

Charakterisierung von Bakteriophagen aus *Burkholderia* spp. und *Yersinia* spp. und der Phagen-kodierten Lysine

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sven Volkmar

aus Berlin

Juni, 2009

Diese Arbeit wurde am Robert Koch-Institut Berlin in der Abteilung Zentrum für Biologische Sicherheit (ZBS 2), dem Fachgebiet für hochpathogene mikrobielle Erreger, im Zeitraum Oktober 2005 bis Mai 2009 angefertigt.

Die Betreuung am Robert Koch-Institut erfolgte durch Frau Dr. Daniela Jacob und Herrn Priv. Doz. Dr. Roland Grunow.

Gutachter:

1. Herr PD Dr. Roland Grunow

Robert Koch-Institut Berlin
Zentrum für Biologische Sicherheit (ZBS2): Hochpathogene mikrobielle Erreger
Nordufer 20, 13353 Berlin

2. Herr Prof. Dr. Rupert Mutzel

Freie Universität Berlin
Institut für Biologie – Mikrobiologie
Königin-Luise-Str. 12-16, 14195 Berlin

Disputation am: 17. Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis -----	I
Abkürzungsverzeichnis -----	IV
Zusammenfassung -----	VI
Summary -----	VIII
1. Einleitung -----	1
1.1 Die Gattung <i>Burkholderia</i> -----	1
1.1.1 <i>B. pseudomallei</i> , der Verursacher der Melioidose-----	1
1.1.2 <i>B. thailandensis</i> , ein apathogener, eng verwandter Erreger von <i>B. pseudomallei</i> -----	2
1.1.3 <i>B. mallei</i> , der Verursacher des Rotzes-----	3
1.1.4 <i>B. mallei</i> und <i>B. pseudomallei</i> als bioterroristische Agenzien und das Problem der Diagnostik-----	4
1.2 Die Gattung <i>Yersinia</i> -----	6
1.2.1 <i>Y. pestis</i> , der Erreger der Pest-----	7
1.2.2 <i>Y. pestis</i> als bioterroristisches Agens-----	7
1.3 Bakteriophagen -----	8
1.3.1 Allgemeine Einführung in die Geschichte der Bakteriophagenbiologie-----	12
1.3.2 <i>Burkholderia</i> -Phagen-----	13
1.3.3 <i>Yersinia</i> -Phage PY100-----	16
1.3.4 Phagen zur Diagnostik und Typisierung von Bakterien-----	16
1.3.5 Lysissysteme von Bakteriophagen-----	18
1.3.6 Bakteriophagenlysine als antibakterielle Agenzien-----	21
1.3.6.1 Bakteriophagenlysine in der Lebensmittel- und Agrarwirtschaft-----	23
1.3.6.2 Bakteriophagenlysine zur therapeutischen Anwendung-----	23
1.4 Zielsetzung der Arbeit -----	24
2. Material und Methoden -----	26
2.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen, Plasmide und Primer -----	26
2.2 Enzyme und Kits -----	30
2.3 Größenstandards -----	30
2.4 Chemikalien -----	30
2.5 Allgemeine Mikrobiologische Techniken -----	31
2.5.1 Nährmedien und Wachstumsbedingungen-----	31
2.5.2 Stammhaltung-----	32
2.5.3 Herstellung von Protoplasten Gram-negativer Bakterien-----	32
2.5.4 Elektronenmikroskopie-----	33
2.6 DNA Techniken -----	33
2.6.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien-----	33
2.6.2 Isolierung von DNA aus Bakteriophagen-----	33
2.6.3 Isolierung von Plasmid DNA-----	33
2.6.4 Ethanolpräzipitation von DNA-----	34
2.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-----	34
2.6.6 Kolonie-PCR-----	35
2.6.7 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)-----	35
2.6.8 PCR zur DNA-Sondenherstellung für den Southern Blot-----	36
2.6.9 DNA-Sequenzierung-----	36
2.6.10 Enzymverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen-----	37
2.6.11 Ligation von DNA-----	38

2.6.12	Ligation mit der TOPO-Cloning-Strategie	38
2.6.13	DNA-Transformation durch Hitzeschock	40
2.6.14	DNA-Transformation durch Elektroporation	40
2.6.14.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	40
2.6.14.2	Transformation	41
2.6.15	Agarosegelelektrophorese	41
2.6.16	Färbung und Dokumentation von Agarose-Gelen	42
2.6.17	Größenbestimmung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	42
2.6.18	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
2.6.19	Genexpression mit dem „pET Directional TOPO® Expression“-Kit	43
2.6.20	Southern Blot	43
2.7	Protein-Biochemische Techniken	45
2.7.1	Proteinaufreinigung mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie	45
2.7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
2.7.3	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.7.4	Färbung und Dokumentation von SDS-Polyacrylamidgelen	48
2.7.5	Western Blot	48
2.7.6	Immunfärbung und Detektion mittels Chemilumineszenz	49
2.7.7	Aktivitätsbestimmungen durch Mikrotiterplattentests	50
2.8	Phagen-Techniken	50
2.8.1	Mitomycin C-Induktion und Aufreinigung von Phagen	50
2.8.2	Konzentrierung von Phagen durch Ultrazentrifugation	51
2.8.3	Phagentiterbestimmung	51
2.8.4	Phagenvermehrung	51
2.8.5	Einzelplaque-Isolierung	52
2.8.6	Bestimmung der Wirtsspektren isolierter Phagen mittels Spotttest	53
2.8.7	Lysogenisierung	53
2.8.8	Sterilkontrollen der Phagenlysate	53
2.9	Bioinformatik	54
2.9.1	Auswertung der DNA-Sequenzen	54
2.9.2	Software und Internet-Datenbanken	54
3.	Ergebnisse	56
3.1	Charakterisierung der <i>Burkholderia</i> Isolate durch Multilokus Sequenztypisierung (MLST)	56
3.2	Mitomycin C-Induktion der <i>Burkholderia</i>-Kulturen	57
3.3	Isolierung und Vermehrung von <i>B. thailandensis</i> und <i>B. pseudomallei</i> Phagen	61
3.4	Wirtsspektren der Phagen	61
3.5	Analyse der Plaquemorphologie	64
3.6	Analyse der Phagenmorphologie durch elektronenmikroskopische Aufnahmen	65
3.7	DNA Analysen	67
3.7.1	DNA Restriktionen	67
3.7.2	DNA Hybridisierungen	70
3.8	DNA-Sequenzierung des Phagen phiE067	71
3.8.1	DNA-Endstrukturen von phiE067	71
3.8.2	Eigenschaften und Organisation des phiE067 Genoms	75
3.8.3	Bioinformatische Analyse der phiE067 Genprodukte	78
3.8.3.1	ORF5	80
3.8.3.2	ORF7	80
3.8.3.3	ORF9, ORF10	81
3.8.3.4	ORF15	81
3.8.3.5	ORF16	81

3.8.3.6	ORF19	81
3.8.3.7	ORF20	82
3.8.3.8	ORF 22	83
3.8.3.9	ORF23	83
3.8.3.10	ORF24	84
3.8.3.11	ORF26	84
3.8.3.12	ORF28	84
3.8.3.13	ORF32	84
3.8.3.14	ORF42	84
3.8.3.15	ORF45	85
3.8.3.16	ORF46	85
3.8.3.17	ORF48	85
3.8.3.18	ORF52	85
3.8.3.19	ORF53	86
3.8.3.20	ORF66	86
3.8.3.21	ORF25-27, 29-31, 33-41, 43 und 44	86
3.9	Identifizierung und funktionelle Charakterisierung putativer Bakteriophagen-Endolysine	87
3.9.1	Charakterisierung des phiE067 Endolysins PlyE067	87
3.9.1.1	Identifizierung des Phagenlysins PlyE067	87
3.9.1.2	Synthese des rekombinanten PlyE067 in <i>E. coli</i> BL21	88
3.9.1.3	Lysis-Eigenschaften von PlyE067 / Bakterielle Sensitivität	89
3.9.1.4	pH-Wert- und Konzentrationsabhängigkeit der enzymatischen Aktivität von PlyE067	90
3.9.1.5	Hitzestabilität von PlyE067	92
3.9.2	Charakterisierung des PY100 Endolysins Ply100	93
3.9.2.1	Identifizierung des Phagenlysins Ply100	93
3.9.2.2	Synthese des rekombinanten Ply100 in <i>E. coli</i> BL21	94
3.9.2.3	Lysis-Eigenschaften von Ply100 / Bakterielle Sensitivität	95
3.9.2.4	pH-Wert- und Konzentrationsabhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Ply100	96
3.9.2.5	Hitzestabilität von Ply100	98
4.	Diskussion	100
4.1	Isolierung und Charakterisierung der <i>Burkholderia</i> -Phagen	100
4.2	Eigenschaften und Organisation des phiE067 Genoms	103
4.3	phiE067 und phiBp10 als diagnostische Werkzeuge	107
4.4	Wirkung der Phagen- Endolysine PlyE067 und Ply100 auf Gram-negative Bakterien und ihre Anwendungsmöglichkeiten	108
5.	Literaturliste	112
6.	Anhang	125
6.1	Vektorkarten	125
6.2	Wirtsspektren der Phagen (detaillierte Tabellen)	126
6.3	Bioinformatische Analyse der phiE067 Genprodukte (alle ORFs)	128
6.4	DNA- und Aminosäuresequenzen der identifizierten Endolysine	131
6.4.1	DNA-Sequenz <i>plyE067</i>	131
6.4.2	Aminosäuresequenz PlyE067	131
6.4.3	Allignment Aminosäuresequenz	131
6.4.4	DNA-Sequenz <i>ply100</i>	132
6.4.5	Aminosäuresequenz Ply100	132
6.4.6	Allignment Aminosäuresequenz	132
7.	Danksagung	133

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
A	Adenin
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser (<i>Aqua bidestillata</i>)
<i>B.</i>	<i>Burkholderia</i>
Bl	Blut
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CsCl	Cäsiumchlorid
d	Tage
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et altera</i>
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gp	Genprodukt
h	Stunde
HPA	“Health Protection Agency”
i. d. R.	in der Regel
KBE	Kolonien bildende Einheiten
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
log-Phase	logarithmische Phase
M	Adenin oder Cytosin
m	milli
mb	Megabasenpaare
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
n	nano
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

nm	Nanometer
o.a.	oben angegeben
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte physiologische Salzlösung ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
R	Guanin oder Adenin
RBS	Ribosomen-Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
s.u.	siehe unten
<i>sp.</i>	<i>Species</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
T _{Annealing}	Anlagerungstemperatur der Primer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Temp.	Temperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
URL	Uniform Resource Locator (Internetadresse)
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt
x	mal
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
<i>Y. ps</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i> DSM 8992
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Burkholderia pseudomallei und *Burkholderia mallei* sind die Erreger der Melioidose bzw. Rotz, *Yersinia pestis* verursacht die Pest. Die drei bioterroristisch relevanten Bakterien zählen zu den potentiellen biologischen Kampfstoffen. Die teils problematische Differenzierung von Bakterien der gleichen Gattung und das zunehmende Auftreten multiresistenter Bakterienstämme, welche die Behandlung mit herkömmlichen Antibiotika erschwert, erfordert daher einerseits Möglichkeiten zur spezifischen Diagnostik solcher Erreger und andererseits neue Therapiemethoden.

Bakteriophagen sind hochspezifische Viren, die suszeptible Wirtsbakterien mittels zellwandabbauender Enzyme, sogenannter Bakteriophagen-Endolysine, lysieren. Somit können Phagen bzw. Phagenlysine sowohl für die spezifische Diagnostik als auch zur Therapie eingesetzt werden. Die spezifische Detektion von *B. mallei* ist mit temperenten *Burkholderia*-Phagen bereits möglich. Daher sollten Phagen aus der Gattung *Burkholderia* isoliert und charakterisiert werden, die eine spezifische Diagnostik von *B. pseudomallei* ermöglichen. Da bisher keine Lysine bekannt sind, die Gram-negative Bakterien bei exogener Anwendung lysieren können, war es zusätzlich von großem Interesse, das Phagenlysin eines neuen *Burkholderia*-Phagen und des lytischen *Yersinia*-Phagen PY100 zu identifizieren und deren Potential zur Abtötung dieser Erreger zu untersuchen.

