok/sok*-homologen Regionen (*pnd*, *srnB*) eine Degradierung der zellulären RNA durch RNase I nachgewiesen (Ono et al, 1987; Sakikawa et al. 1989). Es könnte sein, daß außer RNase I und auch Endo I nach der Induktion der *hok*-Homologen Kill-Gene des *E. coli*-Chromosoms (*gef*, *relF*) in das Cytoplasma gelangen kann. Durch die Degradierung der zellulären DNA könnte die weitere Existenz und Verbreitung unvorteilhafter genetischer Information (Phagen-DNA, Plasmid-DNA, Mutationen) in der Bakterienpopulation verhindert werden, oder durch Wiedergewinnung der Nukleinsäurebestandteile könnten andere Zellen der Zellpopulation einen Nährstoffmangel umgehen bzw. überdauern. Diese Funktion würde mit der Wachstumsphasen-spezifischen Produktion der Endo I übereinstimmen. Ist nach der ersten Zellteilung keine optimale Vermehrung der Zelle möglich, wird der Zelltod eingeleitet, und die große Endo I-Menge gewährleistet eine effiziente Degradierung der zellulären DNA. Solche Systeme des defensiven Zelltods bei Einzellern ähneln apoptotischen Vorgängen bei Metazoen und haben sich möglicherweise aus einem gemeinsamen Vorläufersystem entwickelt (Yarmolinsky, 1995; Vaux und Strasser, 1996). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Endo I und die homologen Enzyme anderer Gram⁻-Bakterien zwar nicht lebensnotwendig, aber offenbar auch nicht unbedeutend für die Zellen sind. Der Wirkungsort und die biologische Funktion der Enzyme ist immer noch ungeklärt.

6.2 Eignung der Endo I von *E. coli* für ein bakterielles Suizidsystem

Die Endo I zerkleinert native DNA in Oligonukleotide, indem das Enzym sequenzun-spezifisch Doppelstrangbrüche erzeugt (Lehman et al., 1962a; Bernardi und Cordonnier, 1965). Diese Eigenschaft der Endo I ist eine wichtige Voraussetzung zur Konstruktion eines Suizidsystems, das den induzierbaren Zelltod mit einer Degradierung der zellulären DNA in biologisch inaktive Produkte verbinden soll. Werden Doppelstrangbrüche im Chromosom nicht repariert, verliert die Bakterienzelle ihre Vermehrungsfähigkeit. Durch weitere Degradierung der DNA entstehen genetisch inaktive Oligonukleotide; d. h. ein horizontaler Gentransfer auf andere Organismen ist nicht mehr möglich. Erfolgt die Spaltung der DNA hingegen nur an spezifischen Sequenzen, wie z. B. durch eine Restriktionsendonuklease, können größere Bruchstücke entstehen, die noch eine voll-

ständige genetische Information kodieren. Der horizontale Gentransfer wäre in diesem Fall nur dann verhindert, wenn eine zweite Nuklease die transformationsfähigen DNA-Bruchstücke weiter bis zu Oligonukleotiden abbaut.

Der Einfluß von RNA auf die strangbrechende Eigenschaft der Endo I war bisher ungeklärt. Da im Cytoplasma der Zelle relativ große Mengen RNA vorliegen, war es deshalb fraglich, ob intrazellulär aktive Endo I Doppelstrangbrüche erzeugen bzw. eine effiziente Tötung der Zellen bewirken kann. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Enzymtest, der die Unterscheidung von Doppelstrangbrüchen (dsb) und Einzelstrangbrüchen (ssb) ermöglicht, gezeigt, daß tRNA die Endo I zwar inhibiert, aber die strangbrechende Eigenschaft des Enzyms nicht verändert (s. Tab. 7). Die Erhöhung der Salzkonzentration hat hingegen zur Folge, daß Endo I zunehmend ssb anstatt dsb produziert (Abb. 7). Eine ähnliche Veränderung der nukleolytischen Aktivität wurde bei der DNase I aus Rinderpankreas beobachtet. Die DNase I erzeugt bei Mg^{2+} -Anwesenheit ssb, und wenn Mn^{2+} , Ca^{2+} oder Co^{2+} als Kofaktoren vorliegen, erzeugt das Enzym dsb (Melgar und Goldthwait, 1968b). Bisher liegen keine experimentellen Daten vor, die auf einen genauen Mechanismus der DNA-Spaltung durch Endo I schließen lassen und die Aktivitätsveränderung bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen erklären könnten. Es wurde jedoch deutlich, daß trotz des Inhibitors (RNA) von einer intrazellulär aktiven Endo I dsb erzeugt werden, die zum Zelltod führen können.

Endo I wird durch RNA kompetitiv inhibiert (Lehman et al., 1962b). An der Bindung des Inhibitors (RNA) bzw. des Substrats (DNA) könnten elektrostatische Wechselwirkungen beteiligt sein, denn aus der Aminosäuresequenz wurde abgeleitet, daß Endo I im optimalen pH-Bereich (7,5 - 8,5) schwach positiv geladen ist. Durch die Phosphatreste des Zucker-Phosphat-Rückgrats sind DNA und RNA hingegen negativ geladen. Diese Wechselwirkungen sind jedoch offenbar nicht allein für die Bindung des Enzyms zur Nukleinsäure verantwortlich, da zumindest bei niedrigen Salzkonzentrationen die Affinität zum Inhibitor viel größer als zum Substrat ist und künstliche Nukleinsäure-ähnliche Polymere, wie z.B. Polyphosphate oder Polyadenylat, die Aktivität von Endo I nicht beeinflussen (Lehman et al., 1962b). Intrazellulär kann die Aktivität der Endo I durch die relativ große Menge cytoplasmatischer RNA vermutlich stark inhibiert werden. Dies ist ein Vorteil hinsichtlich der Konstruierbarkeit eines Suizidsystems mit einer intrazellulär aktiven Endonuklease, denn die basale Expression der Suizidfunktion muß so gering sein, daß eine Vermehrung der Zellen möglich ist. Ist Endo I die Suizidfunktion, könnten die Zellen aufgrund der Inhibition des Enzyms durch RNA ein höheres Basalniveau der Expression tolerieren als bei der Anwendung einer Nuklease, für die intrazellulär keine Inhibitoren vorliegen. Die inhibitorische Wirksamkeit der RNA ist bei mittleren Salzkonzentrationen deutlich vermindert (Tab. 7). Vermutlich ist bei physiologischen Salzbedingungen (0,1 - 0,2 M NaCl) einerseits die Toleranz der Zellen gegenüber

intrazellulärer Endo I relativ hoch, da eine geringfügige Inhibition durch RNA stattfindet. Andererseits könnte die überproduzierte Endo I nach der Induktion des Suizidsystems nur noch geringfügig inhibiert werden, sodaß eine wirksame Zelltötung und Degradierung der DNA in biologisch inaktive Produkte bei diesen Salzbedingungen möglich ist.

Die Endo I ist ein relativ stabiles Enzym. Die nukleolytische Aktivität der aus dem Periplasma freigesetzten Endo I blieb bei 37°C mindestens 5 h unverändert, und nach einer dreitägigen Inkubation bei 0-42°C konnte noch 20-40% der Ausgangsaktivität gemessen werden (Abb. 6). Die Aktivität der Endo I ist damit deutlich stabiler als z. B. die nukleolytische Aktivität der *Serratia*-Nuklease, die zur Konstruktion eines ähnlichen Suizidsystems verwendet wurde. Wird die *Serratia*-Nuklease 5 h bei 37°C in Anwesenheit von BSA (0,5 mg/ml) inkubiert, beträgt die Aktivität nur noch 60%, und ohne BSA ist schon nach 0,5 h nur noch 4% der Ausgangsaktivität meßbar (Ahrenholtz et al., 1994a). Die Stabilität der Enzyme könnte von den für die Aktivität der Endo I und der *Serratia*-Nuklease notwendigen Disulfidbrücken in der Tertiärstruktur abhängig sein (s. 5.2.3; Ball et al., 1992). Möglicherweise wird die thermische Inaktivierung der Enzyme durch das Lösen der kovalenten Bindungen in den Disulfidbrücken hervorgerufen. Folglich nähme die Thermostabilität mit der Anzahl der Disulfidbrücken zu, weil eine größere Gesamtenergie notwendig ist, die Tertiärstruktur des Enzyms vollständig aufzulösen. Die Endo I ist daher thermostabiler als die *Serratia*-Nuklease, weil die acht Cystein-Reste der Endo I maximal vier Disulfidbrücken ausbilden können (Abb. 8) und die *Serratia*-Nuklease nur höchstens zwei Disulfidbrücken besitzt (Biedermann et al., 1989; Ball et al., 1992). Die relativ hohe Stabilität der Endo I ist für die Anwendung des Enzyms in einem Suizidsystem vorteilhaft. Sollten die Disulfidbrücken des Enzyms intrazellulär korrekt gebildet werden, dann ist das Enzym vermutlich über einen langen Zeitraum aktiv. Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit der Inhibition des Enzyms durch intrazelluläre RNA wichtig. Eine intrazellulär geringe Endo I-Aktivität könnte durch eine längere Einwirkzeit des Enzyms auf die zelluläre DNA ausgeglichen werden und somit zwar verlangsamt, aber letztendlich doch zur effizienten Abtötung der Zelle und Degradierung der DNA führen.

Die Verwendung der Endo I in einem Suizidsystem war insbesondere in Hinblick auf eine mögliche Anwendung des Systems in anderen Bakterien interessant, weil Endo I-homologe Enzyme bei Gram⁻-Bakterien offenbar häufig vorkommen. Da in *E. coli* eine intrazellulär aktive Endo I gebildet wird, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß das Enzym auch in anderen Gram⁻-Bakterien wirksam ist. Dadurch könnte ein Einsatz des Suizidsystems in Bakterien möglich sein, die in der industriellen Produktion (z. B. Bakterien, die das Zielprodukt effizient produzieren und sekretieren), in der Medizin (z. B. Bakterien zur wirksamen Lebendvaccinierung) oder im Freiland (z. B. an den Lebens-

raum speziell angepaßte Bakterien) Vorteile gegenüber *E. coli* besitzen.

Zusammenfassend sprechen die nukleolytische Aktivität und die weite Verbreitung der Endo I für die Anwendung des Enzyms in einem Suizidsystem für Bakterien. Es ist zu erwarten, daß intrazellulär aktive Endo I eine effiziente Suizidfunktion ausübt, die weniger strikt reguliert sein muß als die zuvor verwendete *Serratia*-Nuklease, und in einem weiten Bakterienbereich wirksam ist.

6.3 Induzierbarer Abbau von zellulärer DNA als Sicherheitssystem für gentechnisch veränderte Mikroorganismen

Die in der vorliegenden Arbeit konstruierten Suizidsysteme bestehen aus Genen, die intrazellulär wirksame Endonukleasen kodieren, und der steuerbaren Expression dieser toxischen Gene. Die verwendeten Enzyme sind natürlicherweise entweder im Periplasma lokalisiert (Endo I) oder werden ins Umgebungsmedium abgegeben (*Serratia*-Nuklease). Durch die Entfernung des Signalpeptid-kodierenden Teile und der Klonierung der Gene stromabwärts des P_L -Promoters (P_L) vom Phagen λ ist eine kontrollierbare Produktion intrazellulär wirksamer Nukleasen möglich. Die Regulation der Suizidsysteme erfolgt durch einen thermosensiblen Repressor (CI857). Im folgenden wird die Konstruktion, die Wirksamkeit, das Entkommen vom Tötungsprozeß und die Regulation der Suizidsysteme im Vergleich zu anderen Suizidsystemen erörtert. Außerdem werden die Suizidsysteme im Zusammenhang mit den potentiellen Risiken im Umgang mit GVMs diskutiert und es werden Verbesserungs- und Anwendungsmöglichkeiten aufgezeigt.