Vier verschiedene temperente Phagen konnten aus *Burkholderia*-Stämmen isoliert werden, die anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen in die Familie der *Myoviridae* in die Ordnung der *Caudovirales* eingruppiert werden können. Zwei Phagen, der Phage phiE067 aus *Burkholderia thailandensis* und der Phage phiBp10 aus *B. pseudomallei*, können aufgrund ihrer Wirtsspektren in Kombination miteinander für die Diagnostik zur Differenzierung der *Burkholderia* Spezies *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* und *B. mallei* eingesetzt werden. Durch Hybridierungsversuche wurden die phylogenetischen Verwandtschaften der Phagen miteinander und im Vergleich zum publizierten Phagen phi1026b bestimmt.

Das Genom des Phagen phiE067 wurde sequenziert, um eine molekulargenetische Charakterisierung des Phagens vorzunehmen. Das doppelsträngige DNA-Molekül hat eine Größe von 43,649 kb. Die 69 identifizierten potentiellen offenen Leserahmen (ORFs) sind in vier verschiedenen Operons angeordnet, was einer lambdoiden Genomorganisation entspricht. Bei 19 ORFs war durch eine bioinformatische Analyse oder den direkten experimentellen Nachweis eine Funktionszuordnung möglich. Diese beinhalten Proteine der DNA-

Verpackung, strukturelle Komponenten, das duale Lysis-System und Proteine, die an Replikation, Rekombination und Modifikation der Phagen DNA beteiligt sind. Die meisten Homologien auf Aminosäuresequenzebene konnten im Bereich der Strukturproteine zu Phagen des *Burkholderia cepacia* Komplexes festgestellt werden, die ebenfalls zur Familie der *Myoviridae* gehören.

In den Genomen des *Burkholderia*-Phagen phiE067 und *Yersinia*-Phagen PY100 konnten die Gene, welche für die Phagenlysine PlyE067 und Ply100 kodieren, identifiziert und in *E. coli* kloniert werden. Durch eine terminale Fusion der Proteine mit einem Hexa-Histidin-Tag, konnte die Aufreinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie vorgenommen werden. Nach bioinformatischen Analysen wurde bei PlyE067 eine N-Acetyl- β -D-Muramidase Domäne und bei Ply100 eine D-Alanyl-D-Alanin Carboxylpeptidase Domäne identifiziert. Die lytische Aktivität von PlyE067 als auch Ply100 konnte mit Hilfe von Sphäroblasten Gram-negativer Bakterien experimentell nachgewiesen werden. Unbehandelte Gram-negative Erreger wurden durch beide Enzyme nicht lysiert, da die äußere Membran eine nicht zu überwindende Barriere für die Endolysine darstellt. Somit wurde bestätigt, dass Phagenlysine ohne zusätzliche Agenzien zur Eliminierung Gram-negativer Erreger nicht geeignet sind. Es wurden für beide Lysine die optimalen enzymatischen Bedingungen bestimmt, wobei die extreme Hitzestabilität von Ply100 hervorzuheben ist. Selbst nach einer 120 minütigen Behandlung bei 99°C behielt das Enzym seine hydrolytische Aktivität. Diese hohe Hitzestabilität könnte potentiell sehr nützlich sein bei dem möglichen Einsatz des Lysins zu Dekontaminationszwecken in der Lebensmittelindustrie.

Summary

Burkholderia pseudomallei and *Burkholderia mallei* are the causative agents of melioidosis and glanders. *Yersinia pestis* causes plague. Therefore, these biological threat agents are considered as potential biological warfare agents. It is often difficult to distinguish between bacterial species of one genus. Furthermore, the increasing number of multiresistant bacterial strains does not respond to conventional antibiotics. Thus, on the one hand, it is essential to develop specific diagnostic assays to discriminate between these microorganisms, on the other hand, new therapeutical techniques are needed.

Bacteriophages are highly specific viruses that lyse susceptible bacterial hosts by means of lytic enzymes (bacteriophage-endolysins) digesting the bacterial cell wall. Therefore, phages or phage lysins can be used for diagnostics as well as for therapeutics. *B. mallei* for instance may be detected by temperate phages phiE125 and phi1026b.

One aim was to isolate and characterise phages from *Burkholderia* to find a useful diagnostic tool for *B. pseudomallei*. Since no lysins are known to be able to hydrolyse cell walls of Gram-negative cells when added externally, it was also of great interest to detect the endolysin of a new *Burkholderia* phage and of the lytic *Yersinia* phage PY100. The Endolysins were examined for their potential to eliminate these pathogens.

Within the framework of this study, four different phages from *Burkholderia* strains were isolated. Examination of the bacteriophages by electron microscopy revealed that they can be classified as members of the family of *Myoviridae* of the order *Caudovirales*. Phage phiE067 deriving from *Burkholderia thailandensis* and phiBp10 deriving from *B. pseudomallei* can be used in combination to differentiate *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* and *B. mallei*. Based on DNA-hybridizations, a phylogenetic relation was determined between the isolated phages and the *B. mallei* specific phage phi1026b.

PhiE067 was chosen for detailed analysis at molecular level with its genome being sequenced. It consists of a double stranded DNA molecule of 43,649 kb. The 69 identified open reading frames (ORFs) are organized in 4 major operons which correspond with lambdoid phages. Functions could be assigned to 19 gene products, based upon bioinformatic analyses or direct experimental evidence. These include DNA packaging proteins, structural components, the dual lysis system and proteins that are involved in replication, recombination and modification of phage DNA. Most amino acid sequence homologies were identified in structural proteins of *Myoviridae* phages of the *Burkholderia cepacia* complex.

The endolysin genes *plyE067* and *ply100* were identified in the genome of the *Burkholderia*-phage phiE067 as well as the *Yersinia* phage PY100 and cloned in *Escherichia coli*. Amino-terminal modification by a hexahistidine tag enabled purification by affinity chromatography. Bioinformatics showed PlyE067 featuring an N-Acetyl- β -D-Muramidase domain and Ply100 featuring a D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase domain. The lytic activity of PlyE067 and Ply100 was demonstrated experimentally by sphaeroplasts of Gram-negative cells. Untreated Gram-negative cells were resistant to the endolysins due to the fact that the outer membrane represents an efficient barrier for prevention of lysis by free endolysin. These results affirmed the current state of research that, without additional agents, lysins do not work with Gram-negative bacteria. For both endolysins optimal enzymatic conditions could be determined while Ply100 turned out to be extremely thermostable. Even after a treatment of 99°C for 120 minutes the enzyme maintained its hydrolytic activity. This characteristic thermostability could be useful for the food conservation technology.

1. Einleitung

1.1 Die Gattung *Burkholderia*

Die Gattung *Burkholderia*, ehemals Teil der Gattung *Pseudomonas*, umfasst zurzeit ca. 40 Spezies. Es handelt sich um Gram-negative, meist bewegliche, obligat aerobe und stäbchenförmige Bakterien, die teilweise pathogen für Menschen, Tiere und Pflanzen sind. Die meisten Spezies der Familie *Burkholderiaceae* sind im Erdboden endemisch. Benannt wurde die Gattung 1992 von Eiko Yabuuchi und Mitarbeitern nach dem Phytopathologen Walter Hagemeyer Burkholder, der Mitte des 20. Jahrhunderts an der Cornell University lehrte und eine Reihe pflanzenpathogener Bakterien beschrieb.

Folgende Arten sind für ihre Human- oder Tierpathogenität bekannt:

- *Burkholderia pseudomallei*, der Erreger der Melioidose beim Menschen [39;43;171], Risikogruppe 3
- *Burkholderia mallei*, der Erreger des Rotz der Unpaarhufer; ist auch für den Menschen pathogen [78], Risikogruppe 3
- *Burkholderia cepacia*, ein wichtiger Verursacher einer mit zystischer Fibrose einhergehenden Lungeninfektion beim Menschen, Risikogruppe 2

Die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta/Georgia ordnete *B. mallei* und *B. pseudomallei* wegen ihrer hohen Morbidität, jedoch geringeren Mortalität in die Kategorie B der bioterroristisch relevanten Erreger ein. Hinzu kommt, dass vor allem *B. pseudomallei* eine hohe Antibiotika-Resistenz aufweist. Auf diese beiden Erreger soll daher im Folgenden näher eingegangen werden. Auch *Burkholderia thailandensis* wird zusätzlich etwas detaillierter beschrieben, da dieser Erreger trotz seiner Apathogenität ein naher Verwandter von *B. pseudomallei* ist. Außerdem diente der Erreger in dieser Arbeit ebenfalls der Gewinnung temperenter Phagen.

1.1.1 *B. pseudomallei*, der Verursacher der Melioidose

B. pseudomallei ist der Verursacher der Rotz-ähnlichen Infektionskrankheit Melioidose, auch als Pseudo-Rotz bekannt [39;43;171]. Bei dem Erreger handelt es sich um ein motiles, aerobes nicht sporenbildendes, Gram-negatives Stäbchenbakterium, das im Wasser, feuchten Böden und insbesondere auf Reisfeldern in den Endemiegebieten Südostasien und Nordaustralien weit verbreitet ist. In dem Hauptendemiegebiet in Nordost-Thailand sind bis

zu 50% der Reisfelder mit *B. pseudomallei* kontaminiert [181]. Durch den Reisetourismus werden zwar immer mal wieder Erreger nach Mitteleuropa gebracht, etablieren konnte er sich dort dauerhaft bislang aber nicht, da er bei Temperaturen unter 11°C nicht mehr vermehrungsfähig ist. In Norditalien werden allerdings regelmäßig positive Erregernachweise aus Trinkwasserbrunnen erbracht [118].

Die Infektion von Mensch und Tier durch *B. pseudomallei* erfolgt durch Inokulation des Erregers über Hautverletzungen, über Inhalation oder Verschlucken kontaminierten Materials. In den Endemiegebieten sind zu meist Menschen, die direkten Kontakt zu Wasser oder feuchten Böden hatten, z. B. auf Reisfeldern, betroffen. In den Zeiten des Vietnamkrieges traten bei den amerikanischen Hubschrauberbesatzungen gehäuft Fälle von pulmonaler Melioidose auf, die sehr wahrscheinlich durch die Inhalation erregerrhaltiger Aerosole verursacht wurden [77]. Übertragungen von Mensch zu Mensch oder nosokomiale Übertragungen sind selten und spielen epidemiologisch keine wesentliche Rolle [1;111]. *B. pseudomallei* ist ein opportunistischer Erreger, der häufiger chronisch Kranke mit Grunderkrankungen wie Diabetes, Leukämie, Lungen- und Nierenerkrankungen infiziert, dennoch sind auch gesunde Individuen davon betroffen [36].

Symptome und Beschwerden sind vielfältig und reichen von chronisch verlaufenden lokalisierten Formen bis hin zu schweren generalisierten Erkrankungen. Typisch sind Fieber und Abszessbildung, bei akuten Erkrankungen vor allem Lungenabszesse, Lungenentzündung und Pleural-Ergüsse, die lebensbedrohliche Ausmaße annehmen können. Die schwerste Verlaufsform der Melioidose, verbunden mit einer sehr hohen Mortalitätsrate, ist die Sepsis. Bei chronischem Verlauf sind verschiedenste Abszesse z. B. in Milz, Leber, Muskulatur und Haut charakteristisch. Die klinische Bandbreite an Symptomen ist in den endemischen Gebieten gleich, aber während eine Hirnstammzephritis häufiger in Nordaustralien vorkommt, tritt eine eitrige Parotitis eher in Südostasien auf [39;43;171]. Die Gründe der verschiedenen Präsentationsformen der Krankheit basierend auf geographischen Unterschieden sind bislang ungeklärt. Man vermutet aber eine unterschiedliche genetische Ausstattung der Patienten und/oder der *B. pseudomallei*-Stämme in den jeweiligen Regionen als Ursache für diese Differenzen.

1.1.2 *B. thailandensis*, ein apathogener, eng verwandter Erreger von *B. pseudomallei*

B. thailandensis ist ein bewegliches Stäbchen, das natürlicherweise im Boden und in stehenden Gewässern vorkommt. Es ist trotz seiner sowohl genetischen, als auch

physiologisch engen Verwandtschaft mit *B. pseudomallei* nicht pathogen und nur äußerst selten Verursacher von Krankheiten in Mensch und Tier [64;98;144;180]. Das lethale Inokulum von *B. thailandensis* liegt in der Maus etwa 1000 mal höher als das von *B. pseudomallei* [173].

Biochemisch gesehen haben beide Spezies, mit Ausnahme von L-Arabinose, die gleichen Fähigkeiten zur Metabolisierung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen. Die Unterscheidung erfolgt daher gewöhnlich anhand der Fähigkeit von *B. thailandensis*, Arabinose zu assimilieren [144]. Vergleichende Analysen der 16S rRNAs von *B. thailandensis* und *B. pseudomallei* haben gezeigt, dass 15 Nukleotidunterschiede vorhanden sind. *B. thailandensis* wurde erstmalig 1998 als eigene Spezies beschrieben [29].

B. thailandensis wird aufgrund seiner Handhabung unter S1-Laborbedingungen oft als Modellorganismus für *B. pseudomallei* verwendet. Dies betrifft sowohl den Bereich der Immunologie, wegen der Ähnlichkeiten bei der Immunantwort setzt man ihn auch in Maus-Infektionsversuchen ein [173;176], als auch in Bereichen der Bakteriologie zur Testung oder Etablierung von z. B. Nährmedien.

1.1.3 *B. mallei*, der Verursacher des Rotzes

Die Infektionskrankheit Rotz wird verursacht durch den Erreger *B. mallei*, einer aeroben, unbeweglichen Spezies der Gattung *Burkholderia*. Eine Eradikation des Erregers war bisher in den USA und Westeuropa erfolgreich, jedoch ist der Erreger immer noch endemisch in Afrika, Asien, dem nahen Osten und Zentral- und Südamerika. Der Rotz (lateinisch *Malleus*) ist primär eine Krankheit der Unpaarhufer. Pferde sind hoch empfänglich für Infektionen und werden als einziges natürliches Erregerreservoir angesehen, aber auch Menschen und andere Säugetiere wie Maultiere und Esel können sich infizieren [120]. Die Ansteckung erfolgt durch den direkten Kontakt mit infektiösen Körperausscheidungen (insbesondere Nasensekret, Lungenauswurf, Speichel sowie Eiter aus Hautwunden) oder den indirekten Kontakt über die gemeinsame Nutzung von kontaminierten Krippen und Tränken, in der Regel über den Nasen-Rachen-Ring oder die Haut [15;83]. In einzelnen Fällen kommt es zu Laborinfektionen mit *B. mallei*. Die Infektion erfolgt durch Inhalation [79] von erregerhaltigen Aerosolen oder über die Haut [146]. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist höchst selten.

Bei Pferden kann die Erkrankung chronisch oder akut verlaufen. Auch latente Infektionen sind möglich. Abhängig vom Manifestationsort unterscheidet man zwischen Hautrotz (*Malleus farciminosus*), Nasenrotz (*Malleus humidus*) oder Lungenrotz (*Malleus Pneumonie*). Chronischer Rotz verläuft bedingt durch wenig ausgeprägte Symptome anfangs oft

unbemerkt. Die Krankheit kann sich jahrelang hinziehen und verläuft in unregelmäßigen, fieberhaften Schüben. Durch Lungenläsionen kommt es zu Husten und Atembeschwerden. Am Unterbauch, an der Brust und an den Hintergliedmaßen entstehen Abszesse und Geschwüre in der Unterhaut. Die Lymphbahnen sind in diesen Bereichen ebenfalls durch Entzündungen gekennzeichnet [136]. Bei akutem Rotz sind erste Symptome hohes Fieber (40-41°C), eitriger Nasenausfluss und eine Rötung (Hyperämie) der Kopfschleimhäute. Es kommt zu einer Schwellung und teilweisen Abszedierung der Kehlganglymphknoten. Auf der Haut und den Schleimhäuten der Luftwege bilden sich diphteroide Beläge und Geschwüre, die sich rasch ausbreiten. Die Tiere verenden oft auf Grund einer Lungenentzündung und multiplen Organmetastasen [136].

Beim Menschen sind die Erscheinungsformen der Erkrankung ebenfalls abhängig vom Manifestationsort. Man kann zwischen Septikämie, dem Lungenrotz, der akuten lokalen Form und dem chronischen Rotz unterscheiden. Die Zoonose verläuft unbehandelt oft tödlich. Eine antibiotische Therapie gestaltet sich langwierig und wirksame Impfungen existieren nicht [82;119]. Die Septikämie ist zu Beginn gekennzeichnet durch Fieber, Schüttelfrost, Veränderungen der Lymphknoten sowie nekrotisierende Hautläsionen. Milz- und Leberschwellungen und Durchfall weisen auf eine Mitbeteiligung innerer Organe hin. Nach den ersten Symptomen kann innerhalb von 24 - 48 Stunden der Tod durch Multiorganversagen eintreten [178]. Lungenrotz wird oft durch die Inhalation des Erregers ausgelöst. Fieber, schleimig-eitriger Nasenausfluss, Lungenabszesse, Pleural-Ergüsse und Lungenentzündungen sind typische Merkmale der Krankheit. Hautabszesse bilden sich nach einigen Monaten. Die Lungenform führt unbehandelt oft zur Septikämie [178]. Bei der lokalen Form sind Abszesse und Geschwüre in den Schleimhäuten, Lymphgefäßen oder dem Bindegewebe lokal an der Eintrittsstelle charakteristisch. Nach 1 – 4 Wochen können sich Abszesse in der Leber, Milz und Lunge bilden. Solche disseminierten Infektionen sind oft eine Vorstufe zum septikämischen Verlauf [178]. Charakteristisch für die chronische Form sind Abszesse und Geschwüre in einer Vielzahl von Organen wie Haut, Milz, Leber, Magen-Darm-Trakt und Lunge. Der chronische Rotz kann sich bis zu 25 Jahre hinziehen [178].

1.1.4 *B. mallei* und *B. pseudomallei* als bioterroristische Agenzien und das Problem der Diagnostik

B. mallei ist ein Human- und Tierpathogen und der Verursacher der Krankheit Rotz [78], *B. pseudomallei* verursacht die Melioidose beim Menschen [43]. Erfahrungen mit antibiotischer Therapie beim Menschen sind begrenzt und die Erreger sind bereits von Natur aus resistent

gegen viele Wirkstoff-Klassen. Die therapeutische Behandlung der Melioidose ist oft trotz hoher Dosen von systemisch applizierten Antibiotika verzögert. Die Behandlung besteht aus einer mindestens zweiwöchigen intravenösen Initialtherapie, gefolgt von einer oralen Erhaltungstherapie, die mindestens für weitere 20 Wochen durchgeführt werden sollte [171]. Bei etwa 10% der so behandelten Patienten kommt es zu Rückfällen. Nach einer Therapie von nur acht Wochen ist bei einem Drittel der Patienten mit einem Rezidiv zu rechnen. Aus Thailand wird trotz Antibiotika-Behandlung teilweise eine Letalität von bis zu 50% gemeldet [171]. Außerdem sind die facettenreichen Symptome der Rotzkrankung als auch der Melioidose oft ein Grund für Fehldiagnosen und demzufolge einer falschen Behandlung der Patienten, was die Heilungschancen der Krankheiten weiter verschlechtert. Zu den bekanntesten Infektionskrankheiten, die häufig mit dem Rotz verwechselt werden, zählen Tuberkulose und Pyämie [174].

Da eine Übertragung durch Aerosole hervorgerufen werden kann und zudem nur wenige Organismen nötig sind, um eine Infektion auszulösen, werden beide Erreger als potentielle biologische Kampfstoffe angesehen. Wie einleitend schon beschrieben, wurden *B. mallei* und *B. pseudomallei* von der „Centers for Disease Control and Prevention“ in Atlanta/Georgia in die Kategorie B der bioterroristisch relevanten Erreger eingestuft [131]. Die Erreger dürfen nur in Laboren der Sicherheitsstufe 3 gehandhabt werden und bedürfen einer Umgangsgenehmigung. Es existieren berechtigte Annahmen, dass beide Erreger als biologische Waffen missbraucht werden könnten [35;112;119;130]. *B. pseudomallei* wurde als mögliche Biowaffe untersucht und kam nach bisherigem Kenntnisstand nie zum Einsatz. Übertragungen von Mensch zu Mensch sind selten [171], so dass bei einem terroristischen Anschlag davon ausgegangen werden muss, dass keine große Epidemie zu erwarten wäre und sich die Fälle auf die direkt mit Erregern in Kontakt gekommenen Personen beschränken würden. *B. mallei* dagegen wurde während des Ersten Weltkriegs von den Deutschen an der Ostfront eingesetzt und hat durch Rotzfälle bei Pferden und Maultieren russische Truppenbewegungen erschwert [170]. Von den Japanern wurde der gleiche Erreger im Zweiten Weltkrieg in China verwendet, wobei Menschen und Nutztiere absichtlich infiziert wurden [113]. Im Falle eines möglichen zukünftigen bioterroristischen Anschlagsszenarios geht man davon aus, dass eine Infektion auch über Aerosole erfolgen würde. Inwieweit vorhandene Antibiotika bei diesem Infektionsweg einen zeitlich ausreichenden Infektionsschutz aufweisen, ist unklar. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass bioterroristisch eingesetzte Erreger mit Antibiotika-Resistenzgenen ausgestattet sein könnten.

Wegen der hohen Gefahr, die von einem möglichen terroristischen Anschlag mit pathogenen Burkholderien ausgehen würde, muss eine schnelle und eindeutige Differenzierung der Erreger sichergestellt sein. Die Differenzierung von *B. mallei* und *B. pseudomallei* mittels Nukleinsäure- und Antikörper-basierenden Methoden ist allerdings schwierig, da die beiden Spezies eng miteinander verwandt sind [35;127;129;182] und es sich bei *B. mallei* vermutlich um einen Klon von *B. pseudomallei* handelt [65]. Auf Nukleotidebene ist eine bis zu 99%ige Sequenzidentität zwischen den beiden Spezies festgestellt worden [179], wodurch ein auf DNA-basierender Nachweis zur Unterscheidung beider Spezies nur schwer zu realisieren ist [18;162]. Auch die 16S ribosomale DNA beider Organismen ist identisch. Die Festlegung in zwei verschiedene Spezies erfolgte hauptsächlich wegen ihrer epidemiologischen und gesundheitlichen Merkmale [183].

Ein zusätzliches Problem bei der Diagnostik von *B. pseudomallei* stellen die phänotypischen Ähnlichkeiten der nicht pathogenen Spezies *B. thailandensis* dar. Durch die Routinediagnostik kann dieser Erreger kaum von *B. pseudomallei* unterschieden werden. Da hochpathogene Erreger außerhalb der endemischen Gebiete in der klinischen Praxis äußerst selten auftreten, könnte die Identifizierung solcher Erreger gerade auch durch automatisierte Verfahren erfolglos sein [91]. Darum erscheint eine alternative diagnostische Unterscheidung mittels lytischer Phagen als sehr vielversprechend. Die zum Teil hohe Spezifität, die einige Phagen über Millionen von Jahren der Evolution gegenüber ihren Wirten entwickelt haben, ermöglicht es, diese als diagnostische Werkzeuge einzusetzen, um bakterielle Erreger zu erkennen.

1.2 Die Gattung *Yersinia*

Die Benennung der Gattung *Yersinia*, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört, erfolgte nach dem Entdecker des Pesterregers Alexandre Émile Jean Yersin [184]. Es handelt sich um eine Gruppe Gram-negativer Stäbchenbakterien, die sich fakultativ anaerob vermehren. Von den 11 bekannten Spezies [72] zählen *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und einige Serovare von *Yersinia enterocolitica* als enteropathogene Vertreter zu den human- bzw. tierpathogenen Spezies [19]. Von diesen drei Spezies wird nur *Y. pestis* als potentieller biologischer Kampfstoff bewertet. Die CDC teilte den Erreger wegen seiner leichten Verbreitung und seiner hohen Letalität in Kategorie A der bioterroristisch relevanten Erreger ein. In Deutschland ist das Bakterium in Risikogruppe 3 eingeordnet. Auf *Y. pestis* wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2.1 *Y. pestis*, der Erreger der Pest

Y. pestis, der Erreger der Pest [184], der vermutlich als Klon von *Y. pseudotuberculosis* vor 1500 bis 2000 Jahren hervorgegangen ist [2], ist ein unbewegliches Stäbchen ohne Geißel und Sporenbildung. Trotzdem hat das Bakterium die Fähigkeit, auch ohne Sporenbildung monatelang in der Erde, im Kot, Speichel und Eiter als auch eingetrocknet in Parasiten wie dem Rattenfloh oder an Wänden von Wohnhöhlen verschiedener Nagetiere zu überleben.