Konstruktion der Suizidsysteme. Da die Faltung der periplasmatischen Proteine erst nach dem Transport durch die Cytoplasmamembran erfolgt (Wülfing und Plückthun, 1994), war nicht bekannt, ob die für die Aktivität der Endo I notwendigen Disulfidbrücken (s. 5.2.3) auch intrazellulär korrekt ausgebildet werden. Die Entfernung des Signalpeptids führte zwar zur Produktion einer intrazellulär aktiven *Serratia*-Nuklease (Ahrenholtz et al., 1994b), aber es war fraglich, ob dies auch für die Endo I zutrifft. Die Endo I besitzt maximal doppelt so viele Disulfidbrücken wie die *Serratia*-Nuklease (Abb. 8; Ball et al., 1992), sodaß bei einer zufälligen Cystein-Verknüpfung ein aktives Endo I-Molekül viel seltener als ein aktives Molekül der *Serratia*-Nuklease entstehen würde. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß durch die Entfernung des Signalpeptid-kodierenden Bereiches aus dem *endA*-Gen eine intrazellulär aktive Endo I produziert werden kann, die wie das periplasmatische Enzym durch RNA inhibierbar ist (Abb. 10, Tab. 9). Offenbar ist die Bildung aktiver Endo I-Moleküle im Cytoplasma sehr effizient, denn eine geringe basale Expression des Signalpeptid-freien *endA*-Gens (*endA* Δ L) führt zur meßbaren intrazellulären Endo I-Aktivität, die mit der Kopiezahl des *endA* Δ L korreliert (Tab. 9; s. 5.6.1). Die Vorläuferproteine der Endonukleasen sind hingegen intrazel-

lulär offenbar nicht wirksam. Vermutlich verhindert das Signalpeptid, das erst nach erfolgtem Membrantransport der Proteine abgespalten wird, die Bildung eines aktiven Enzyms, indem es die Entstehung einer korrekten Tertiärstruktur der Enzyme verhindert. Ein toxisches Gen ist nur klonierbar, wenn die ohne Induktion gebildete Menge des kodierten Produktes (Basalniveau der Expression) von den Zellen toleriert wird. Hierzu muß entweder das Basalniveau sehr niedrig sein, oder es muß gleichzeitig ein Inhibitor produziert werden, der die toxische Wirkung verhindert. Die gleichzeitige Produktion eines Inhibitors (Barstar) ermöglichte z. B. die Klonierung der bakteriellen RNase (Bar-nase) von *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley, 1988). Von allen bisher bekannten Kontrollsystemen erfüllt die P_L -cI-Regulation der Genexpression die Anforderungen an das Basalniveau und an die Proteinproduktion nach der Induktion am besten (Lanzer und Bujard, 1988). Zum einen ist das Basalniveau so gering, daß selbst toxische Gene klonierbar sind, für deren Produkte keine intrazellulären Inhibitoren vorliegen (Ahrenholz et al. 1994b). Zum anderen ist nach der Inaktivierung des CI-Repressors die Expression von P_L -kontrollierten Genen so stark, daß z. B. eine Inhibition der Endo I durch intrazelluläre RNA nicht mehr ausreicht, den Zelltod zu verhindern (Abb. 11).

Mit der Absicht, die Wirksamkeit des Suizidsystems zu erhöhen, wurde das *endAAL* mit dem entsprechenden Gen der *Serratia*-Nuklease (*nucΔL*) unter die Kontrolle eines gemeinsamen P_L gestellt (Abb. 13). Da die *Serratia*-Nuklease außer DNA auch RNA degradiert, kann bei einer gleichzeitigen Produktion der Nukleasen der Inhibitor der Endo I (RNA) abgebaut werden, und es findet eine Verstärkung der nukleolytischen Aktivität in der Zelle statt. Die Kombination der Nukleasen konnte erfolgreich konstruiert werden. Im Unterschied zu den Systemen, die nur eine Nuklease kodieren, fehlt dem System mit der Nuklease-Kombination die T7Φ10-Region zwischen dem P_L und den Nuklease-Genen. Suizidplasmide, in denen sich diese Region vor einem der kombinierten Nuklease-Gene befindet, waren nicht etablierbar. Vermutlich ist in Zellen mit diesen Konstrukten schon die basal produzierte Nuklease-Kombination tödlich. Die T7Φ10-Region besitzt auch ohne Anwesenheit von T7-RNA-Polymerase in *E. coli* eine Promoteraktivität (Somerville et al., 1991) und verbessert außerdem möglicherweise die mRNA-Stabilität oder die Translationseffizienz der nachfolgenden Gene (Studier et al., 1990). Wurde nur ein Nuklease-Gen als Tötungsfunktion verwendet, dann war das Basalniveau der intrazellulären Nukleaseaktivität trotz der T7Φ10-Region noch tolerabel. Die Nuklease-Kombination ist offenbar jedoch so toxisch, daß die zusätzliche Expression ein tödliches Basalniveau intrazellulärer Nukleaseaktivität hervorruft. Ist die intrazelluläre Repressorkonzentration relativ niedrig (z. B. bei chromosomal lokalisiertem *cI857*), stirbt ein großer Teil der Zellen mit der Nuklease-Kombination auch ohne Induktion des Suizidsystems (s. 5.6.2), und die intrazelluläre DNA wird degradiert (s. Abb. 19). Erst durch eine Erhöhung der *cI857*-Kopiezahl ist die Lebensfähigkeit der

Zellen mit dem reprimierten Suizidsystem unbeeinträchtigt und die Integrität des Genoms gewährleistet.

Weiterhin wurde die Anwendbarkeit des Suizidsystems durch das Hinzufügen der *hok/sok*-Region (*parB*) aus dem Plasmid R1 und durch die Entkopplung der Suizidregulation vom Wirtschromosom verbessert. Das *parB* vermittelt ein postsegregatives Abtöten plasmidfreier Zellen (Gerdes et al., 1986), sodaß nach 67 Generationen ohne Selektion immer noch ca. 99,998% der Zellen das Suizidplasmid besitzen (5.7.1). Auf die Verwendung eines Antibiotikums kann deshalb verzichtet werden, ohne daß dadurch die Wirksamkeit des Suizidsystems vermindert wird (s. Tab. 11). Dies ist insbesondere hinsichtlich einer großtechnischen oder umweltbezogenen Anwendung des Suizidsystems von Vorteil, denn Antibiotikum-Konzentrationen, wie sie im Labormaßstab benutzt werden, können in diesen Fällen nicht eingesetzt werden. Das *parB* wurde so in die Suizidplasmide integriert, daß bei einer Thermoinduktion nur die Nuklease als Tötungsfunktion wirkt und keine Induktion des *hok*-Gens erfolgt (s. Abb. 14). Sowohl das *hok*-Gen als auch die homologen Gene *gef* und *relF* wurden zur Konstruktion anderer Suizidsysteme verwendet, da die Genprodukte durch ihre membrandestabilisierende Wirkung zum Zelltod führen (s. Tab. 1). Diese Destabilisierung der Zellintegrität könnte allerdings die Freilassung genetischen Materials ermöglichen, bevor es von der intrazellulären Nuklease inaktiviert wird.

In den zuerst konstruierten Suizidsystemen waren die regulierten Nuklease-Gene auf einem Plasmid und das Repressor-Gen im Chromosom lokalisiert. Dies beschränkte die Verwendung der Suizidsysteme auf Bakterien, die ebenfalls ein chromosomales *cI857* besitzen. Das Repressor-Gen wurde in Plasmide kloniert, die gleichzeitig neben den Suizidplasmiden in der Zelle existieren können, oder es wurde ins Suizidplasmid selbst integriert, sodaß nur ein Plasmid das Suizidsystem inklusive aller Regulationselemente kodiert (s. Abb. 17). Dadurch entstanden Suizidsysteme mit unterschiedlicher Wirksamkeit, die in beliebigen *E. coli*-Stämmen verwendet werden können. Schließlich wurde eine Kassette konstruiert, mit der das Suizidsystem inklusive der Regulationselemente, das *parB* und das *nptI* (Kanamycin-Resistenz) durch eine einzige Klonierung in jeden Vektor eingefügt werden kann (s. Abb. 21). Dies ermöglicht den universellen Einsatz des Suizidsystems. Die Suizidkassette kann in jedes Plasmid kloniert werden, das z. B. ein Zielprodukt kodiert. Desweiteren besteht die Möglichkeit das Suizidsystem ins Bakterienchromosom zu integrieren, indem die Suizidkassette zunächst in Phagenvektoren, in klonierte Bereiche des Chromosoms oder in Transposons inseriert und dann respektiv durch Lysogenisierung, homologe Rekombination oder Transposition im Chromosom verankert wird. Außerdem kann nach einer Klonierung der Suizidkassette in Vektoren mit weitem Wirtsbereich („broad host range“-Vektoren) oder mit unterschiedlichen Replikons („shuttle“-Vektoren) die Wirksamkeit des Suizidsystems in verschiedenen Or-

ganismen überprüft werden.

Wirksamkeit des Suizidsystems. Nach der Induktion des Suizidsystems mit der Signalpeptid-freien Endo I kommt es durch intrazelluläre DNA-Degradierung zu einem effizienten Abtöten der Zellen. Eine einstündige Induktion überlebten nur 0,001% der Zellen (Abb. 11, Abb. 15). Nach der Induktion des Suizidsystems wird eine intrazellulär aktive Endo I produziert, die wie das periplasmatische Enzym durch RNA inhibierbar ist (s. Tab. 9). Dennoch scheint das intrazelluläre Milieu für die Bildung von Doppelstrangbrüchen durch Endo I geeignet zu sein. Offenbar wird die enorme Endo I-Menge in den induzierten Zellen von der RNA nur unzureichend inhibiert, sodaß die Anzahl erzeugter Doppelstrangbrüche die Reparaturkapazität überschreitet und die Zelle stirbt. Eine ähnlich abtötende Wirkung wurde gefunden, wenn anstatt des *endAΔL* das *nucΔL* verwendet wurde (Ahrenholtz et al., 1994b, Abb. 15). Die Wirkung der Suizidsysteme ist vergleichbar mit der Wirkung der bisher entwickelten Suizidsysteme, die keine Nuklease als Tötungsfunktion enthalten (vergl. Tab. 1), oder sogar noch besser.

Nach einer längeren Induktion des *nucΔL*-Systems stieg der Lebendtitel wieder. Im Falle des *endAΔL*-Systems hingegen sank das Überleben ständig weiter (Abb. 15). Dies könnte durch die sehr viel geringere Thermostabilität der *Serratia*-Nuklease zustande kommen. In Zellen mit geringer *nucΔL*-Expression wird bei längerer 42°C-Behandlung vermutlich ständig der größte Teil der *Serratia*-Nuklease thermisch inaktiviert, sodaß nur noch eine subletale endonukleolytische Aktivität in den Zellen vorliegt und eine Vermehrung der Zellen möglich wird. Im Fall einer geringfügigen *endAΔL*-Expression könnte hingegen die Endo I-Aktivität aufgrund der hohen Thermostabilität des Enzyms während der verlängerten 42°C-Behandlung akkumulieren, sodaß zunehmend auch gering induzierte Zellen getötet werden.