Die Übertragung der Erreger vom Tier auf den Menschen erfolgt durch parasitierende blutsaugende Flöhe. Insbesondere der Rattenfloh *Xenopsylla cheopsis* spielt dabei eine entscheidende Rolle. Diese Flöhe selbst können in ihrem Inneren *Y. pestis* als Parasit beherbergen und ihren Wirt bei der Nahrungsaufnahme mit dem Parasiten infizieren [33]. Der bevorzugte Wirt dieser Flöhe ist die Ratte, der Mensch stellt aber ebenfalls einen potentiellen Wirt dar. Die Folge des Übertragungsweges vom Floh auf den Menschen ist die Beulenpest des Menschen. Typische Symptome der Beulenpest sind Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen sowie bis zu 10 cm große, blau-schwarz gefärbte, schmerzhafte Beulen an Hals, Achselhöhlen und Leisten. Unbehandelt enden mehr als 50% aller Beulenpest-Fälle tödlich.

Zur Pestsepsis kommt es durch einen Eintritt der Bakterien in die Blutbahn durch das Platzen der Beulen nach innen, aber auch durch Infektion von außen über Wunden. Infolge einer Infektion treten hohes Fieber, Schüttelfrost und Kopfschmerzen auf. Im späteren Verlauf kommt es zu großflächigen Haut- und Organblutungen. Bleibt eine Behandlung der infizierten Individuen aus, liegt die Letalität bei 95%.

Wenn es im Verlaufe einer Pestsepsis zu einer Ausbreitung der Erreger über die Blutbahn auf die Lunge kommt, spricht man von Lungenpest. Diese kann auch durch Inhalation des *Y. pestis*-haltiger Aerosole verursacht werden. Eine aerogene Übertragung von Mensch zu Mensch ist dann durch eine Tröpfcheninfektion möglich. Die Symptome beginnen mit Husten, Atemnot, Blaufärbung der Lippen und schwarz-blutigem Auswurf, der sehr schmerzhaft abgehustet wird. Das sich daraus entwickelnde Lungenödem mit Kreislaufversagen führt mit einer Sterblichkeitsrate von 95% fast immer zum Tod [11;12;30;62].

1.2.2 *Y. pestis* als bioterroristisches Agens

Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird der Pesterreger neben Erregern des Milzbrands, der Tularämie sowie Ebola- und Marburg-Viren zu den zwölf gefährlichsten biologischen Kampfstoffen gezählt. Der Gram-negative Erreger war in der Geschichte der Menschheit im 6., im 14. und im 19. Jahrhundert Ursache von drei Pandemien [2;53;70] und

führte zu vielen Millionen Todesopfern. Die Ausrottung ganzer Städte und Dörfer und der Zusammenbruch von Regierungen und Zivilisationen waren die Folge [189].

Für terroristische Organisationen wäre der Pesterreger eine geeignete biologische Waffe. Die Freisetzung in kriegerischen Auseinandersetzungen über Aerosole wäre mit durchschnittlichem Aufwand zu bewerkstelligen [62]. Die kurze Inkubationszeit von teils wenigen Stunden (Beulenpest) bzw. 1-3 Tagen (Lungenpest), die mögliche Übertragung von Mensch zu Mensch und die fast 100%ige Letalität bei unbehandelten Infizierten, würde in kurzer Zeit eine hohe Anzahl von Todesopfern fordern. Trotz der heutigen guten Behandlung durch Antibiotika kann auch bei diesem Erreger nicht ausgeschlossen werden, dass eine genetisch modifizierte Spezies von *Y. pestis* zum Einsatz kommen könnte, die Antibiotikaresistenzen aufweist. Nach Aussagen der WHO würden in heutiger Zeit, nach einer Freisetzung von 50 kg *Y. pestis* enthaltender Aerosole über einer Stadt mit 5 Millionen Einwohnern, ca. 150.000 Menschen infiziert werden, wovon ca. 36.000 der Krankheit zum Opfer fielen [172].

Im Jahre 1346 wurde der erste Einsatz der Pest als biologische Waffe historisch dokumentiert. Der Tartarenführer Khan Djam Bek ließ damals in der genuesischen Hafenstadt Kaffa Pestleichen über die Mauern werfen und zwang die Belagerten damit zur Flucht vor der Pest nach Italien [81;92]. Die japanische Armee stellte während des zweiten Chinesisch-Japanischen Krieges in Gefangenlagern bei Harbin in der Mandschurei Waffen her, die mit Pest infizierte Flöhe enthielten. Deren Einsatz in den Jahren 1940 bis 1942 in der Republik China verursachte lokale Pestausschübe. Als die Produktionsstätten im Jahre 1945 durch die japanische Armee zerstört wurden, lösten mit Pest infizierte Ratten in den chinesischen Provinzen Heilongjiang und Jilin eine Epidemie mit über 20.000 Todesopfern aus [81;92]. Auch Russische Wissenschaftler beschäftigten sich zur Zeit des Kalten Krieges mit der Verwendung von Pesterregern als biologische Waffe. Laut Aussagen des damals verantwortlichen Wissenschaftlers Dr. Ken Alibek gelang es Ende der 1980er Jahre, den Pesterreger in eine sprühbare Form zu bringen und antibiotikaresistent zu machen [47].

1.3 Bakteriophagen

Bakteriophagen (oder Phagen) sind Viren, die aus einem einzelsträngigen- (ss) oder doppelsträngigen (ds) DNA oder RNA Genom mit einer umgebenden Proteinhülle bestehen. Entsprechend erfolgt die taxonomische Einordnung der Phagen einerseits nach der Zusammensetzung des Nukleinsäuremoleküls, so unterscheidet man zwischen ss- oder ds-DNA Phagen oder RNA Phagen, und andererseits anhand der Morphologie der Proteinhülle

mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen. 1962 wurde von Lwoff, Horne und Tournier erstmalig ein System zur Taxonomie von Phagen basierend auf der Morphologie und dem Nukleinsäuretyp veröffentlicht [3]. Basierend auf Ähnlichkeiten der Protein- und Genanordnung können Phagen ebenfalls miteinander verglichen werden. So spricht man z.B. von lambdoiden Phagen, wenn eine Lambda-ähnliche Genanordnung vorzufinden ist.

Hinsichtlich der Morphologie differenziert man Phagen mit einem Schwanz, solche mit kubischer oder helikaler Symmetrie oder mit pleomorpher Gestalt (siehe Abb. 1-1) [4]. 96% dieser Phagen, deren gemeinsames Merkmal der Phagenschwanz ist, können in die Ordnung der *Caudovirales* eingruppiert werden. Je nach strukturellem Aufbau des Phagenschwanzes wird diese Ordnung in drei Familien unterteilt, die *Siphoviridae* (Siphophagen) (60,8%) mit langem, nicht-kontraktilem Schwanz, die *Podoviridae* (Podophagen) (14,1%) mit kurzem, nicht-kontraktilem Schwanz und die *Myoviridae* (Myophagen) (25,1%) mit langem, kontraktilem Schwanz. Alle diese Phagen besitzen ein ds-DNA Molekül. Kubische, filamentöse oder pleomorphe Phagen machen einen sehr geringen Teil von 3,6% der bisher beschriebenen Phagen aus [4].

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Phagen erfolgt seit 1940 und bisher wurden ca. 5500 Bakteriophagen charakterisiert [6]. In Umweltproben ermittelte Häufigkeitsverhältnisse lassen vermuten, dass die Menge der Bakteriophagen die der Prokaryoten um das Zehnfache übersteigt, was sie zu der abundantesten „Lebensform“ auf der Erde machen würde, sofern Phagen/Viren als Lebensformen angesehen werden [32].

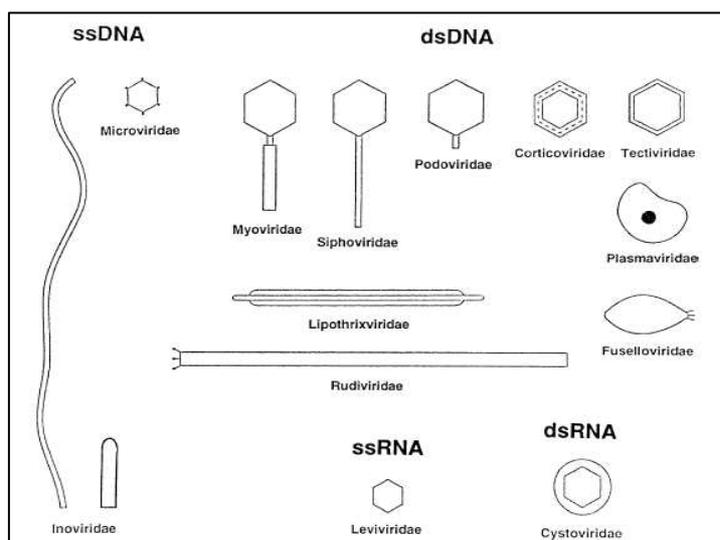


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Haupt-Phagengruppen. Bekannte Vertreter der Gruppen sind z.B. der Phage P2 [GI: 9630327] (*Myoviridae*), der Phage Lambda [GI: 215104] (*Siphoviridae*) der Phage T7 [GI: 9627425] (*Podoviridae*). Quelle: Ackermann, H.-W. et al. [5].

Bakteriophagen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, ausschließlich Bakterien als Wirtszellen zu infizieren. Die Bindung der Phagen an die bakterielle Zelle erfolgt über Rezeptoren, die dieser selbst zur Adhäsion an andere Zellen zur Porenbildung oder anderer Mechanismen dienen. Ein Verlust oder eine Modifikation dieses Rezeptors ist häufig als Ursache für eine entstandene Resistenz gegen Phagen anzusehen. Der Rezeptor kann aus Kohlenhydraten, Proteinen oder Bestandteilen der Lipopolysaccharide (LPS) bestehen. Jede Bakterienart hat ihre eigenen, ubiquitär verbreiteten Phagen [93]. Bei einer Infektion wird die Phagen-DNA in die bakterielle Wirtszelle injiziert, das Kapsid verbleibt außerhalb des Wirts. Anschließend kommt es entweder mit Hilfe des Bakterienstoffwechsels zur Reproduktion des Phagen in der bakteriellen Zelle, bevor die neuen Phagen nach der aktiven Lyse des Wirtes freigesetzt werden (lytischer Zyklus) oder die Nukleinsäure eines Phagen wird ins Wirtsgenom integriert, um als Teil dessen zu replizieren (Lysogenie) (s. Abb. 1-2). Folgen Phagen dem lytischen Zyklus spricht man von lytischen Phagen. Ein in den Wirt integriertes, reprimiertes Phagenom kann dort über mehrere Generationszeiten ruhen, es wird auch als Prophage oder temperenter Phage bezeichnet. Die Zelle, die den Prophagen beherbergt, bezeichnet man als lysogen. Der temperente Zustand eines Phagen kann durch äußere Bedingungen, wie z. B. die Schädigungen der Wirts-DNA, beeinflusst werden. Beispielsweise können UV-Strahlen oder die Zugabe des Zytotoxins Mitomycin C zu bakteriellen Flüssigkulturen, in Folge einer Schädigung der Wirts-DNA, die Auslösung des SOS-Reparatursystems bewirken. Dieses System beinhaltet neben einer gesteigerten Synthese von Reparaturenzymen und einer verzögerten Zellteilung auch die Freisetzung von temperenten Phagen, die dann vom Prophagenstatus in der lysogenen Zelle in den lytischen Vermehrungszyklus wechseln [34]. Wenn der Phage das Wirtsgenom durch eine Mutation nicht mehr verlassen kann, wird von einem kryptischen Phagen gesprochen.