Die gleichzeitige Produktion der Endo I und der *Serratia*-Nuklease versprach eine verbesserte Wirksamkeit des Suizidsystems, weil Zellen mit geringfügig induziertem Suizidsystem aufgrund der verstärkten endonukleolytischen Aktivität ebenfalls getötet werden könnten. Mit der Kombination der Nuklease-Gene unter Kontrolle eines gemeinsamen Promoters wurde die größte abtötende Wirkung erreicht. Nach einer einstündigen Induktion war das Überleben nur noch 10^{-6} (Abb. 15). Im Vergleich zu den Systemen mit einer Nuklease ist das Überleben noch einmal zehnfach vermindert. Die Erhöhung der Wirksamkeit wird offenbar von der Konstruierbarkeit dieses hochtoxischen Suizidsystems begrenzt. Die Nuklease-Kombination konnte nur ohne die T7Φ10-Region konstruiert werden, die sich in den Systemen mit jeweils einer Nuklease zwischen dem P_L und dem Nuklease-Gen befindet. Fehlt diese Region, ist die Abtötungseffizienz des Suizidsystems vermindert. Die Steigerung der Wirksamkeit durch Kombination der verschiedenen Nucleasen ist daher nur im Vergleich mit einem Konstrukt zu erkennen, das

ebenfalls keine T7 Φ 10-Region und zwei *endA* Δ L-Gene in Tandemanordnung enthält (s. 5.5.2). Zellen mit dem *endA* Δ L-Tandem überlebten eine Thermoinduktion ca. hundertfach häufiger als Zellen mit der Kombination aus *endA* Δ L und *nuc* Δ L (vergl. Abb. 15, 5.5.2). Eine Verbesserung der abtötenden Wirkung durch die Kombination der Nukleasen wurde insbesondere nach der Integration des Repressor-Gens in das Suizidplasmid deutlich. Eine einstündige Thermoinduktion dieses Systems überlebten ca. 0,001% der Zellen. Das Überleben mit entsprechenden Systemen, die nur eine Nuklease kodieren, war hingegen auch mit T7 Φ 10-Region ca. hundertfach höher (Abb. 12).

Offenbar beeinflussen außer der Regulation der Expression weitere Faktoren die Produktion der Nukleasen bzw. die Wirksamkeit des Suizidsystems. Vermutlich bestimmt die Kopiezahl des Suizidsystems die maximale Konzentration der Nukleasen nach einer Thermoinduktion. Ist die Suizidkassette mit der Nuklease-Kombination und integriertem *cI857* in einem ColE1-Replikon inseriert, dann ist die abtötende Wirkung besser, als wenn sich die Suizidkassette in einem pBBR1-Replikon befindet. Mit den pBBR1-Derivaten nimmt das Überleben der Zellen nach der Thermoinduktion zwar rapide ab, aber schon nach einer über 15 min hinaus verlängerten Induktion steigt der Lebendtitel wieder an. Mit den ColE1-Derivaten hingegen blieb das Überleben der Zellen auch nach einer längeren Thermoinduktion unverändert gering (Abb. 22). Vermutlich ist die Kopiezahl des pBBR1-Derivats geringer als die Kopiezahl des Suizidplasmids mit dem ColE1-origin, sodaß nach der Thermoinduktion eine geringere Nuklease-Konzentration in den Zellen vorliegt. Folglich kann die endonukleolytische Aktivität in den gering induzierten Zellen mit dem pBBR1-Replikon durch die thermische Inaktivierung der *Serratia*-Nuklease sehr viel früher unter eine tödliche Schwelle sinken, so daß eine Vermehrung dieser Zellen schon nach relativ kurzer 42°C-Behandlung einsetzt. Die Wirksamkeit des Suizidsystems kann ebenfalls von der Position und der Orientierung der Suizidkassette im Vektor beeinflußt werden. Nach der 42°C-Behandlung von Zellen mit den verschiedenen pBBR1-Derivaten ergaben sich zwar geringe, aber signifikante Unterschiede hinsichtlich der abtötenden Wirkung (Abb. 22). Möglicherweise wird die Expression der Nuklease-Gene an bestimmten Positionen und nur in bestimmter Orientierung der Suizidkassette im pBBR1-Replikon durch entgegengesetzt verlaufende Transkription gestört (s. Abb. 21). Die Transkription anderer Bereiche des Plasmids könnte mit der Transkription der Nuklease-Gene kollidieren und dadurch zur verminderten Fertigstellung der Nuklease-Transkripte führen, oder es könnte eine Antisense-RNA entstehen, die eine verringerte Translation der Nuklease-mRNA bewirkt.

Nach der Induktion des *endA* Δ L-Systems wurde 80 % der zellulären DNA innerhalb von 24 h in säurelösliches Material umgewandelt. Das gleiche Ausmaß des DNA-Abbaus, wurde bei induziertem *nuc* Δ L-System innerhalb von nur 3 h erreicht (Abb. 16). Im Gegensatz zur *Serratia*-Nuklease wird Endo I intrazellulär (durch RNA) inhibiert, sodaß

der Abbau der DNA in säurelösliches Material mit dem *endA* Δ L-System erheblich langsamer ist als mit dem *nuc* Δ L-System. Dennoch ist die abtötende Wirkung der beiden Suizidsysteme nahezu identisch (Abb. 15). Offenbar reicht die Bildung von relativ wenigen Doppelstrangbrüche im Chromosom zwar für eine Zelltötung aus, aber für eine wirksame Degradierung der DNA in biologisch inaktives Material wird eine hohe endonukleolytische Aktivität benötigt. Durch die Kombination der Nukleasen wurde der DNA-Abbau nicht im erhofften Maße verbessert. Die Umwandlung zellulärer DNA in säurelösliche Produkte ist zwar schneller als beim *endA* Δ L-System, aber erreichte nicht die Effizienz des *nuc* Δ L-Systems. Dies könnte durch eine relativ geringe *nuc* Δ L-Expression im System mit der Nuklease-Kombination zustande kommen. Die beiden Gene sind zwar durch eine RNase III-Schnittstelle voneinander getrennt, sodaß nach der Spaltung des Transkriptes eine unabhängige Translation möglich ist, aber im Unterschied zu den Suizidsystemen mit nur einer Nuklease fehlt die T7 Φ 10-Region vor den Genen. Möglicherweise verbessert die T7 Φ 10-Region die Translationseffizienz oder die Stabilität der mRNA und bewirkt dadurch eine höhere Produktion der Nukleasen.

Das in dieser Arbeit konstruierte Suizidsystem ist potentiell in allen Organismen wirksam, in denen es zur Expression der Nuklease-Gene kommt. Das System kodiert ein universell einsetzbares Tötungsprinzip, da das Ziel der Tötungsfunktion (DNA) in allen Organismen identisch ist und die zentrale Rolle zur Erhaltung der Lebensfähigkeit spielt. Außerdem bleibt biologisch aktive DNA auch bei einer extensiven Veränderung (z. B. durch Mutationen oder Modifikationen) stets Nuklease-empfindlich. In anderen Suizidsystemen haben spezifische Tötungsfunktionen andere Zellbestandteile zum Ziel (z. B. Zellmembran, Zellwand), die stärker variieren können als DNA. Die Wirksamkeit solcher Systeme kann schon durch geringe Veränderung des Angriffsziels aufgehoben werden. Weiterhin sind diese Systeme nur in solchen Organismen anwendbar, die das Angriffsziel besitzen, in denen es eine lebenswichtige Funktion ausübt und in denen es empfindlich gegenüber der Tötungsfunktion ist. Einen Hinweis darauf, daß die Nuklease-Tötungsfunktion zumindest in anderen Gram⁻-Bakterien wirksam ist, zeigte der Versuch das Suizidsystem auf *P. stutzeri*, *P. mendocina* und *Acinetobacter* zu übertragen (5.11.2). Obwohl der pBBR1-Vektor in diesen Bakterien repliziert wird, konnten Derivate dieses Plasmids mit intaktem Suizidsystem nicht etabliert werden. Es wurde zwar nicht näher untersucht, warum das Suizidsystem in den Bakterien nicht etablierbar ist, aber prinzipiell sind folgende Ursachen möglich: 1. Es findet keine oder eine ungenügende Expression des *cI857*-Gens statt, sodaß kein funktionsfähiger Repressor des Suizidsystems produziert wird. 2. Andere Sequenzbereiche als der P_L werden von der RNA-Polymerase erkannt (im Konstrukt mit der Nuklease-Kombination z. B. kurz vor oder innerhalb des *endA* Δ L), auf die der CI-Repressor nicht wirken kann. In beiden Fällen findet keine Repression des Suizidsystems statt. Zellen, die die Suizidplasmide auf-

nehmen, werden daher sofort getötet. Dies bedeutet, daß die Suizidfunktion prinzipiell in anderen Bakterien wirksam ist, für eine kontrollierbare Zelltötung die Regulation des Suizidsystems jedoch eventuell angepaßt werden muß.

Entkommen vom Tötungsprozeß. Mehr als 90 % der Zellen, die eine Thermoinduktion überlebten, sind dem Tötungsprozeß durch Segregation des Suizidplasmids entkommen (s. Tab. 11; vergl. Ahrenholtz, 1994b). Da bei einem Einsatz des Suizidsystems in großtechnischen oder umweltbezogenen Anwendungen eine Selektion durch ein Antibiotikum nicht praktikabel ist, würde die Segregation der Suizidplasmide die Hauptursache des Entkommens vom Tötungsprozeß sein. Die Insertion des *parB* vom Plasmid R1 in das Suizidplasmid mit dem *nucΔL*-Gen als Tötungsfunktion verminderte die Segregation um zwei bis drei Größenordnungen (s. 5.7.1). Eine ähnlich Stabilisierung (Faktor 1000) wurde nach der Insertion des *parB* in pBR322 beobachtet (Gerdes, 1988). Durch die hohe Stabilität der Suizidplasmide mit dem *parB* ist Wirksamkeit des Suizidsystems unabhängig von einer Selektion (Tab. 11), sodaß auf den Einsatz eines Antibiotikums verzichtet werden kann. Bei einer Anwendung des Suizidsystems in anderen Bakterien als *E. coli* kann ebenfalls eine Plasmidstabilisierung stattfinden, weil das *parB* in einem weiten Bakterienspektrum wirksam ist (Gerdes, 1988). Wird das Suizidplasmid als Expressionsvektor zur industriellen Herstellung eines Zielproduktes eingesetzt, gewährleistet das *parB* eine gleichmäßig hohe Produktivität ohne Anwendung eines Antibiotikums.

Nur bei einem geringen Teil der Zellen, die eine Thermoinduktion überlebten, obwohl sie ein Suizidplasmid besitzen, war die Wirkung des Suizidsystems durch eine Mutation dauerhaft vermindert (s. 5.5.3, Tab. 8), und suizidresistente Mutanten sind äußerst selten (s. Tab. 13). Von allen bisher beschriebenen Suizidsystemen sind die in der vorliegenden Arbeit konstruierten Suizidsysteme am geringsten anfällig für Mutationen, die zur Suizidresistenz führen. Ist nur Endo I die Suizidfunktion, treten suizidresistente Mutanten mit einer Häufigkeit von nur ca. 2×10^{-9} pro Zelle und Generation auf. Die Mutationsraten vergleichbarer Systeme mit nur einer Suizidfunktion und ähnlicher Regulation waren drei bis vier Größenordnungen höher als beim *endAΔL*-System (s. Tab. 1; Knudsen und Karlström, 1991; Munthali, 1996). Von Knudsen und Karlström (1991, 1995) wurde gezeigt, daß die Absenkung des RelF-Basalniveaus eine Verminderung der Mutationsrate bewirkt, und am Beispiel des *lacI*-kontrolliertem *gef*-Suizidsystems wird deutlich, daß eine gesteigerte Repressorproduktion die Rate suizidresistenter Mutanten deutlich verringert (Jensen et al., 1993). Die Mutationsrate wurde in diesen Fällen durch Erhöhung der Kopiezahl des Repressor-Gens, durch Verwendung von Repressor-überproduzierenden Allelen oder durch Produktion einer Antisense-RNA für die Kill-mRNA gesenkt (s. Tab. 1). Die Rate suizidresistenter Mutanten ist offenbar mit dem Basalniveau der Tötungsfunktion korreliert. Vermutlich wirkt die subletale Menge einer