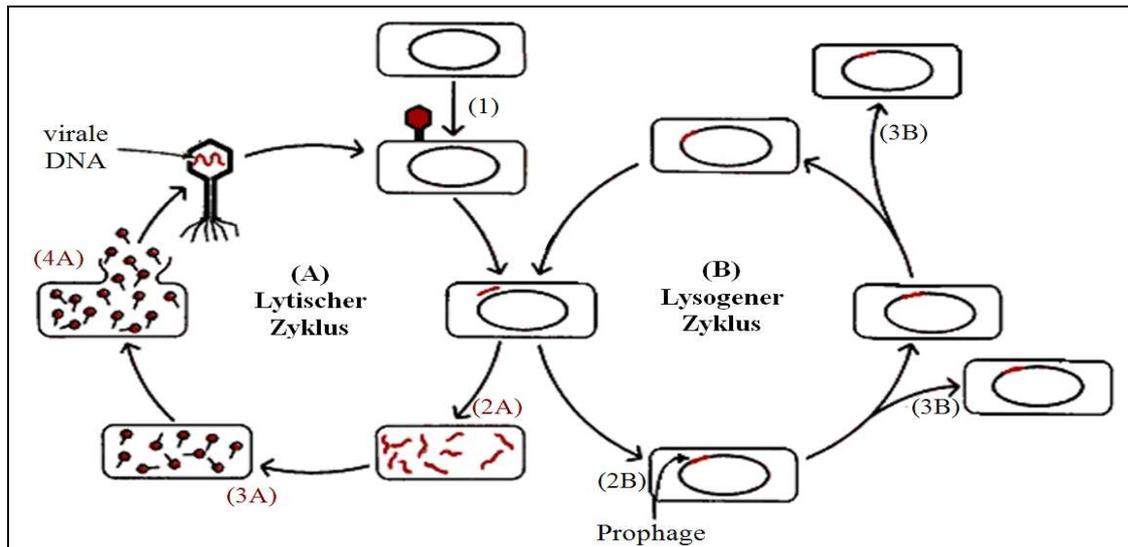


Abb. 1-2: Der lytische (A) und lysogene (B) Vermehrungszyklus von Phagen. 1 = Adaption des Phagen und DNA-Injektion in die Wirtszelle; 2A = Replikation der Phagen-DNA; 3A = Synthese von Phagenpartikeln und deren Assemblierung; 4A = Lyse der Wirtszelle und Freisetzung der Phagen. 2B = Integration der Phagen-DNA ins Wirtsgenom (Prophage); 3B = Replikation der Wirtszelle inklusive des Prophagen.

Eine Besonderheit bei doppelsträngiger Phagen-DNA ist die Ausbildung spezieller Endstrukturen. Begründet ist dies in der Natur der Mechanismen, die zur Verpackung des Phagen-genoms während der Assemblierung von Phagenpartikeln zu kompletten Phagen zur Anwendung kommen. Die meisten zur Ordnung der *Caudovirales* gehörenden Phagen weisen entweder eine terminale Redundanz auf oder haben kohäsive Enden („cos-sites“). Erfolgt die Verpackung des Genoms über den sogenannten *headful*-Mechanismus [141], dann resultiert daraus terminal redundante DNA. Diese Phagen-DNAs weisen an beiden Enden einen identischen Abschnitt auf, der bis zu 6% des gesamten Phagen-genoms einnimmt [128]. Dieser kommt dadurch zustande, dass die Menge an verpackter DNA ausschließlich durch die Kapazität des Viruskapsids begrenzt wird. In der Regel kann ein Kapsid DNA-Mengen aufnehmen, die die Größe eines Genoms in geringem Maße überschreiten, so dass es zu einer terminalen Redundanz von einigen wenigen Prozent kommt. Der bekannteste Vertreter, dessen DNA kohäsive Enden besitzt, ist der *Escherichia coli* Phage λ . Phagen-DNA Gram-negativer Bakterien weisen in den meisten Fällen 5' überhängende Enden auf und ihre Länge variiert zwischen 7 und 21 Basen [56;71].

1.3.1 Allgemeine Einführung in die Geschichte der Bakteriophagenbiologie

Als Bakteriophagen vor fast einem Jahrhundert entdeckt wurden, zeichnete sich schnell ab, dass ihre stark bakteriozide Wirkung der Behandlung von Infektionskrankheiten in Form einer Phagentherapie von Nutzen sein könnte. Sie geht auf eine Idee von Félix d'Herelle zurück, einem Mikrobiologen kanadisch-französischer Abstammung, der 1917 ein unsichtbares, gegen Bakterien wirkendes Agens beschrieb, das er für eine parasitäre Mikrobe hielt [41]. Die Geschichte der Phagentherapie kann in fünf Perioden unterteilt werden: Den frühen Enthusiasmus, die kritische Skepsis, die Stilllegung der Forschung, erneuertes Interesse und die Neubewertung.

Nach 1919 hatte sich die Phagenbehandlung als eine vielversprechende Methode entwickelt und schnell große Aufmerksamkeit gefunden. In über 100 Zeitschriftenartikeln und sechs Monographien hatte sich ihr Begründer, Félix d'Herelle, mit Phagen befasst. Bis zu den 1920er Jahren hatte die Phagentherapie mit über 200 Publikationen [124] eine beachtliche Popularität erreicht. Die ersten erfolgreichen Versuche zur Testung der Brauchbarkeit von Phagen als Therapeutikum beschrieb d'Herelle im Jahre 1926. Diese erfolgten mit Typhus (*Salmonella gallinarum*) und mit *Shigella dysenteriae* infizierten Hasen [42]. Die Arbeit, der hinsichtlich der Phagentherapie wahrscheinlich am meisten Aufmerksamkeit zu Teil kam, war d'Herelles Report zur Behandlung von 4 Fällen der Beulenpest. D'Herelle behandelte die vier Patienten mit Antipest-Phagen-Präparaten durch eine direkte Injektion in die Beulen. Alle vier Patienten erholten sich von ihren Erkrankungen, was damals als bemerkenswertes Ereignis betrachtet wurde und in der bekannten medizinischen Fachzeitschrift „La Presse m'edicale“ veröffentlicht wurde [40]. Die widersprüchlichen Resultate der Forschungen in jener Zeit führten jedoch dazu, dass die zunächst beeindruckenden Ideen rasch wieder an Bedeutung verloren. Noch vor dem radikalen Durchbruch der Antibiotika in den 1940er Jahren war die Phagenforschung zum Stillstand gekommen. Der 2. Weltkrieg und die Industrialisierung von Antibiotika in der westlichen Welt führten zu einer Fokussierung auf die Entwicklung natürlicher Produkte und ihrer semisynthetischen Derivate mit antibakteriellen Effekten. Einzig in wenigen Ländern Osteuropas und gelegentlich noch in Frankreich wurde die Phagentherapie weiterhin praktiziert.

In den 1950er Jahren erlebte die Phagenforschung eine Renaissance, allerdings nicht auf dem Gebiet der Phagentherapie. Phagen wie Lambda und T-Phagen dienten dem damals noch neuen Gebiet der molekularen Genetik als Modellsysteme. Die Identifizierung von DNA, mRNA und viele Fakten, die über die Genregulation bekannt sind, wurden anfangs an diesen Phagen charakterisiert. Die Phagenforschung wurde in dieser Zeit weiterhin praktiziert, aber

mit nur einigen Ausnahmen wurden Phagen primär als wissenschaftliche Werkzeuge betrachtet und weniger in ihren eigenen praktischen Anwendungsmöglichkeiten.

Ende der 1980er Jahre wurde man erneut auf die Phagenbehandlung aufmerksam, als man von Heilerfolgen mit therapeutischen Phagen in Polen und Georgien erfuhr. Zeitgleich damit wuchs das Interesse der ökologischen Nutzung von Phagen in der Landwirtschaft [67], in Aquakulturen [115;122] und in der Abwasserreinigung [177]. Heute, mehr als 60 Jahre später, kommt der Phagenforschung auf Grund gehäuft auftretender Resistenzen von Bakterien gegen einige, und in speziellen Fällen sogar alle klinisch zugelassenen Antibiotika ein erneutes Interesse zu Teil. Diese Rückbesinnung amerikanischer und englischer Forscher stützt sich auf die Hoffnung, Phagen könnten künftig als Ersatz wirkungslos gewordener Antibiotika dienen, da sie die Fähigkeit besitzen, Antibiotika-resistente Bakterien auf andere Art und Weise zu zerstören. Phagencocktails (Mixturen unterschiedlicher Phagen) konnten beispielweise bereits Wirkungsvoll gegen Pathogene in Geflügel [142] und in Rindern [52] eingesetzt werden. In diesem Kontext konnte im August des Jahres 2006 ein Durchbruch gemeldet werden, als die amerikanische „Food and Drug Administration“ (FDA, Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln) einen Phagencocktail, bestehend aus sechs verschiedenen Phagen, genehmigte. Diese dienen der Behandlung von *Listeria monocytogenes*-Verunreinigungen bei verpackten Fertiggerichten und Geflügelprodukten [(<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opabacqa.html>)]. Phagenpräparate sind zur Nutzung in der Landwirtschaft in den USA zwar schon genehmigt, aber dies war das erste Mal, dass die FDA ein solches Präparat auch als Lebensmittelzusatz genehmigte.

1.3.2 *Burkholderia*-Phagen

Phagen sind in der Gattung *Burkholderia* nichts Ungewöhnliches. Viele kryptische Prophagen konnten durch Homologievergleiche mit Hilfe der Datenbank und der Blast-Funktion von NCBI in vielen sequenzierten *Burkholderia*-Genomen detektiert werden [Summer et al., Unpublished]. Aus verschiedenen humanpathogenen *Burkholderia* Spezies wurden temperente Phagen isoliert und charakterisiert. Zu diesen gehören u. a. BcepMu aus *B. cenocepacia* J2315 als auch phiK96243 und phi1026b aus *B. pseudomallei* [49;68;95;141]. Manzenink et al. konnten 1994 zeigen, dass 92% der von ihnen untersuchten *B. pseudomallei* Stämme lysogen waren, was die relativ starke Verbreitung von Phagen in dieser Spezies zeigt [110]. In der gleichen Studie und in weiteren Studien konnten allerdings noch keine Phagen aus *B. mallei* Stämmen isoliert werden und abgesehen von Woods et al. [179], die den Phagen phiE125 charakterisierten, gibt es keine Veröffentlichungen, die Phagen der apathogenen

Spezies *B. thailandensis* im Detail behandeln. Auch im Boden der biologischen Agrarwirtschaft kommen *Burkholderia*-Phagen häufig vor [95;141;152].

Anhand der Morphologien der bisher entdeckten *Burkholderia*-Phagen können diese in die Familien *Siphoviridae* (Siphophagen) und *Myoviridae* (Myophagen) der Ordnung der *Caudovirales* eingeordnet werden.

Basierend auf Ähnlichkeiten der Protein- und Genanordnung zu den klassischen Coliphagen können die *Burkholderia*-Phagen trotz der typischen Mosaik-Genome in drei Kategorien unterteilt werden:

- Lambdoide Phagen
- P2-ähnliche Phagen
- Mu-ähnliche Phagen

Bei den Phagen phiE125 (aus *B. thailandensis*), phi1026b (aus *B. pseudomallei*), Bcep176 und BcepGomr (beide aus *B. cepacia*) handelt es sich um lambdoide Phagen der Familie *Siphoviridae*, die strukturelle Proteinhomologien zu Lambda aufweisen (s. Abb. 1-3) [95;141;152]. Die Phagen phiE125 und phi1026b können *B. mallei* spezifisch erkennen und lysieren und sind daher für diagnostische Zwecke von großem Nutzen. Der Phage phiK96243 aus dem Stamm *B. pseudomallei* K96243 gehört zur Familie der *Myoviridae* mit Strukturprotein-homologien zu dem Phagen P2 [151]. BcepMu ist bezüglich seiner Genanordnung und seinen Proteinhomologien ein Mu-ähnlicher Phage aus *B. cenocepacia* [153] und ebenfalls ein Myophage. Die virulenten Phagen Bcep1, Bcep43, BcepB1A und Bcep781 (alle *Myoviridae*) aus *Burkholderia*-Stämmen des *B. cepacia*-Komplexes [152] haben basierend auf Protein- und Genanordnung keine signifikanten Ähnlichkeiten zu klassischen Coliphagen.