Suizidfunktion genotoxisch, sodaß es mit dem Anstieg des Basalniveaus zur vermehrten Mutationsauslösung kommt. Eine weitere Möglichkeit, das Entkommen vom Tötungsprozeß durch Mutation des Suizidsystems zu verringern, ist die Multiplizierung des Suizidsystems in einem Replikon. Um eine Suizidresistenz zu erlangen, müssen in diesem Fall alle Kopien des Suizidsystems mutieren. Obwohl in Zellen mit dem *endAΔL*-System und geringer Repressorproduktion keine Maßnahmen zur Verringerung der Mutationsrate vorgenommen wurden, ist die Rate suizidresistenter Mutanten dennoch zehnfach geringer als bei Zellen mit Suizidsystemen, deren Entkommen vom Tötungsprozeß minimiert wurde (vergl. Tab. 1; Jensen et al., 1993; Knudsen et al., 1995). Diese extrem niedrige Mutationsrate kann nicht allein durch das sehr niedrige Basalniveau der P_L -Kontrolle zustande kommen, denn die Mutationsrate des entsprechenden Systems mit der *Serratia*-Nuklease anstatt Endo I als Tötungsfunktion ist tausendfach höher (s. Tab. 13). Vermutlich geht von der basal produzierten Endo I eine bedeutend geringere genotoxische Wirkung aus als von der gleichen Menge *Serratia*-Nuklease oder einer anderen bisher verwendeten Tötungsfunktion. In Zellen mit reprimiertem *endAΔL*-System entstehen möglicherweise viel seltener DNA-Schäden, da die Endo I Aktivität sehr effizient von zellulärer RNA inhibiert wird. Für die *Serratia*-Nuklease und die Tötungsfunktionen der bisher beschriebenen Suizidsysteme sind hingegen keine vergleichbaren Inhibitoren bekannt. Die Mutationsrate des Suizidsystems mit der Nuklease-Kombination ist zwar zehnfach geringer als bei allen anderen bekannten Systemen mit duplizierter Suizidfunktion (vergl. Tab. 1; Jensen et al., 1993; Knudsen et al. 1995), unterscheidet sich aber von der Mutationsrate des *endAΔL*-Systems nur unwesentlich. Durch eine Verdopplung der Suizidkassette wurde hingegen bisher immer eine ca. hundertfache Verminderung der Mutationsrate erzielt (s. Tab. 1; vergl. Knudsen und Karlström, 1991 mit Knudsen et al., 1995; Jensen et al. 1993). Möglicherweise wird im Fall der Nuklease-Kombination die Verringerung der Mutationsrate von der erhöhten DNA-schädigenden Wirkung wieder ausgeglichen. Einerseits wird die Wahrscheinlichkeit suizidresistenter Mutanten erniedrigt, da beide Kill-Gene mutieren müssen, um dem Tötungsprozeß dauerhaft zu entkommen. Andererseits wird jedoch die basal exprimierte *Serratia*-Nuklease intrazellulär nicht inhibiert, sondern kann über ihre eigene DNA-schädigende Wirkung hinaus die Inhibition der Endo I durch einen RNA-Abbau vermindern. In Zellen mit der Nuklease-Kombination kommt es daher vermutlich zu einer häufigeren Mutationsauslösung als in Zellen mit dem *endAΔL*-System.

Eine weitere Ursache für die geringe Mutationsempfindlichkeit der Nuklease-Suizidsysteme ist der eingeschränkte Bereich, in dem eine Mutation zur Suizidresistenz führt. Nur Mutationen, die eine Inaktivierung der Suizidfunktionen bewirken oder die Expression der Nuklease-Gene verhindern, ermöglichen der Zelle ein dauerhaftes Entkommen vom Tötungsprozeß. Eine mutationsbedingte Veränderung des Angriffsziels (DNA) be-

einträchtigt die Wirksamkeit der Suizidsysteme jedoch nicht, weil die DNA durch Mutationen nicht resistent gegen die sequenzunspezifischen Nukleasen wird. Eine Mutation, die eine erhöhte Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ermöglicht, könnte zwar zu einer verringerten Wirksamkeit des Suizidsystems führen, aber eine Suizidresistenz ist dadurch nicht möglich. Ist das Ziel der Tötungsfunktion die Cytoplasmamembran oder die Zellwand, dann besteht die Möglichkeit, daß sich durch Mutationen außerhalb des Suizidsystems das Angriffsziel verändert und die Zellen gegen die Tötungsfunktion resistent werden. Eine Gef-resistente Mutante wurde z. B. von Poulsen et al. (1992) beschrieben.

Regulation des Suizidsystems. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß die Wirksamkeit des Suizidsystems offenbar von der Induzierbarkeit der Nukleaseproduktion begrenzt wird. Mehr als 90 % der Zellen, die eine 42°C-Behandlung überlebten, waren keine Mutanten, sondern ihr Suizidsystem war nicht oder nicht ausreichend induziert (s. 5.5.3). Möglicherweise ist ein Teil der Zellen einer Kultur physiologisch relativ inaktiv, sodaß trotz der Repressorinaktivierung nicht die zur Zelltötung erforderliche Nukleasemenge produziert wird. Desweiteren könnte eine unvollständige Inaktivierung der Repressormoleküle eine geringe Überlebenschance ermöglichen. Eine Zunahme der Repressorkonzentration in den Zellen erhöht offenbar die Überlebenschance, denn eine Erhöhung der Kopiezahl des Repressor-Gens verringerte die Abtötungseffizienz des Suizidsystems (Abb. 18, Tab. 12) und die Thermosensibilität der Zellen (Tab. 14). Vermutlich wird ein Teil der Repressormoleküle durch den Temperaturanstieg von 28°C auf 42°C nicht inaktiviert. Folglich ist das induzierbare Expressionsniveau der Kill-Gene geringer, wenn bei gleichbleibender P_L -Kopiezahl die Repressorkonzentration in den Zellen erhöht ist. Die Effizienz des Suizidsystems könnte daher durch eine wirksamere Inaktivierung des Repressors (z. B. durch proteolytische Spaltung) wesentlich verbessert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit konstruierten Suizidsysteme können zwar in der industriellen Produktion eingesetzt werden, aber eine Anwendung z. B. in der Umwelt ist nicht möglich, weil die erforderlichen Induktionsbedingungen (42°C) nicht erreicht werden oder nicht über einen längeren Zeitraum konstant bleiben. Nur für die Suizidsysteme mit Endo I als Suizidfunktion ist bei geringer Repressorproduktion eine medizinische Anwendung denkbar. Die Zellen mit dem *endAΔL*-System können sich bei 37°C uneinträchtigt vermehren und werden durch eine körperverschträgliche Temperaturerhöhung wirksam getötet (38-40°C, Tab. 14). Mit der Nuklease-Kombination ist die Vermehrung der Zellen auch schon bei 37°C stark beeinträchtigt. Möglicherweise können diese Suizidsysteme z. B. zur Attenuierung von Bakterien bei einer Lebendvaccinierung eingesetzt werden. Die Bakterien könnten einerseits im Wirtsorganismus ausreichend lange existieren, um eine wirksame und dauerhafte Immunisierung hervorzurufen. Anderer-

seits könnten die Bakterien jederzeit durch eine kurze Temperaturerhöhung daran gehindert werden, den Wirt durch eine unkontrollierte Vermehrung zu schädigen. Das *nucΔL*-System oder die Kombination der Suizidsysteme mit einer hohen Repressorproduktion sind hingegen für eine medizinische Anwendung ungeeignet, da sich die Bakterien bei 37°C gut vermehren und erst bei unverträglichen Temperaturen (40-42°C) wirksam getötet werden.

Eine geänderte Expressionskontrolle der Nuklease-Gene könnte den Einsatz des Suizidsystems auch in anderen Anwendungsbereichen ermöglichen. Die Regulation der Kontrolle muß einerseits ein minimales Basalniveau bewirken, sodaß die Zellen mit dem reprimierten Suizidsystem lebensfähig sind und nur selten suizidresistente Mutanten entstehen. Andererseits muß das induzierte Expressionsniveau maximal sein, um die größtmögliche Wirksamkeit des Suizidsystems zu erreichen. Die Versuche, das *nucΔL* unter die Kontrolle des durch IPTG induzierbaren *lac*- bzw. *tac*-Promoters zu stellen, haben nicht zu anwendbaren Suizidsystemen geführt (Ahrenholtz, 1995). Das Basalniveau der Expression war offenbar so hoch, daß die Fitness der Zellen stark vermindert war und es folglich zur Selektion von Mutanten kam, deren Suizidsystem nicht oder nur wenig wirksam war. Ein zu hohes Basalniveau war vermutlich ebenfalls die Ursache dafür, daß eine Kontrolle des Gens der T7-Endonuklease durch den *phoA*-Promoter von *E. coli* unmöglich ist (Schweder, 1993). Andere toxische Funktionen, wie z. B. die extrazelluläre RNase von *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase), wurden hingegen erfolgreich unter die Kontrolle des *tac*- oder *phoA*-Promoters gestellt (Hartley, 1988; Yazynin et al., 1996). Im Unterschied zur *Serratia*-Nuklease und der T7-Endonuklease wurde in diesen Fällen ein intrazellulärer Inhibitor produziert, der das toxische Genprodukt in uninduzierten Zellen unschädlich macht. Erst wenn die Überproduktion der Suizidfunktion induziert wird, kommt es zum Zelltod, da der Inhibitor nicht in gleichem Maße gebildet wird. Das gleiche Prinzip könnte bei der Anwendung des *endAΔL* funktionieren, da für Endo I ebenfalls ein intrazellulärer Inhibitor (RNA) vorliegt. Ist die *Serratia*-Nuklease jedoch an der Zelltötung beteiligt, muß das extrem geringe Basalniveau der P_L -Kontrolle erreicht werden, da kein intrazellulärer Inhibitor gebildet wird. Das Basalniveau von bekannten Kontrollsystemen könnte z. B. durch Anpassung der Promoterstruktur an den P_L (Lanzer und Bujard, 1988), durch Erhöhung der Kopiezahl des Repressor-Gens oder durch Produktion einer zur mRNA der Kill-Gene komplementären Antisense-RNA (O'Connor und Timmis, 1987; Szafranski et al., 1997) gesenkt werden. Alle Maßnahmen zur Absenkung des Basalniveaus können allerdings auch eine Verminderung der induzierbaren Expression bewirken, die in eine herabgesetzte Wirksamkeit des Suizidsystems resultiert. Eine erhöhte Kopiezahl des Repressor-Gens verringerte z. B. die Abtötungseffizienz der Suizidsysteme (Abb. 18; Tab. 12). Es scheint deshalb schwierig und kompliziert zu sein, geeignete umweltgesteuerte Kontrollmechanismen zu finden

oder zu konstruieren, die das extrem niedrige Basalniveau und die sehr hohe induzierbare Expression des P_L -cI-Kontrollsystems vermitteln.