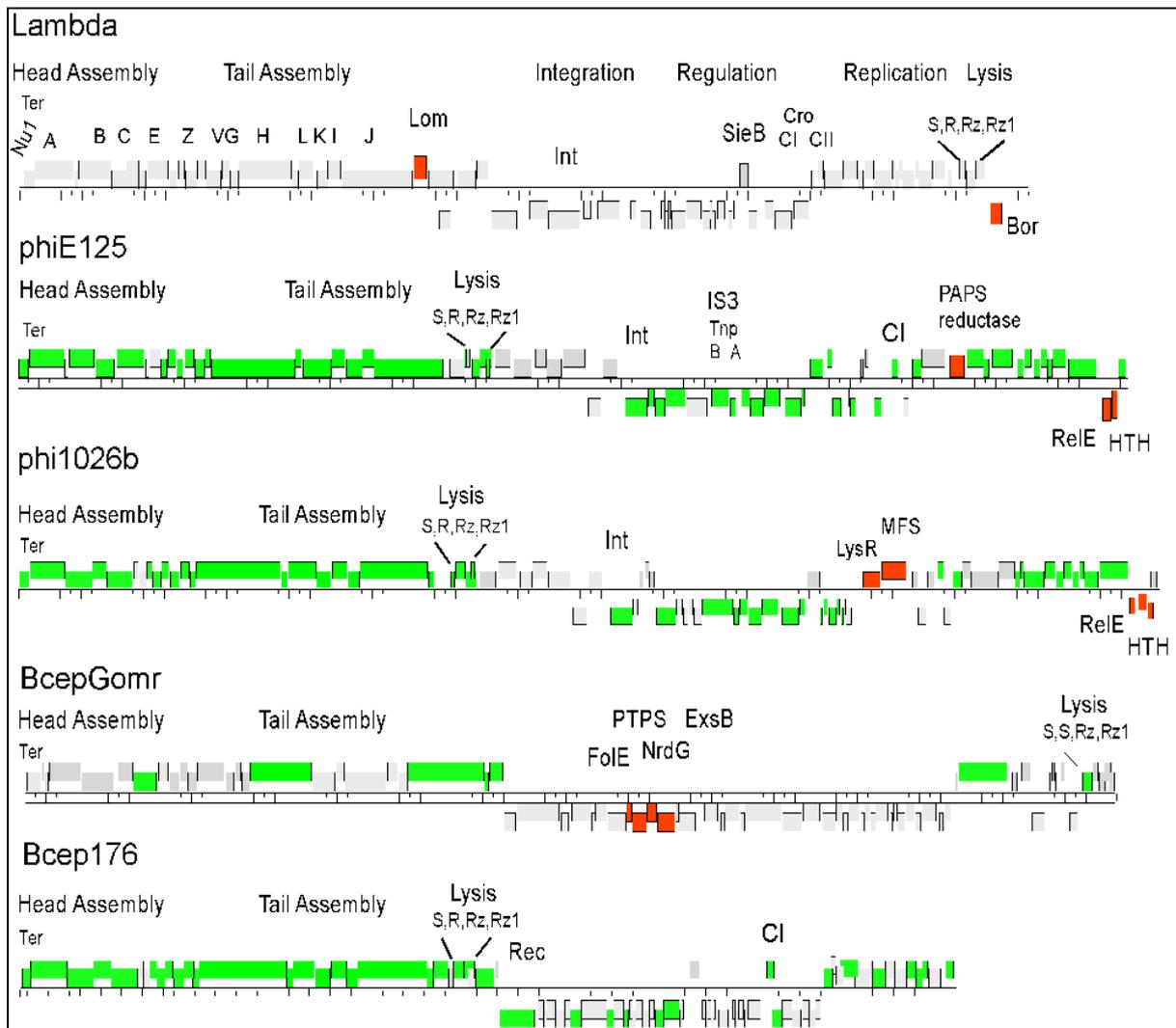


Abb. 1-3: Genetische Karten des Coliphagen Lambda, phiE125, phi1026b, BcepGomr und Bcep176 im Vergleich. Deutlich wird die Konservierung der strukturellen Genanordnung dieser Siphophagen. Grüne/rote Kästchen in den genetischen Karten der *Burkholderia*-Phagen deuten auf Gene kodierend für Proteine mit Homologie zu lambdoiden Phagen. Transkriptionsorientierung auf „+“ und „-“ Strang werden durch die Position der Kästchen oberhalb oder unterhalb der Linie dargestellt. Quelle: Summer et al. 2007 [151].

Die Abb. 1-3 zeigt Homologien der Gene und der Genanordnung der *Burkholderia*-Phagen phiE125 ([GI:17484022], 53,373 kb), phi1026b ([GI:38505382], 54,865 kb), BcepGomr ([GI:145321088], 52,414 kb) und Bcep176 ([GI:76885811], 44,856 kb) im Vergleich zu dem prominenten Coliphagen Lambda ([GI: 215104], 48,502 kb). Auf Sequenzebene ist insbesondere eine große Homologie im Bereich von Genen zu finden, welche in der Phagen Kopf- und Schwanzmorphogenese, der Integration des Phagen in das Genom und in die DNA-Replikation involviert sind. Es sind jeweils drei Hauptoperons zu erkennen. Das erste Operon, welches die höchste Homologie der drei Phagen untereinander aufweist, besteht aus Genen kodierend für Strukturproteine des Phagenkopfes und des Phagenschwanzes und für Proteine des Lysisapparats. Das zweite, welches in entgegengesetzter Richtung transkribiert

wird, beinhaltet die Gene für die Phagenintegration und –regulation. Das dritte Operon enthält primär Gene kodierend für Proteine, die an der DNA-Replikation beteiligt sind.

1.3.3 *Yersinia*-Phage PY100

Im Folgenden soll nicht auf die Gesamtheit der *Yersinia* Phagen eingegangen werden, da dieser Teil der Arbeit sich lediglich mit einem Phagenlysin des *Yersinia*-Phagen PY100 befasst und nicht mit der Isolation und Charakterisierung eines oder verschiedener Phagen dieser Gattung. In erster Linie wird daher eine kurze Einleitung der bereits veröffentlichten Daten von PY100 gegeben [140].

Der Phage PY100 wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Appel des Bundesinstituts für Risikobewertung in Berlin isoliert und charakterisiert. Zur weiteren Erforschung wurde PY100 dem Zentrum für Biologische Sicherheit (ZBS2) am Robert Koch Institut zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung des Phagenlysin des Phagen.

Bei PY100 handelt es sich um einen Phagen der Familie *Myoviridae* mit einem ikosaedrischen Kapsid und einem nicht kontraktilen Schwanz. Das Kapsid enthält eine doppelsträngige DNA mit einer Länge von 50291 bp. PY100 ist ein lytischer Phage mit einem breiten Wirtsspektrum in der Gattung von *Yersinia*. U.a. ist der Phage in der Lage, die drei humanpathogenen Spezies der Gattung *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* im Spotttest zu lysieren [140]. Isoliert wurde PY100 aus der Schweinegülle eines Bauernhofes mit der Absicht, einen Phagen in Therapieversuchen einzusetzen und bezüglich seiner antimikrobiellen Wirksamkeit gegen *Y. enterocolitica* zu untersuchen. In den Versuchen, in denen einer zuvor mit enteropathogenen *Y. enterocolitica* 03 infizierten Maus PY100 oral verabreicht wurde, konnte die Kolonisation des Darms durch *Y. enterocolitica* jedoch nicht verhindert werden [140].

1.3.4 Phagen zur Diagnostik und Typisierung von Bakterien

Die Unterscheidung von manchen nah verwandten Pathogenen einer Gattung ist mittels Nukleinsäure- und Antikörper-basierenden Methoden schwierig. Auf Grund der hohen Spezifität einiger Phagen gegenüber ihren Wirten erscheint die diagnostische Unterscheidung mittels Phagen bei einigen Erregern als sehr aussichtsreich.

Neben bakteriologischen und molekularbiologischen Diagnostikmethoden gehört z. B. die Sensitivität von *Bacillus anthracis* gegenüber dem Gamma-Phagen [GI: 77020137] zu den

wichtigsten Kriterien, die die Identifizierung von *B. anthracis* und seine Abgrenzung gegenüber verwandten Spezies aus der *Bacillus cereus*-Gruppe erlauben, die resistent gegenüber dem Phagen sind [139].

Die beiden Spezies *B. mallei* und *B. pseudomallei* besitzen auf Nukleotid-Ebene eine bis zu 99%ige Sequenzidentität [179], wodurch ein auf DNA-basierender Nachweis zur Unterscheidung beider Spezies nur schwer zu realisieren ist [18;162]. Schon im Jahre 1957 konnten Smith und Cherry acht lysogene *B. pseudomallei*-Stämme beschreiben, die Phagen produzierten, die auf *B. mallei* aktiver als auf *B. pseudomallei* waren [143;162]. Einer der isolierten Phagen, der Phage E, lysierte spezifisch *B. mallei*-Stämme. Drei weitere *B. pseudomallei* Phagen wurden von Manzenink et al. [110] isoliert, die in Kombination eingesetzt werden konnten, um *B. mallei* zu identifizieren. Bedauerlicherweise sind diese Phagen nicht näher charakterisiert worden und der wissenschaftlichen Gemeinschaft auch nicht mehr zugänglich. Zwei temperente Phagen, phiE125 aus *B. thailandensis* [179] und phi1026b aus *B. pseudomallei* [49], die *B. mallei* spezifisch erkennen und lysieren können, wurden inzwischen von Woods et al. (2002) und deShazer (2004) charakterisiert. Somit ist eine Diagnostik dieses Erregers mit Phagen bereits möglich. Die spezifische Erkennung der anderen pathogenen Spezies, *B. pseudomallei*, steht jedoch noch aus.

In der Gattung *Yersinia* wurden Phagen zur Diagnostik eingesetzt und Phagen-Sets konnten zur Typisierung von *Y. enterocolitica*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii* und *Y. intermedia* identifiziert werden [21;87]. Die Unterscheidung von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* ist allerdings komplizierter. Die 16S rRNA der beiden Erreger ist identisch [20], und anhand von DNA-DNA Hybridisierungen [20] und Sequenzstudien [2] konnte gezeigt werden, dass es sich bei *Y. pestis* um einen Klon von *Y. pseudotuberculosis* handelt.

Zur Durchführungen eines diagnostischen Phagenassays werden Lysate eines einzelnen Phagen auf einen unidentifizierten Bakterienrasen getropft (s. Abb. 1-4). Im Falle einer lytischen Wirkung des sich vermehrenden Phagen kommt es nach gewisser Inkubationszeit zur Lyse der umgebenden Zellen und folglich wird ein klares, fast bakterienfreies Areal, ein sogenannter Plaque, sichtbar. Zur Typisierung von Bakterienstämmen können auch unterschiedliche Phagen herangezogen werden, die eine Bestimmung weiter verfeinern. An Bakterien gebundene Phagen können zusätzlich durch spezifische Antikörper detektiert werden, wodurch die Sensitivität der Methode erhöht wird [167].

Weitere Möglichkeiten für den Einsatz von Bakteriophagen zur Detektion pathogener Bakterien ist z. B. die Kopplung von Reporter genen wie der bakteriellen Luziferase *luxAB*

[90] oder dem grün fluoreszierenden Protein GFP [159] an spezifische Phagen, welche diese in den Wirt übertragen und nach Infektion exprimieren. Auch eine Detektion mit Hilfe einer kovalenten Verknüpfung eines fluoreszierenden Farbstoffes an der Phagenhülle und der spezifischen Absorptionsmessung ist möglich [66].

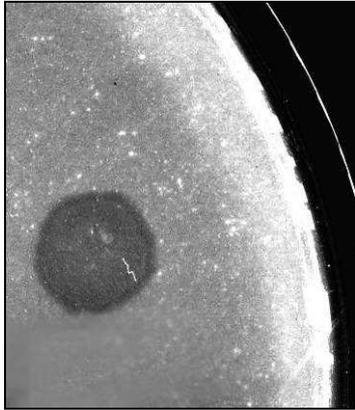


Abb. 1-4: Plauebildung durch Phagen im Spotttest. 10 μ l Phagenlysate des Phagen phiE067 [diese Arbeit] wurden kreisförmig auf einen *B. thailandensis*-Bakterienrasen getropft. Die Lyse der Bakterien durch phiE067-Lysat wird durch einen Plaque, auch Spot oder Lyse-Hemmhof genannt, sichtbar.