Steuerbarer Selbstmord als Sicherheitssystem für GVMs. Die Entwicklung von bakteriellen Suizidsystemen erfolgte mit der Absicht, das potentielle Risiko bei einer Freisetzung oder einem Entweichen der GVMs zu verringern. Ein Risiko wird darin gesehen, daß die Populationsstruktur in der Umwelt durch den Eintrag von GVMs verändert werden könnte. Die GVMs könnten sich in der Umwelt vermehren und autochthone Organismen aus dem Lebensraum verdrängen. Weiterhin könnten durch den Austausch von genetischer Information Organismen mit gefährlichem Potential entstehen. Die Anwendung von Suizidsystemen kann diese Risiken nicht vollständig beseitigen. Dies ist auch in Zukunft nicht zu erwarten, da immer ein Teil der GVMs dem Tötungsprozeß entkommt und dadurch die Wirksamkeit des Suizidsystems begrenzen wird. Vor allem das Auftreten suizidresistenter Mutanten ist unvermeidbar und verhindert die hundertprozentige Abtötung der Zellen einer Kultur selbst dann, wenn eine Segregation des Suizidsystems durch die Integration ins Wirtschromosom unmöglich ist und das Suizidsystem in allen Zellen maximal induziert werden kann. Ein erreichbares Ziel ist die Minimierung der potentiellen Risiken durch größtmögliche Einschränkung der Vermehrung von GVMs und weitestgehende Verringerung eines horizontalen Gentransfers. Eine Anwendung von Suizidsystemen ist zumindest solange zu fordern, bis die Möglichkeit und ökologischen Folgen einer unkontrollierten Vermehrung der GVMs in der Umwelt völlig aufgeklärt sind und eine Gefährdung durch Übertragung ihres (gentechnisch veränderten) Erbmaterials auf andere Organismen ausgeschlossen werden kann. Eine Induktion der hier entwickelten Suizidsysteme führt sehr schnell zu einer drastischen Verminderung des Anteils vermehrungsfähiger Zellen (Abb. 15). Die Chance einer Etablierung der GVMs in der Umwelt und die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers wird dadurch stark gesenkt. Die potentiellen Risiken sind stärker vermindert als durch die Anwendung der bisher vorgestellten Suizidsysteme, die entweder ein zwei bis fünf Größenordnungen geringeres oder ein nur sehr langsames Abtöten der Zellen bewirken (vergl. Tab. 1; Knudsen und Karlström, 1995; Molin et al. 1988; Klemm et al., 1995). Desweiteren ist das dauerhafte Entkommen vom Tötungsprozeß durch Mutationen insbesondere mit der Endo I als Suizidfunktion bedeutend seltener als mit den bisher entwickelten Systemen (vergl. Tab. 13 mit Tab. 1)

Nahezu alle der bisher entwickelten Suizidsysteme töten zwar die Zelle, lassen aber das Schicksal der rekombinanten DNA außer acht (s. 1.2). Eine Zelltötung allein kann jedoch nur im beschränkten Maße den Gentransfer zwischen GVMs und den autochthonen Organismen in der Umwelt vermindern. Bleibt nach der Zelltötung die DNA intakt, kann sie durch Lyse der nicht mehr vermehrungsfähigen Zellen freigesetzt und über natürliche Transformationsprozesse verbreitet werden. Insbesondere die relativ lange

Überdauerung intakten genetischen Materials, das an Bodenminerale adsorbiert ist (Lorenz und Wackernagel, 1994), erhöht die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers durch natürliche Transformation. Außerdem könnte ein konjugativer Gentransfer zwischen den getöteten GVMs und autochthonen Organismen stattfinden. Nach der Induktion der bisher entwickelten Suizidsysteme bleibt nahezu immer die Zellintegrität weitestgehend erhalten. In der Folge können sich die Zellen zwar nicht mehr vermehren, aber sie könnten zumindest für eine begrenzte Zeit als Donor oder Rezipient am konjugativen Gentransfer teilnehmen. Dies wurde z. B. für Maxizellen gezeigt, die kein Chromosom mehr besitzen (Heinemann und Ankenbauer, 1993). Erfolgt der konjugative Gentransfer auf autochthone Bakterien, kann die rekombinante DNA von dort an andere Bakterien und Habitate weitergegeben werden. Bei einem Gentransfer von autochthonen Bakterien auf nicht mehr vermehrungsfähige GVMs könnte die rekombinante DNA in das aufgenommene selbsttransmissible Plasmid integriert und mit ihm weiter verbreitet werden. Ein ähnlicher Verbreitungsmechanismus ist möglich, wenn die getötete Zelle von einem transduzierenden Phagen infiziert wird, der ein Transposon oder ein Plasmidfragment mit Replikationsorigin enthält. Nach der Integration in die aufgenommenen Vektoren könnte die rekombinante DNA durch eine Zellyse in die Umwelt entlassen und durch natürliche Transformation von autochthonen Bakterien aufgenommen werden.

Ist nach der Induktion eines Suizidsystems der Zelltod mit der Produktion einer Endonuklease verbunden, die sowohl intrazellulär vorhandene DNA als auch jegliche aufgenommene DNA degradieren kann, wird die Wahrscheinlichkeit eines postmortalen Gentransfers stark verringert. Einer Induktion der in dieser Arbeit entwickelten Suizidsysteme folgt eine Umsetzung der hochmolekularen DNA in säurelösliche Fragmente (≤ 16 bp). Nach 3-24 h sind nur noch 5-20 % der DNA säurepräzipitierbar (Abb. 16, Abb. 19). Sowohl die Entlassung biologisch aktiver DNA aus den getöteten GVMs als auch die Etablierung von Fremd-DNA in den vermehrungsunfähigen Zellen kann dadurch minimiert werden.

Anhand der intrazellulären DNA-Degradierung ist eine Unterscheidung zwischen dem Abbau von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA nicht möglich. Es wurde zuvor berichtet, daß mit der *Serratia*-Nuklease als Tötungsfunktion maximal 70 % der Plasmid-DNA nach einer kurzen Induktionszeit degradiert werden kann (Ahrenholtz et al., 1994b; 1995). Ein verbesserter Abbau der Plasmid-DNA war nach der Induktion der Suizidsysteme mit der Endo I oder mit der Nuklease-Kombination nicht zu erwarten, weil die intrazelluläre DNA-Degradierung insgesamt deutlich weniger effizient war als nach der Induktion des Suizidsystems mit der *Serratia*-Nuklease als alleiniger Tötungsfunktion (s. Abb. 16 und Abb. 19). Es ist daher möglich, daß, wie schon bei den zuvor publizierten Suizidsystemen zu erwarten war, intakte Plasmide aus den getöteten Zellen

durch eine Zellyse freigesetzt werden und an natürlichen Transformationsprozessen teilnehmen können. Desweiteren kann nach einem ungewollten Überleben der GVMs oder während einer zeitlich begrenzten Existenz der GVMs in der Umwelt (z. B. zur Verrichtung einer speziellen Aufgabe) ein horizontaler Transfer von Plasmiden stattfinden. Wird mit dem Plasmid auch das Suizidsystem mit den Nukleasen als Tötungsfunktion übertragen, kann die Vervielfältigung, die Rekombination und die weitere Verbreitung des Plasmids verhindert werden. Das Suizidsystem wird nach der Aufnahme der Plasmide in den Rezipienten induziert, wenn kein Repressor-Gen in den Zellen vorhanden ist, das Repressor-Gen nicht exprimiert wird oder Promoter-Bereiche, auf die der Repressor nicht wirkt, eine tödliche Expression der Nuklease-Gene hervorrufen. Die Versuche, das Suizidsystem mit der Nuklease-Kombination in *Pseudomonas* und in *Acinetobacter* zu etablieren, schlugen vermutlich aus diesen Gründen fehl (5.11.2).

Zusammenfassend sind die in dieser Arbeit entwickelten Suizidsysteme genauso wirksam wie bisher publizierte Systeme, oder sogar noch wirksamer. Darüberhinaus ist das dauerhafte Entkommen der Zellen vom Tötungsprozeß durch eine geringe Segregationshäufigkeit und eine extrem niedrige Mutationsrate der Suizidsysteme (insbesondere mit Endo I als Suizidfunktion) deutlich geringer. Die Suizidsysteme können den horizontalen Gentransfer minimieren, weil sie im Gegensatz zu den bisherigen Systemen außer einer Zelltötung auch eine intrazelluläre DNA-Degradierung bewirken.

6.4 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Suizidsysteme könnten nach weiterer Optimierung und Anpassung in verschiedenen Anwendungen zum Einsatz kommen. Hierfür könnte eine andere Regulation erforderlich sein, die außer einer nachhaltigeren Induktion auch eine Anwendung des Suizidsystems z. B. in der Umwelt ermöglicht. Die bisher bekannten Promoter werden jedoch nicht effektiv genug reguliert, sodaß ein relativ hohes Basalniveau der Expression entsteht. Die größte Aussicht auf eine erfolgreiche Veränderung der Expressionskontrolle besteht deshalb vermutlich beim Suizidsystem mit der Endo I als einzige Suizidfunktion, denn die Wirtszellen tolerieren aufgrund der Inhibition des Enzyms durch intrazelluläre RNA eine relativ hohe basale *endAΔL*-Expression. Sollen hingegen die *Serratia*-Nuklease oder die Nuklease-Kombination als Tötungsfunktion dienen, müßte eine neue Regulationseinheit mit ähnlichen Eigenschaften des P_L -CI-Regulationssystems konstruiert werden. Durch die Kombination der Endo I mit der *Serratia*-Nuklease wurde die intrazelluläre DNA-Degradierung nicht im erhofften Maße verbessert. Möglicherweise führt die gleichzeitige Produktion einer RNase, die aktiver bzw. stabiler als die *Serratia*-Nuklease ist, zu einer wirksameren Degradierung der intrazellulären RNA, sodaß die nukleolytische Aktivität der Endo I bedeutender ge-

steigert wird. Hierfür könnte z. B. die Barnase von *Bacillus amyloliquefaciens* verwendet werden, die zuvor ebenfalls als Tötungsfunktion eingesetzt wurde (Yazynin et al., 1996). Es ist insbesondere *in situ* zu klären, in welchem Ausmaß der horizontale Transfer von chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA nach Induktion des Suizidsystems beeinträchtigt ist. Weiterhin ist es von Interesse, ob das Suizidsystem auch in anderen Bakterien funktioniert. Hierzu müßte in den Bakterien vor allem eine ausreichende Repression der Nuklease-Gene erreicht werden, um das Suizidsystem in den Zellen etablieren zu können. Möglicherweise kann das Suizidsystem mit der Endo I oder mit der Nuklease-Kombination in medizinischen Anwendungen, wie z. B. zur Attenuierung von Bakterien bei der Lebendvaccinierung, eingesetzt werden. Die abtötende Wirkung der Suizidsysteme bei verträglichen Temperaturen und in Bakterien, die zur Lebendvaccinierung geeignet sind, müßte zuvor jedoch genauer untersucht werden. Außerdem könnten die Suizidsysteme in der industriellen Produktion zur Entfernung hochmolekularer DNA verwendet werden. Sie könnten ebenfalls zu molekulargenetischen Produkten, wie z. B. einem Klonierungssystem mit positiver Selektion rekombinanter Moleküle, weiter entwickelt werden. Fehlt der Repressor in den Rezipientenzellen, können sich nur Transformanten vermehren, deren Suizidsystem durch eine Insertion von Fremd-DNA inaktiviert wurde. Neue Hinweise auf die noch ungeklärte Funktion der Endo I könnte die Aufklärung der Expressionskontrolle des *endA* ergeben. Weiterhin müßte untersucht werden, ob es ein Zusammenwirken der Endo I mit anderen Zellkomponenten, wie z. B. mit der periplasmatischen RNase I oder membrandestabilisierenden Proteinen (RelF, Gef), gibt. In diesem Zusammenhang wäre die Identifizierung der RNA interessant, die offenbar mit Endo I im Periplasma komplexiert ist. Die genannten Punkte zur Weiterentwicklung und Optimierung der Suizidsysteme lassen weitere interessante Ergebnisse erwarten, die einen wichtigen Beitrag zum sicheren Einsatz mit GVMs leisten und zur Entwicklung von neuen molekulargenetischen Produkten führen können. Desweiteren könnte eine fortführende Untersuchung zur Endo I grundlegende Erkenntnisse über die Vorgänge im Periplasma und über die Bedeutung der dort lokalisierten Funktionen für Gram⁻-Bakterien liefern.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein neues und flexibel anwendbares System für Bakterien entwickelt, das ein kontrollierbares Abtöten der Zellen mit intrazellulärer DNA-Degradierung bei hoher Plasmidstabilität ohne Selektion verbindet. Hierfür wurde die periplasmatische Endonuklease I von *Escherichia coli* (Endo I) charakterisiert und das entsprechende Strukturgen (*endA*) zur Konstruktion des Suizidsystems verwendet. Die Anwendung des Suizidsystems könnte einen Beitrag zum sicheren Einsatz von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVMs) leisten, da es das Überleben der GVMs und die Verbreitung des rekombinanten Erbmaterials in der Umwelt minimieren kann.

Charakterisierung der Endo I. Die Expression des *endA* wird Wachstumsphasen-abhängig reguliert. Die Endo I-Menge einer Zelle stieg in der lag-Phase der Kultur bis zum Übergang in die log-Phase an und nahm dann bis zur stat-Phase kontinuierlich ab. Da in Zellen der log-Phase der Promoterbereich vor dem *endA* nur wenig aktiv und die Endo I-Überproduktion trotz hoher *endA*-Kopiezahl relativ gering war, wurde eine transkriptionelle Regulation der Genexpression vermutet. Weder die Überproduktion noch die Defizienz des Enzyms wirkte sich unter Laborbedingungen auf die Dauer der lag-Phase, die Lebensfähigkeit und die Generationszeit der Zellen aus. Desweiteren kodieren verschiedene Gram⁻-Bakterien Endonukleasen mit großer Identität zur Endo I (*Erwinia chrysanthemi* 77%, *Vibrio cholerae* 60%, *Aeromonas hydrophila* 54%). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen deutet auf eine sehr ähnliche Struktur der Enzyme und einen gemeinsamen evolutionären Ursprung. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Funktion der Endo I zwar noch ungeklärt, aber offenbar nicht unbedeutend für die Zelle ist. Aus dem Periplasma freigesetzte Endo I ist mit RNA komplexiert. Die Endo I-Aktivität wurde durch RNA zwar inhibiert, aber die strangbrechende Eigenschaft des Enzyms veränderte sich dadurch nicht. Endo I erzeugte bei niedrigen Salzkonzentrationen (0,05 M) DNA-Doppelstrangbrüche und bei hohen Salzkonzentrationen (0,5 M) Einzelstrangbrüche. Bei mittleren Salzkonzentrationen (0,2 M) war die Enzymaktivität am größten, und es waren beide strangbrechenden Eigenschaften wirksam, die durch Zugabe von tRNA gleichermaßen inhibiert wurden. Nach dreitägiger Inkubation bei 0-42°C war 16-45% und nach 20 min bei 95°C noch 10% der Endo I aktiv. Diese hohe Stabilität des Enzyms kommt offenbar durch Disulfidbrücken zustande, deren Notwendigkeit für die Aktivität der Endo I gezeigt wurde.

Entwicklung von Suizidsystemen mit Nukleasen als Tötungsfunktion. Nach der Bestimmung der Signalpeptid-Spaltstelle der Endo I wurde der Signalpeptid-kodierende Teil des *endA* exakt deletiert. Dadurch wurde der Export des Proteins verhindert, sodaß das intrazellulär wirksame Enzym den Zelltod verursachen kann. Das verkürzte Gen (*endAΔL*) wurde in einem Plasmid unter die Transkriptionskontrolle des P_L -Promoters

vom Bakteriophagen λ gestellt. Die Expression wird von einem thermosensiblen Repressor reguliert, dessen Allel (*cI857*) im Chromosom der Wirtszelle lokalisiert ist. Die thermische Inaktivierung des Repressors überlebten nur 0,001% der Zellen, und über 90% der zellulären DNA wurde zu biologisch inaktiven Fragmenten zerkleinert, ohne daß eine Zellyse zu beobachten war. Die abtötende Wirkung eines entsprechenden Systems mit dem verkürzten Gen (*nucΔL*) der extrazellulären Nuklease von *Serratia marcescens* (*Serratia*-Nuklease) war zwar ähnlich, die DNA wurde jedoch deutlich schneller als beim *endAΔL*-System degradiert. Offenbar ist der DNA-Abbau aufgrund der Inhibition der Endo I durch zelluläre RNA verlangsamt. In einem weiteren Konstrukt werden beide Nuklease-Gene von einem gemeinsamen Promoter kontrolliert. Mit dieser Nuklease-Kombination war das Zellüberleben nach der Thermoinduktion nochmals zehnfach geringer als mit einer Nuklease, und der DNA-Abbau verlief intermediär.

Entkommen vom Tötungsprozeß. Über 90% der Zellen, die die Induktion des Suizidsystems in selektionsfreiem Medium überlebten, hatten das Suizidplasmid segregiert. Durch Integration der *hok/sok*-Region vom Plasmid R1 wurde die Stabilität der Suizidplasmide in den Zellen um mehr als zwei Größenordnungen erhöht, sodaß zur Selektion plasmidhaltiger Zellen kein Antibiotikum mehr notwendig war. Bei mehr als 80% der jetzt noch überlebenden Zellen war das Suizidsystem ungenügend induziert. Nur wenige waren Mutanten mit einem geringer wirksamen Suizidsystem. Suizidresistente Mutanten waren unter den Zellen mit Endo I oder der Nuklease-Kombination als Tötungsfunktion extrem selten (ca. 2×10^{-9} pro Zelle und Generation). Mit der *Serratia*-Nuklease als Tötungsfunktion war die Mutationsrate hingegen ca. tausendfach höher.

Weiterentwicklung der Suizidsysteme. Das Repressor-Gen wurde in das Suizidplasmid integriert, und es wurde eine Suizidkassette konstruiert, die in beliebige Vektoren inseriert werden kann. Die Suizidkassette kodiert die Nuklease-Kombination, alle Regulationselemente der Suizidkontrolle, die *hok/sok*-Region und eine Kanamycin-Resistenz. Infolge der Erhöhung der *cI857*-Kopiezahl war die abtötende Wirkung des Suizidsystems zwar zehnfach geringer als bei chromosomal lokalisiertem Repressor-Gen, aber die Lebensfähigkeit der Zellen mit reprimiertem Suizidsystem war wesentlich verbessert. Desweiteren bewirkte die erhöhte Repressorproduktion eine verringerte Thermosensibilität der Zellen. Die Zellen vermehren sich bei 37°C, und eine Temperaturerhöhung um 1-5°C induziert ein effizientes Abtöten. Ein Plasmid mit weitem Wirtsbereich und integrierter Suizidkassette konnte in den natürlich transformierbaren Bakterien *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina* und *Acinetobacter* nicht etabliert werden, obwohl das Plasmid ohne Suizidkassette in diesen Bakterien repliziert. Offenbar ist die Tötungsfunktion in diesen Bakterien zwar wirksam, aber das Suizidsystem wird nicht bzw. nicht effizient genug reprimiert. Alle Zellen dieser Bakterien, die das Suizidsystem z. B. durch horizontalen Gentransfer aufnehmen, werden daher sofort getötet.

8 Literaturverzeichnis

- Abraham, J. M., Freitag, C. S., Clements, J. R., Eisenstein, B. I. (1985): An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5724-5727.
- Ahrenholtz, I., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1994a): The extracellular nuclease of *Serratia marcescens*: studies on the activity *in vitro* and effect on transforming DNA in a groundwater aquifer microcosm. Arch. Microbiol. 161:176-183.
- Ahrenholtz, I., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1994b): A conditional suicide system in *Escherichia coli* based on the intracellular degradation of DNA. Appl. Environ. Microbiol. 60:3746-3751.
- Ahrenholtz, I. (1995): Die extrazelluläre Nuklease von *Serratia marcescens* SM6: Untersuchungen zur Aktivität *in vitro* und unter naturnahen Bedingungen und Verwendung in einem neu entwickelten bakteriellen Suizidsystem. Dissertation, Universität Oldenburg
- Ananthaswamy, H. N. (1977): The release of endonuclease I from *Escherichia coli* by a new cold shock procedure. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76:289-298.
- Ankenbauer, R. G. (1997): Reassessing forty years of genetic doctrine: retrotransfer and conjugation. Genetics 145:543-549
- Austin, H. K., Hartel, P. G., Coleman, D. C. (1990): Effect of genetically altered *Pseudomonas solanacearum* on predatory protozoa. Soil Biol Biochem 22:115-117.
- Bachmann, B. J. (1990): Linkage map of *Escherichia coli* K12, edition 8. Microbiol. Rev. 54:130-197.
- Ball, T. K., Suh, Y., Benedik, M. J. (1992): Disulfide bonds are required for *Serratia marcescens* nuclease activity. Nucleic Acids Res. 20:4971-4974.
- Bardwell, J. C. (1994): Building bridges: disulphide bond formation in the cell. Mol. Microbiol. 14:199-205.
- Bej, A. K., Perlin, M. H., Atlas, R. M. (1988): Model suicide vector for containment of genetically engineered microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 54:2472-2477.
- Berg, P., Baltimore, D., Brenner, S., Roblin III, R. O., Singer, M. F. (1975): Asilomar conference on recombinant DNA molecules. Science 188:991-994.
- Bernard, H.-U., Remaut, E., Hershfield, M. V., Das, H. K., Helinski, D. R., Yanofsky, C., Franklin, N. (1979): Construction of plasmid cloning vehicles that promote gene expression from the bacteriophage lambda P_L promoter. Gene 5:59-76.
- Bernardi, G., Cordonnier, C. (1965): Mechanism of degradation of DNA by endonuclease I from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 11:141-143.
- Biedermann, K., Jepsen, P. K., Riise, E., Svendsen, I. (1989): Purification and characterization of a *Serratia marcescens* nuclease produced by *Escherichia coli*.

- Carlsberg Res. Commun. 54:17-27.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., Falkow, S. (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles: II. A multiple cloning system. *Gene* 2:95-113.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bremer, H., Dennis, P. P. (1996): Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In: Neidhardt, F. C. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, pp 1553-1569.
- Calos, M. P. (1978): DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an 'up' promoter mutation. *Nature* 274:762-765.
- Chang, A. C. Y., Cohen, S. N. (1978): Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134:1141-1156.
- Chang, M. C., Chang, S. Y., Chen, S. L.; Chuang, S. M. (1992): Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding an extracellular deoxyribonuclease (DNase) from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* 122:175-180.
- Chao, W. L., Feng, R. L. (1990): Survival of genetically engineered *Escherichia coli* in natural soil and river water. *J Appl Bacteriol* 68:319-325.
- Cherepanov, P. P., Wackernagel, W. (1995): Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9-14.
- Cleaver, J. E., Boyer, H. W. (1992): Solubility and dialysis limits of DNA oligonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 262:116-124.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., Helling, R. B. (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmid *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3240-3244.
- Contreras, A., Molin, S., Ramos, J. L. (1991): Conditional suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1504-1508.
- Cordonnier, C., Bernardi, G. (1965): Localization of *E. coli* endonuclease I. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 20:555-559.
- Courtney, M., Buchwalder, A., Tessier, L.-H., Jaye, M., Benavente, A., Balland, A., Kohli, V., Lathe, R., Tolstoshev, P., Lecocq, J.-P. (1984): High-level production of biologically active human α 1-antitrypsin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:669-673.
- Curtiss III, R., Inoue, M., Pereira, D., Hsu, J. C., Alexander, L., Rock, L. (1977): Construction and use of safer bacterial host strains for recombinant DNA research.