1.3.5 Lysissysteme von Bakteriophagen

Generell gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten, die dazu führen, dass Phagen am Ende ihres Lebenszyklus ihren Wirt lysieren und es damit zur Freisetzung von Bakteriophagen kommt. In beiden Fällen ist die Zellwand das Angriffsziel, aber die Degradation dieser geschieht auf unterschiedlichem Weg. Der erste, seltenere Weg erfolgt durch eine Hemmung von essentiellen Peptidoglykan synthetisierenden Enzymen, so wie für die Phagen Q β und phiX174 gezeigt werden konnte [22;23]. Die zweite, unter Phagen weiter verbreitete Reaktion wird durch ein Zellwand-hydrolysierendes System katalysiert, das gewöhnlich aus einem Holin und einem Endolysin besteht [186;187]. Auf letztere Reaktion wird im Folgenden näher eingegangen.

Der zeitliche Ablauf der Lyse, der entscheidend für die virale Reproduktion ist, wird bei geschwänzten Phagen auf nicht ganz geklärten Wege durch ein Enzym, dem Holin, bestimmt [188]. Holine sind Phagen-kodierte, kleine hydrophobe Proteine, die durch ihre Assemblierung zu oligomeren Molekülen die Ausbildung von Poren in der cytoplasmatischen Zellmembran katalysieren. Dadurch wird den Endolysinen ermöglicht, diese zu passieren, um zur Peptidoglykanschicht vorzudringen (s. Abb. 1-5 A) [188]. Das Resultat ist die sofortige Lyse der Wirtszelle. Holine stellen mit mehr als 100 bekannten oder putativen Sequenzen eine sehr facettenreiche funktionelle Gruppe dar, die mehr als 30 orthologe Gruppen bilden [166].

Viele Holine sind in einem dualen Gencluster mit dem Endolysin im Phagengenom organisiert [166]. Alle Holine besitzen normalerweise mindestens eine Transmembrandomäne [187]. Die Anzahl dieser Domänen ist ein Kriterium für die Klassifizierung der Holine in Klasse I- oder Klasse II-Holine.

Das Endolysin, auch als Lysozym oder Lysin bekannt, ist ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung einer Palette Bakteriophagen-kodierter Peptidoglykan-Hydrolasen, die in phageninfizierten Zellen am Ende des Vermehrungszyklus synthetisiert werden. Nachdem in der inneren Zellwand Poren durch Holine gebildet wurden, steuern Endolysine die Zellwand an, wo sie dann die hydrolytische Spaltung einer Bindung im Peptidoglykan katalysieren. Das Ergebnis dieser Aktivität ist der Abbau der starren Mureinschicht und die Freisetzung neu assemblierter Phagen [187] (s. Abb. 1-5 A). Endolysine haben eine mureolytische Wirkung. Begründet durch ihre Substratspezifität können Endolysine in zwei funktionelle Hauptgruppen, basierend auf enzymatischer Aktivität, eingeordnet werden: Glykosidasen (5, 6) hydrolisieren die Bindungen der Monosaccharidreste und Amidasen und Peptidasen (1, 2, 3, 4) greifen die Amid- oder Peptidbindungen der quervernetzenden Interpeptidbrücken an (s. Abb. 1-5 B). Bei den meisten der bisher beschriebenen Endolysine handelt es sich um Amidasen oder Muramidasen.

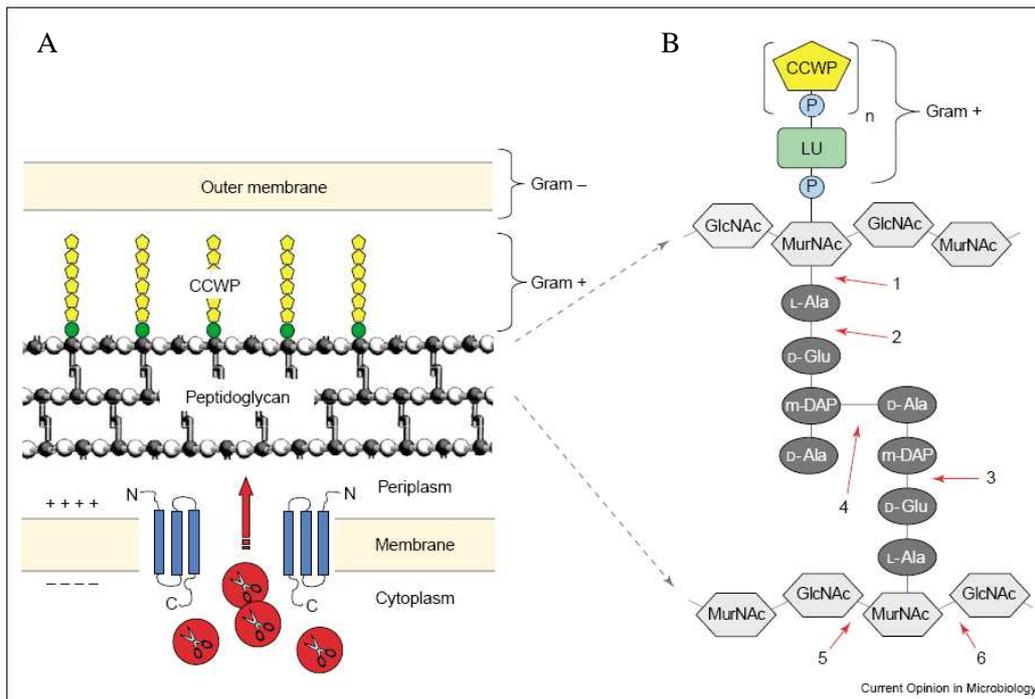


Abb. 1-5: Funktionsweise von Endolysin und Holin am Ende des Phagen-Reproduktionszyklus.

(A): Gezeigt ist eine schematische Darstellung der bakteriellen Zellwand und die Funktionsweise von Holin und Endolysin. Ein Holin (blau) oligomerisiert in der cytoplasmatischen Membran, wodurch es Läsionen schafft, durch die Endolysine (rot) Zugang zum Peptidoglykan bekommen. (B): Detaillierte Darstellung des Peptidoglykans, wie z. B. von *E. coli*, und Bindungen, die potentielle Angriffsziele präsentieren: 1 = N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase, 2 = L-Alanoyl-D-Glutamat Endopeptidase, 3 = D-Glutamyl-m-DAP Endopeptidase, 4 = Interpeptidbrücken-spezifische Endopeptidases, 5 = N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase, 6 = N-Acetyl-β-D-Muramidase.

CCWP = Kohlenhydratpolymer der Zellwand, GlcNAc = N-acetylglucosamin, LU = Verbindungseinheit, m-DAP = Meso-Diaminopimelinsäure, MurNAc = N-acetylmuraminsäure, P = Phosphatgruppe. Quelle: Loessner, et al. [102].

Lysine müssen zwei grundlegende Funktionen ausführen: Zum einen die Substraterkennung und zum anderen die enzymatische Hydrolyse des Substrats. Dies wird durch die Kombination zweier unterschiedlicher Polypeptidmodule mit jeweils einer der beiden Funktionen bewerkstelligt. Die meisten bisher untersuchten Endolysine gehören zu der Kategorie 1 der molekularen Katalysatoren [88], die aus mindestens zwei separaten funktionellen Domänen bestehen (s. Abb. 1-6). Die enzymatische Aktivität ist i. d. R. in der N-terminalen Domäne, die Zellwand bindende Domäne meist am C-terminalen Ende lokalisiert [88]. Sequenzvergleiche von Enzymen derselben funktionellen Gruppen konnten zeigen, dass die katalytische Region hochkonserviert und im Gegensatz dazu die C-terminale Region variabel ist [58;88].

Für Endolysine konnte eine erstaunliche Substratspezifität beschrieben werden, die wahrscheinlich auf der modularen Struktur vieler Phagenlysinen unterschiedlicher Bakterien basiert. Zumindest in einigen Fällen kann das auf die Anwesenheit der zellwandbindenden Domäne zurückgeführt werden [101;104;106]. Die enzymatisch aktive Domäne ist an die

zellwandbindende Domäne geknüpft, welche das Enzym selektiv am entsprechenden Substrat bindet [63;103]. Folglich wird diesen Hydrolasen die Spezifität weitgehend durch die Zellwand bindende Domäne verliehen [103].

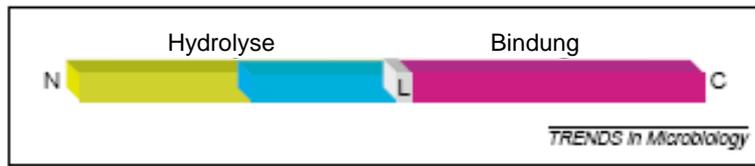


Abb. 1-6: Modularer Aufbau eines Endolysins. Hier dargestellt mit einer katalytischen N-terminalen Domäne, die über einen Linker (L) mit der C-terminalen Substrat-Binde Domäne verknüpft ist. Quelle: Fischetti, et al. [58].

Die meisten Lysine weisen keine Signalpeptidsequenz auf und sind beim Erreichen der Peptidoglykanschicht komplett abhängig vom Holin. Allerdings konnten Studien die Anwesenheit von Signalpeptidsequenzen in den Endolysinen des *Oenococcus oeni*-Phagen [135] und des *Lactobacillus plantarum*-Phagen phig1e [85] nachweisen. Das Endolysin dieser Phagen benötigt für den Export zur Membran die Funktion eines Wirtszell-kodierten Proteins.

1.3.6 Bakteriophagenlysine als antibakterielle Agenzien

Durch die Entdeckung des Penicillins in den 1920er Jahren durch Fleming glaubte man lange Zeit, die Gefahr infektiöser Krankheiten eingedämmt zu haben. In den letzten Jahren wandelte sich diese Lage allerdings. Das zunehmende Auftreten multiresistenter Bakterienstämme, einerseits aus natürlichen Reservoiren, andererseits bedingt durch jahrelangen übermäßigen bzw. unsachgemäßen Einsatz von Antibiotika beim Menschen, in der Tierzucht und der Tiermast machte die Behandlung mit Antibiotika zunehmend problematischer. Der nosokomiale Erreger *Pseudomonas aeruginosa* hat inzwischen eine derartig multiple Resistenz aufbauen können, dass der Keim kaum noch zu behandeln ist. Bereits simple Sekundärinfektionen stellen bei diesem Keim ein großes Problem dar [176]. Genauso dramatisch kann die Resistenzlage bei *Enterococcus faecium* gesehen werden. Zahlreiche Stämme weisen eine Resistenz gegenüber Vancomycin auf, das in den letzten 20 Jahren verstärkt in der Geflügel- und Schweinemast eingesetzt wurde [24]. Folglich können aus Geflügel verstärkt resistente Stämme isoliert werden. Durch Problemkeime verursachte Todesfälle steigen wieder an. In den USA allein sterben jährlich schätzungsweise 1400 Menschen an Infektionen mit resistenten Erregern [54]. Diese besorgniserregende Situation erfordert, nach neuen Alternativen zur Bekämpfung bakterieller Infektionen zu suchen. Die

antibakterielle Anwendung von Bakteriophagen und deren Produkte könnten eine Option darstellen. Die Fähigkeit, mittels spezifischer Phagen einen bestimmten Erreger zu eliminieren (sog. Phagentherapie), wurde in einigen osteuropäischen Ländern schon seit langer Zeit praktiziert und wird aktuell auch wieder in westlichen Ländern erprobt. Ein neuer und sehr interessanter Ansatz ist es, die lytischen Enzyme von Bakteriophagen zu isolieren und zur spezifischen Elimination von Erregern zu verwenden. Neben der bereits beschriebenen Lyse von innen (s. 1.3.5), sind Endolysine auch in der Lage, nach exogener Zugabe Gram-positive Wirtszellen zu lysieren [105]. Für Gram-negative Erreger konnte dies bisher nicht nachgewiesen werden.