- In: Scott, W. A., Werner, R. (eds) Molecular cloning of recombinant DNA. Academic Press, New York, pp 99-111.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983): The tac promoters: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25.
- Diaz, E., Munthali, M., de Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1994): Universal barrier to lateral spread of genes among microorganisms. Mol. Microbiol. 13:855-861.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. 16:6127-6145.
- Doyle, J. D., Short, K. A., Stotzky, G., King, R. J., Seidler, R., Olsen, R. H. (1991): Ecologically significant effect of *Pseudomonas putida* PPO301(pRO103), genetically engineered to degrade 2,4-dichlorophenoxyacetat, on microbial populations and processes in soil. Can. J. Microbiol. 37:682-691.
- Dunn, J. J. (182): Ribonuclease III. In: Boyer, P. D. (ed) The enzymes. Vol. 15. Academic Press, New York, pp 485-499.
- Dürwald, H., Hoffmann-Berling, H. (1968): Endonuclease I-deficient and ribonuclease I-deficient *Escherichia coli* mutants. J. Mol. Biol. 34:331-346.
- Edman, P., Begg, G. (1967): A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1:80-91.
- Ehrlich, S. D., Bertazzoni, U., Bernardi, G. (1973): The specificity of *Escherichia coli* endonuclease I. Eur. J. Biochem. 40:149-153.
- Firth, N., Ippen-Ihler, K., Skurray, R. A. (1996): Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. In: Neidhardt, F. C. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, pp 2377-2401.
- Focareta, T., Manning, P. (1987): Extracellular proteins of *Vibrio cholerae*: molecular cloning, nucleotide sequence and characterization of the deoxyribonuclease (DNase) together with its periplasmic localization in *Escherichia coli* K-12. Gene 53:31-40.
- Fulthorpe, R. R., McGowan, C., Maltseva, O. V., Holben, W. E., Tiedje, J. M. (1995): 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes. Appl. Environ. Microbiol. 61:3274-3281.
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B., Molin, S. (1986): Unique type of plasmid maintenance: postsegregational killing of plasmid-free cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3116-3120.
- Gerdes, K. (1988): The *parB* (*hok/sok*) locus of plasmid R1: A general purpose plasmid stabilization system. Bio/Technology 6:1402-1405.
- Gerdes, K., Poulsen, L. K., Thisted, T., Nielsen, A. K., Martinussen, J., Andreasen, P. H. (1990): The *hok* killer gene family in Gram-negative bacteria. New Biologist 2:946-956.
- Goebel, W., Helinski, D. R. (1970): Nicking activity of an endonuclease I-transfer ribonucleic acid complex of *Escherichia coli*. Biochemistry 9:4793-4801.

- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- Hartley, R. W. (1988): Barnase and barstar: expression of its inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. J Mol Biol 202:913-915.
- Hecht, R., Thielmann, H. W. (1978): Purification and characterization of an endonuclease from *Micrococcus luteus* that acts on depurinated and carcinogen modified DNA. Eur. J. Biochem. 89:607-618.
- Heinemann, J. A., Sprague, G. F. j. (1989): Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. Nature 340:205-209.
- Heinemann, J. A. (1991): Genetics of gene transfer between species. Trends Genet. 7:181-185.
- Heinemann, J. A., Ankenbauer, R. G. (1993): Retrotransfer of incP plasmid R751 from *Escherichia coli* maxicells: evidence for the genetic sufficiency of selftransferable plasmids for bacterial conjugation. Mol. Microbiol. 10:57-62.
- Henschke, R. B., Schmidt, F. R. J. (1990): Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora *in situ*. Curr. Microbiol. 20:105-110.
- Higgins, D. G., Sharp, P. M. (1988): CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene 73:237-244.
- Holmes, D. S., Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114:193-197.
- Howard-Flanders, P. B., R.B., Theriot, L. (1966): Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidin dimers and certain other mutagen products from DNA. Genetics 53:1119-1136.
- Jekel, M., Wackernagel, W. (1994): Location of the *endA* gene coding for endonuclease I on the physical map of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. J. Bacteriol. 176:1550-1551.
- Jekel, M., Wackernagel, W. (1995): The periplasmic endonuclease I of *Escherichia coli* has amino-acid sequence homology to the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas hydrophila*. Gene 154:55-59.
- Jensen, L. B., Ramos, J. L., Kaneva, Z., Molin, S. (1993): A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. Appl. Environ. Microbiol. 59:3713-3717.
- Kenyon, C. J., Walker, G. C. (1980): DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2819-2823.
- Kenyon, C. J., Brent, R., Ptashne, M., Walker, C. (1982): Regulation of damage-inducible genes in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 160:445-457.
- Klemm, P., Jensen, L. B., Molin, S. (1995): A stochastic killing system for biological

- containment of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 61:481-486.
- Knudsen, S. M., Karlström, O. H. (1991): Development of efficient suicide mechanisms for biological containment of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57:85-92.
- Knudsen, S., Saadbye, P., Hansen, L. H., Collier, A., Jacobson, B. L., Schlundt, J., Karlström, O. H. (1995): Development and testing of improved suicide functions for biological containment of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61:985-991.
- Kokjohn, T. A. (1989): Transduction: mechanism and potential for gene transfer in the environment. In: Levy, S. B., Miller, R. B. (eds) Gene transfer in the environment. MacGraw-Hill, New York, pp 73-97.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop II, R. M., Peterson, K. M. (1994): pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. BioTechniques 16:800.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. I., Peterson, K. M. (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 156:59-61.
- Kozloff, L. M. (1953): Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology. Vol. 18. Long Island Biological Association, Cold Spring Harbor, Long Island, New York, pp 209.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lanzer, M., Bujard, H. (1988): Promoters largely determine the efficiency of repressor action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8973-8977.
- Legerski, R. J., Robberson, D. L. (1985): Analysis and optimization of recombinant DNA joining reactions. J. Mol. Biol. 181:297-312.
- Lehman, I. R., Roussos, G. G., Pratt, E. A. (1962a): The deoxyribonucleases of *Escherichia coli*. II. Purification and properties of a ribonucleic acid-inhibitable endonuclease. J. Biol. Chem. 237:819-828.
- Lehman, I. R., Roussos, G. G., Pratt, E. A. (1962b): The deoxyribonucleases of *Escherichia coli*. III. Studies on the nature of the inhibition of endonuclease by ribonucleic acid. J. Biol. Chem. 237:829-833.
- Linn, T., St. Pierre, R. (1990): Improved vector system for constructing translational fusions that ensures independent translation of *lacZ*. J. Bacteriol. 172:1077-1084.
- Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1993): Bacterial gene transfer in the environment. In: Wöhrmann, W., Tomiuk, J. (eds) Transgenic organisms. Risk assessment of deliberate release. Birkhäuser-Verlag, Basel
- Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol. Rev. 58:563-602.
- Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1996): Mechanisms and consequences of horizontal gene transfer in natural bacterial populations. In: Tomiuk, J., Wöhrmann, K., Sent-

- ker, A. (eds) Transgenic Organisms- Biological and social implications. Birkhäuser Verlag, Basel
- Masters, M. (1996): Generalized transduction. In: Neidhardt, F. C. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, pp 2421-2441.
- Mazodier, P., Davies, J. (1991): Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 25:147-171.
- Melgar, E., Goldthwait, D. A. (1968a): Deoxyribonucleic acid nucleases: I. The use of a new method to observe the kinetics of deoxyribonucleic acid degradation by deoxyribonuclease I, deoxyribonuclease II, and *Escherichia coli* endonuclease I. *J. Biol. Chem.* 243:4401-4408.
- Melgar, E., Goldthwait, D. A. (1968b): Deoxyribonucleic acid nucleases: II. The effects of metals on the mechanism of action of deoxyribonuclease I. *J. Biol. Chem.* 243:4409-4416.
- Mercenier, A., Chassy, B. M. (1988): Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie* 70:503-517.
- Miller, J. H. (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Molin, S., Klemm, P., Poulsen, K., Biehl, H., Gerdes, K., Andersson, P. (1987): Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids. *Bio/Technology* 5:1315-1318.
- Molin, S., Klemm, P., Poulsen, L. K., Biehl, H., Gerdes, K., Anderson, P. (1988): Biological containment of bacteria and plasmid to be released in the environment. In: Klingmüller, W. (ed) Risk assessment for deliberate releases. Springer Verlag, Berlin, pp 127-136.
- Molin, S., Boe, L., Jensen, L. B., Kristensen, C. S., Giskov, M., Ramos, J. L., Bej, A. K. (1993): Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:139-166.
- Moulard, M., Condemine, G., Robert-Baudouy, J. (1993): Characterization of the *nucM* gene coding for a nuclease of the phytopathogenic bacteria *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 8:685-695.
- Moulard, M., Condemine, G., Nasser, W., Robert-Baudouy, J. (1995): Purification and Characterization of the nuclease NucM of *Erwinia chrysanthemi*. *Biochim. Biophys. Acta* 1262:133-138.
- Munthali, M. T., Timmis, K. N., Diaz, E. (1996): Use of colicin E3 for biological containment of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1805-1807.
- Nestlé, M., Roberts, W. K. (1969): An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244:5213-5218.

- Nikaido, H. (1996): Outer membrane. In: Neidhardt, F. C. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, pp 29-47.
- Nossal, N. G., Heppel, L. A. (1966): The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.* 241:3055-3062.
- O'Connor, C. D., Timmis, K. N. (1987): Highly repressible expression system for cloning genes that specify potentially toxic proteins. *J. Bacteriol.* 169:4457-4462.
- Obinata, M., Mizuno, D. (1968): Intracellular localization of deoxyribonucleases in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 105:98-106.
- Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M. (1981): Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J. Mol. Biol.* 147:217-226.
- Ono, K., Akimoto, S., Ohnishi, Y. (1987): Nucleotide sequence of the *pnd* gene in plasmid R483 and role of the *pnd* gene product in plasmolysis. *Microbiol. Immunol.* 31:1071-1083.
- Pearson, W., Lipman, D. J. (1988): Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448.
- Pemberton, J. M., Penfold, R. J. (1992): High-frequency electroporation and maintenance of pUC- and pBR-based cloning vectors in *Pseudomonas stutzeri*. *Curr. Microbiol.* 25:25-29.
- Randall, L. L., Hardy, S. J. S. (1986): Correlation of competence for export with the lack of tertiary structure of mature species: a study *in vivo* of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell* 46:921-928.
- Recorbet, G., Robert, C., Givaudan, A., Kudla, B., Normand, P., Faurie, G. (1993): Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1361-1366.
- Ronchel, M. C., Ramos, C., Jensen, L. B., Molin, S., Ramos, J. L. (1995): Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental application in bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2990-2994.
- Rusche, J. R., Howard-Flanders, P. (1985): Hexamine cobalt chloride promotes intermolecular ligation of blunt end DNA fragments by T4 ligase. *Nucleic Acids Res.* 13:1997-2008.
- Sakikawa, T., Akimoto, S., Ohnishi, Y. (1989): The *pnd* gene in *E. coli* plasmid R16: nucleotide sequence and gene expression leading to cell Mg^{2+} release and stable RNA degradation. *Biochim. Biophys. Acta* 1007:158-166.
- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B. (1994): Broad host range gene transfer: plasmids and conjugative transposons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15:15-22.
- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., Stevens, A. M., Li, L.-Y. (1995): Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 59:579-590.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463-5467.
- Sargentini, N. J., Smith, K. C. (1986): Quantitation of the involvement of the *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *recJ*, *recN*, *lexA*, *radA*, *radB*, *uvrD*, and *umuC* genes in the repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. Radiat. Res. 107:58-72.
- Schweder, T., Schmidt, I., Herrmann, H., Neubauer, P., Hecker, M., Hofmann, K. (1992): An expression vector system providing plasmid stability and conditional suicide of plasmid-containing cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:91-93.
- Schweder, T. (1993): Konstruktion und Untersuchung von alternativen biologischen "containment"-Systemen für *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Greifswald
- Schweder, T., Hofmann, K., Hecker, M. (1995): *Escherichia coli* K12 *relA* strains as safe hosts for expression of recombinant DNA. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:718-723.
- Scott, J. R., Fröhlich, B. J. (1986): Regulation of replication of the plasmid prophage P1. In: Levy, S. B., Novack, R. P. (eds) Antibiotic resistance genes: ecology, transfer and expression. Cold Spring Harbor Press, New York, pp 153-164.
- Shortman, K., Lehman, I. R. (1964): The deoxyribonucleases of *Escherichia coli*: VI. Changes in the enzyme levels in response to alterations in physiological state. J. Biol. Chem. 239:2964-2974.
- Smit, E., van Elsas, J. D., van Veen, J. A., M., d. V. W. (1991): Plasmid transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous bacteria in soil using bacteriophage FP2f for donor counterselection. App. Environ. Microbiol. 57:3482-3488.
- Smith, M. W., Feng, D. F., Doolittle, R. F. (1992): Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfers. Trends Biochem. Sci. 17:489-493.
- Snyder, L. (1995): Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents ? Mol. Microbiol. 15:415-420.
- Somerville, R. L., Shieh, T.-L. N., Hagedwood, B., Cui, J. (1991): Gene expression from multicopy T7 promoter vectors proceed at single copy rates in the absence of T7 RNA polymerase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 181:1056-1062.
- Studier, F. W. (1965): Sedimentation studies of size and shape of DNA. J. Mol. Biol. 11:373-390.
- Studier, F. W., Moffat, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189:113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. (1990): Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods in Enzymology. Vol. 185:

- Gene Expression Technology. Academic Press Inc., San Diego, New York, pp 60-89.
- Syvanen, M. (1994): Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences. *Annu. Rev. Genet.* 28:237-261.
- Szafranski, P., Mello, M., Sano, T., Smith, C. L., Kaplan, D. L., Cantor, C. (1997): A new approach for containment of microorganisms: dual control of streptavidin expression by antisense RNA and the T7 transcription system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1059-1063.
- Tabor, S., Richardson, C. C. (1985): A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1074-1078.
- Tanhauser, S. M., Jewell, D. A., Tu, C. K., Silverman, D. N., Laipis, P. J. (1992): A T7 expression vector optimized for site-directed mutagenesis using oligodeoxyribonucleotide cassettes. *Gene* 117:113-117.
- Thisted, T., Allan, K. N., Gerdes, K. (1994a): Mechanism of post-segregational killing: translation of *hok*, *srnB* and *pnd* mRNAs of plasmids R1, F and R483 is activated by 3'-end processing. *EMBO J.* 13:1950-1959.
- Thisted, T., Sørensen, S., Gerhart, E., Wagner, H., Gerdes, K. (1994b): Mechanism of postsegregational killing: sok antisense RNA interacts with *hok* mRNA via its 5'-end single-stranded leader and competes with the 3'-end of *hok* mRNA for binding to the *mok* translational initiation region. *EMBO J.* 13:1960-1968.
- Thole, H. H., Jungblut, P. W. (1994): The ligand-binding site of the estradiol receptor resides in a non-covalent complex of two consecutive peptides of 17 and 7 kDa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:826-833.
- Thoms, B., Wackernagel, W. (1982): UV-induced alleviation of λ restriction in *Escherichia coli* K-12: kinetics of induction and specificity of this SOS function. *Mol. Gen. Genet.* 186:111-117.
- Uhlin, B. E., Molin, S., Gustaffson, P., Nordström, K. (1979): Plasmids with temperature-dependent copy number for amplification of cloned genes and their products. *Gene* 6:91-106.
- v. Heijne, G. (1985): Signal sequences: the limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184:99-105.
- v. Heijne, G. (1986): A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 4:4683-4690.
- Vaux, D. L., Strasser, A. (1996): The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2239-2244.
- Wang, Z., Crawford, D., Pometto III, A. L., Raffi, F. (1989): Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem. *Can. J. Microbiol.* :535-543.
- Weisberg, R. A. (1996): Specialized transduction. In: Neidhardt, F. C. (ed) *Escherichia*

- coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, pp 2442-2448.
- Wickner, W., Driessen, A. J. M., Hartl, F. U. (1991): The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Ann. Rev. Biochem.* 60:101-124.
- Wilson, M., Lindow, S. E. (1993): Release of recombinant microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:913-944.
- Winkler, U., Ruger, W., Wackernagel, W. (1976): Bacterial, phage and molecular genetics. Springer Verlag, Berlin
- Wright, M. (1971): Mutants of *Escherichia coli* lacking endonuclease I, ribonuclease I, or ribonuclease II. *J. Bacteriol.* 107:87-94.
- Wulfing, C., Pluckthun, A. (1994): Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12:685-692.
- Yarmolinsky, M. B. (1995): Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 267:836-837.
- Yasuda, S., Takagi, T. (1983): Overproduction of *Escherichia coli* replication proteins by the use of runaway-replication plasmids. *J. Bacteriol.* 154:1153-1161.
- Yazynin, S. A., Deyev, S. M., Jucovic, M., Hartley, R. W. (1996): A plasmid vector with positive selection and directional cloning based on a conditionally lethal gene. *Gene* 169:131-132.
- Yin, X., Stotzky, G. (1997): Gene transfer among bacteria in natural environments. *Adv. Appl. Microbiol.* 45:153-212.
- Zabel, D. J., Trucksis, M., Depew, R. E. (1980): *Salmonella typhimurium* mutants with reduced levels of transfer ribonucleic acid-inhibitable endodeoxyribonucleolytic activity. *J Bacteriol* 144:173-178.

9 Verzeichnis eigener Publikationen

Wissenschaftliche Artikel:

- Jekel, M., Wackernagel, W. (1994): Location of the *endA* gene for endonuclease I on the physical map of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. J. Bacteriol. 176:1550-1551.
- Jekel, M., Wackernagel, W. (1995): The periplasmic endonuclease I of *Escherichia coli* has amino-acid sequence homology to the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas hydrophila*. Gene 154:55-59.
- Jekel, M., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1996): A conditional suicide system for genetically engineered bacteria based on the endonuclease I gene of *Escherichia coli*. In: Schmidt, E. R., Hankeln, Th. (eds.), Transgenic Organisms and Biosafety, Springer Verlag, Berlin, pp 165 - 169.

Abstracts zu Tagungsbeiträgen:

- Jekel, M., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1993): Cloning and sequencing of the *endA* gene encoding the periplasmic endonuclease I of *Escherichia coli*. Frühjahrstagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Leipzig, Bioengineering, Sonderausgabe März 1993, Abstract zum Vortrag V432.
- Jekel, M., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1994): A conditional suicide system for genetically engineered bacteria based on the endonuclease I gene of *Escherichia coli*. Workshop on Biosafety: Stability of DNA, horizontal gene transfer and expression of transgenes, Mainz (1994), Abstract zum Poster.
- Jekel, M., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1995): A conditional suicide system for genetically engineered bacteria based on the endonuclease I gene of *Escherichia coli*. Frühjahrstagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Stuttgart, Biospektrum, Sonderausgabe März 1995, Abstract zum Poster PC138.
- Jekel, M., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1996): Kontrollierbarer Selbstmord bei *Escherichia coli* durch intrazelluläre DNA-Degradierung. Erwin-Riesch-Symposium über Plasmide und Genregulation, Würzburg 1996, Abstract zum Vortrag V8.
- Jekel, M., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1997): A conditional suicide system based on controlled intracellular DNA degradation for industrial applications. Frühjahrstagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hamburg, Biospektrum, Sonderausgabe März 1997, Abstract zum Poster PI025.

Patent:

Ahrenholtz, I., Jekel, M., Lorenz, M. G., Wackernagel, W. (1994): Conditional suicide cells of *Escherichia coli*. Europäisches Patentamt, München, angemeldet am 10.06.1994, (EPA94108958), Patentnr. 95923293.5-2105

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Ap, Ap ^R	Ampicillin, Ampicillin-resistent
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
°C	Grad Celsius
Cm, Cm ^R	Chloramphenicol, Chloramphenicol-resistent
cm	Zentimeter
CM	Carboxymethyl
d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsb	DNA-doppelstrangbrechende Aktivität
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Enzymeinheit(en)
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Endo I	Endonuklease I von <i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
Gram ⁻	Gram-negativ
h	Stunde(n)
³ H	Tritium
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb	1000 Basenpaare
Km, Km ^R	Kanamycin, Kanamycin-resistent
l	Liter
lag-Phase	Wachstumsphase zwischen stationärer und exponentieller Zellvermehrung
λ	Bakteriophage Lambda
LB	Luria-Bertani-Vollmedium
log-Phase	exponentielle Wachstumsphase
M	Mol pro Liter
min	Minute(n)
mg	Milligramm

mM	Millimol pro Liter
mmol	Millimol
M _r	relatives Molekulargewicht
mRNA	Messenger-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
ORF	offener Leserahmen
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
PP	neutraler Phosphatpuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
<i>Serratia</i> -Nuklease	Extrazelluläre Nuklease von <i>Serratia marcescens</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
ssb	DNA-einzelstrangbrechende Aktivität
stat-Phase	stationäre Wachstumsphase
t	Zeit
T7	Bakteriophage T7
TBEE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
V	Volt
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
Vol.	Volumen

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg im Fachbereich Biologie in der von Herrn Prof. Dr. W. Wackernagel geleiteten Arbeitsgruppe Genetik angefertigt.

Bei Herrn Prof. Wackernagel bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und -materials sowie für die Betreuung während der Promotion.

Herrn Priv-Doz. Dr. M. G. Lorenz und Frau B. Thoms danke ich für die Bereitstellung verschiedener Bakterienstämme und Phagen.

Herrn Dr. H. Thole (MPI für experimentelle Endokrinologie, Hannover) danke ich für die Bestimmung der aminoterminalen Sequenz der Endonuklease I von *E. coli*.

Von allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Genetik danke ich insbesondere Herrn Dipl.-Biol. Udo Cordes für die vielen Hilfen bei der computergestützten Datenverarbeitung, für technische Tips und für die schönen Momente während des Laboralltages. Allen übrigen Kollegen sei für gelegentliche Hilfe und Diskussionsbereitschaft ebenfalls gedankt.

Ganz besonderer Dank geht an meine Familie. Meiner Frau Britta danke ich für die unendliche Geduld mit mir, meiner Arbeit und unseren beiden Töchtern. Ihr Verständnis für die vielen langen Arbeitstage, ihre Bereitschaft zu Entbehrungen und ihre unschätzbaren Aufmunterungen in den oft schwierigen Zeiten der Promotion haben wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Meinen Töchtern Ann-Christin und Melissa möchte ich besonders für ihre Fröhlichkeit und Zuneigung danken, aus der ich häufig neue Kräfte schöpfte. Meinen Eltern danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung während dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Manfred Richard Jekel
Geburtsdatum: 11.02.1963
Geburtsort: Bremerhaven
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Schulischer Werdegang:

1969 - 1973: Lutherschule (Grundschule), Bremerhaven
1973 - 1982: Schulzentrum Geschwister Scholl (Gymnasium),
Bremerhaven ;
05.1982 Allgemeine Hochschulreife

Wissenschaftlicher Werdegang:

10.1984 - 07.1992: Studium der Biologie (Diplom) an der Carl v. Ossietzky
Universität Oldenburg; Anfertigung der Diplomarbeit mit
dem Titel „Klonierung und Sequenzierung des
Strukturgens für Endonuklease I (*endA*) von *Escherichia
coli*“ in der Arbeitsgruppe Genetik unter der Leitung von
Prof. Dr. W. Wackernagel.
01.04. - 30.06.1992: Wissenschaftliche Hilfskraft zur Betreuung des
Praktikums in Genetik an der Carl v. Ossietzky
Universität Oldenburg
07.1992 Biologie-Diplom
08.1992 - 07.1998 Promotionsstudium und Anfertigung der vorliegenden
Dissertation an der Carl v. Ossietzky-Universität
Oldenburg in der Arbeitsgruppe Genetik unter der
Leitung von Prof. Dr. W. Wackernagel
01.08.1992 - 31.07.1997: Wissenschaftlicher Angestellter an der Carl v. Ossietzky
Universität Oldenburg zur Mitarbeit in der Arbeitsgruppe
Genetik von Prof. Dr. W. Wackernagel in Forschung
(Schwerpunkte „Horizontaler Gentransfer“ und
„Molekulare Genetik der Prokaryoten“) und Lehre
(Praktika/Seminare in Genetik).

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt
und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.