Die hohe Spezifität vieler Lysine (oft Spezies- oder Stammspezifisch) bietet einzigartige Anwendungsmöglichkeiten zur Kontrolle spezieller, unerwünschter Bakterien, ohne dabei einen Effekt auf andere Organismen zu haben. Diese Spezifität ist abhängig von Peptidoglykan-assoziierten Liganden, bei denen es sich oft um Kohlenhydrate handelt, die als lysinbindende Ziele dienen und bei jeder Spezies eine spezifische Anordnung finden. Die Bindestärke von Lysinen ist zudem sehr hoch und liegt im nanomolaren Bereich [103]. Die Tatsache, dass Lysine Peptidoglykan-assoziierte Kohlenhydrate als Bindeepitope nutzen, könnte auch die evolutive Entwicklung von Resistenzen verhindern, da diese Zellkomponenten oft essentiell für die Lebensfähigkeit von Bakterien sind (z. B. Cholin in *Streptococcus pneumoniae*, Rhamnose in Gruppe A *streptococci* und ein neutrales Polysaccharid in *Bacillus anthracis*). Außerdem sind die Angriffsziele der Lysine, die kovalenten Bindungen der Amide und der Monosaccharidreste, bei allen bakteriellen Zellwänden gleich. Dies macht eine Resistenzbildung durch jegliche strukturelle Veränderung, die zu einer phagenunempfindlichen Population führen könnte, sehr unwahrscheinlich.

Endolysine scheinen zudem synergistisch zu wirken, wenn organismusspezifische Enzyme, die eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen, in Kombination verwendet werden [51;100]. Dies ist z. B. dann nützlich, wenn es darum geht, die Erreger möglichst schnell zu eliminieren. Ein besonderes und wichtiges Merkmal von Lysinen, insbesondere in Bezug auf ihre Nutzung als antibakterielle Agenzien, ist deren strukturelle Vielseitigkeit. Die hydrolytische und die bindende Funktion sind in zwei separaten Lysin-Domänen angeordnet (s. 1.3.5). Beide Domänen können nach einer Trennung aktiv bleiben und mit komplementären Domänen anderer Lysine fusioniert werden. Auf diese Art und Weise kann eine limitierte Anzahl von Lysinen zu einem großen variablen Pool rekombiniert werden.

1.3.6.1 Bakteriophagenlysine in der Lebensmittel- und Agrarwirtschaft

Die offensichtlichste Vorgehensweise zur Anwendung von Endolysinen in der Lebensmittelbranche oder auch in der Viehzucht auf Mastfutter ist die direkte Zugabe von aufgereinigtem Endolysin zu dem jeweiligen Lebensmittel oder dem unverarbeiteten Produkt. Eine elegantere und auch kostengünstigere Alternative wird durch die Produktion und Sekretion spezifischer Endolysine durch fermentierende Bakterien wie z. B. *Lactococcus lactis* erreicht [61]. In diesem Fall darf das Peptidoglykan des Wirts nicht sensitiv für das Endolysin sein, da sich der Endolysin produzierende Stamm ansonsten selbst vernichtet. Im Gegensatz dazu haben andere Applikationen die Selbstzerstörung als Ziel, welches durch Zellen vermittelt wird, die Endolysingene beinhalten, dessen Produkte in der Lage sind, das eigene Murein abzubauen. In der Käseproduktion erhofft man sich, durch eine auf diesem Wege kontrollierte Lyse von *Lactococcus* Starter-Kulturen, einen beschleunigten Reifeprozess erlangen zu können [45;161]. Ein weiteres Beispiel wird bei der Fermentation von Milch angewandt. Hier wird durch die Sekretion eines rekombinanten Lysins von *Lactococcus lactis* Starter-Kulturen, *L. monocytogenes* bekämpft, da dieser Erreger häufig ein Grund für Kontaminationen in Milchprodukten ist [61].

Eine nicht so viel beachtete, aber dennoch interessante Anwendung ist die Generation von transgenen Pflanzen, die selbst Endolysine exprimieren. So z. B. geschehen bei transgenen Kartoffeln, die das Lysozym des T4 Phagen exprimieren und sich so gegen phytopathogene *Erwinia* sp. schützen [46]. Die Bekämpfung des gleichen Erregers erfolgte auch nach Expression rekombinanter Lysine in *E. coli* und einer exogenen Anwendung durch Zugabe auf die Oberfläche von Birnen [89].

1.3.6.2 Bakteriophagenlysine zur therapeutischen Anwendung

Der Ansatz, aufgereinigte Endolysinpräparate als therapeutische Agenzien einzusetzen, birgt einige große Vorteile gegenüber der Behandlung mit Antibiotika. Wie unter Punkt 1.3.6 beschrieben, ist ein Vorteil von Endolysinen deren hohe Spezifität, die sich in der Regel nur gegen die enzymproduzierende Spezies (oder Subspezies) richtet. Beispielsweise konnten Endolysine eines Streptokokken-Phagen identifiziert werden, die nur bestimmte Streptokokken lysieren [101] und Endolysine eines Pneumokokken-Phagen nur Pneumokokken [117]. Folglich wird die normale bakterielle Flora beim Einsatz von Endolysinen im Gegensatz zu den gewöhnlichen Breitband-Antibiotika komplett verschont. Eine solche Applikation konnte im Tiermodell bereits erfolgreich für den pathogenen Erreger *Streptococcus pneumoniae* [117] demonstriert werden. Auch für das Lysin PlyG des *B. anthracis*-spezifischen Gamma-Phagens konnte gezeigt werden, dass dieses spezifisch

B. anthracis abtötet [139]. Die Überlebensrate von infizierten Mäusen war erheblich höher, wenn nach einer Infektion PlyG verabreicht wurde. Mittlerweile wurde auch die Wirksamkeit des Phagenlysins PlyV12 aus dem Enterokokken-Phagen phi1 bestätigt, welches ein breites Wirtsspektrum besitzt. Die Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* sowie verschiedene *Streptococcus*-Stämme werden von PlyV12 effektiv abgetötet und auch gegenüber einigen Stämmen von *Staphylococcus aureus* zeigt es einen lytischen Effekt [185]. Einige weitere Enzyme wurden beschrieben, die zur Behandlung von Schleimhaut- und anderen Infektionen bei Tier und Mensch nützlich sein könnten, so z. B. Ply3626 des *Clostridium perfringens* Phagen f3626 [190].

Endolysine könnten eine Möglichkeit darstellen, hochpathogenen Erregern im Falle eines möglichen bioterroristischen Anschlags therapeutisch entgegenzuwirken. Eine schnelle Resistenzentwicklung gegen Enzyme mit Lysozym-Aktivität ist nicht anzunehmen. Dies konnte auch im Fall des PlyG an *B. anthracis* festgestellt werden [139].

Tatsächlich therapeutisch eingesetzt werden Phagenlysine und Phagen bereits in dem „Southwest Regional Wound Care Centre“ in den USA/Texas (www.woundcarecenter.net). In Kombination mit anderen Methoden werden Lysine und/oder Phagen zur Behandlung oberflächlicher Hautinfektionen beim Menschen, die durch antibiotikaresistente Bakterien verursacht werden, verabreicht.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Hochspezifische Bakteriophagen können suszeptible Wirtsbakterien mittels zellwandabbauender Enzyme, sogenannter Endolysine, lysieren. Diese Phagen bzw. deren Enzyme haben damit das Potential für die spezifische Diagnostik als auch zur Therapie eingesetzt zu werden. Die beiden temperenten Bakteriophagen phiE125 [179] und phi1026b [49] aus *B. thailandensis* E125 bzw. *B. pseudomallei* 1026b können *B. mallei* spezifisch erkennen und lysieren, eine spezifische Detektion von *B. pseudomallei* mittels Phagen ist jedoch nicht möglich. Innerhalb dieser Arbeit sollen daher Bakteriophagen aus der apathogenen Spezies *B. thailandensis* und der pathogenen Spezies *B. pseudomallei* isoliert und insbesondere hinsichtlich ihrer Wirtsbereiche und damit ihrer möglichen Nutzbarkeit für die spezifische Diagnostik untersucht werden. Für die Diagnostik interessante Phagen sollen weitergehend auf molekularer Ebene charakterisiert werden.

Im Rahmen der Doktorarbeit ist vorgesehen, das Phagenlysin eines neuen *Burkholderia*-Phagen und des lytischen Phagen PY100 zu charakterisieren. Der Phage PY100 ist hochvirulent für eine Vielzahl von Yersinien, darunter auch *Y. pestis*. Anhand der DNA-

Sequenzen sollen die Endolysine im jeweiligen Genom identifiziert, kloniert und überexprimiert werden, um *in vitro* deren Wirkung gegen Gram-negative Erreger zu untersuchen. Lysine können erfolgreich zur spezifischen Detektion oder Eliminierung Gram-positiver Bakterien eingesetzt werden, für Gram-negative Erreger konnte diese Wirkungsweise bisher nicht nachgewiesen werden. Diese Arbeit soll Aufschluss darüber geben, ob Phagenlysine zur spezifischen Detektion oder Eliminierung Gram-negativer Erreger eingesetzt werden könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen, Plasmide und Primer

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme und deren Eigenschaften sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tab. 2-1: *Yersinia*-Stämme

Stamm	Genotyp oder relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Y. enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> ATCC 9610 DSM 4780	Typstamm, Serotyp O:8, Biovar 1B, kein Plasmid	Schleifstein und Coleman 1939, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig, Deutschland
<i>Y. enterocolitica</i> 29330		Robert Koch-Institut (RKI), Berlin, Deutschland
<i>Y. enterocolitica</i> 83/88	Serotyp O:5,27	RKI, Berlin, Deutschland
<i>Y. enterocolitica</i> 29881	Serotyp O:5, Biovar 1A, ein Plasmid	FU-Berlin, RKI, Berlin, Deutschland
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 29829	Serovar I	FU-Berlin, RKI, Berlin, Deutschland
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 29827	Serovar I	FU-Berlin, RKI, Berlin, Deutschland
<i>Y. pseudotuberculosis</i> II		RKI, Berlin, Deutschland
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 29833 DSM 8992	Typstamm, Serovar I	Smith und Thal 1965, DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Tab. 2-2: *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp oder relevante Eigenschaften	Referenz
LE392	<i>hsdR</i> 514(<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺) <i>supE</i> 44 <i>supF</i> 58 <i>lacY</i> 1 <i>galK</i> 2 <i>galT</i> 22 <i>metB</i> 1 <i>trpR</i> 55 (phage host; permissive for λ gt11)	Promega, Mannheim, Deutschland
EPI100	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ [<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>] Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>araD</i> 139 Δ [<i>ara, leu</i>]7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	Epicentre Technologies, Madison, WI, USA
HB101	<i>thi-1 hsdS</i> 20 (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>supE</i> 44 <i>recA</i> 13 <i>ara-14 leu B6 pro A2 lac Y1rpsL</i> 20 (<i>strr</i>) <i>xyl-5 mtl-1</i>	RKI, Berlin, Deutschland
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA</i> 1 <i>araD</i> 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BL21 Star TM (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 2-3: *Burkholderia thailandensis*-Stämme

Stamm	Genotyp oder relevante Eigenschaften	Referenz
E049, E058, E067, E131, E143, E153, E163, E184, E202, E207	Apathogene Vertreter; Erreger der Riskogruppe 1	Tyrone Pitt, HPA, London, England

Die untersuchten Isolate stammen aus Erdproben, die 1990/91 in Nordost-Thailand gesammelt wurden.

Tab. 2-4: *Burkholderia pseudomallei*-Stämme

Stamm, (RKI-Kürzel)	Genotyp oder relevante Eigenschaften	Referenz
99/SID/3477 (Bp01) 99/SID/3811 (Bp02) 01/SID/6052 (Bp03) 03/SID/1615 (Bp04) H03458-0128 (Bp05) H03460-0149 (Bp06) H04198-0220 (Bp07) H04374-0683 (Bp08) H05410-0490 (Bp09) Bt021/E021(Bp10) Bt032/E032 (Bp11) Bt044/E044 (Bp12)	Pathogene Vertreter; Erreger der Riskogruppe 3	T. Pitt, HPA, London, England

Die Isolate stammen aus klinischen Proben von Patienten, welche sich im Zeitraum von 1995 bis 2005 in Südostasien im Zeitraum 1995 – 2005 infiziert haben.

Tab. 2-5: *Burkholderia mallei* Stämme

Stamm, (RKI-Kürzel)	Genotyp oder relevante Eigenschaften	Referenz
GB3 (Bm01) GB4 (Bm02) GB5 (Bm03) GB6 (Bm04) GB7 (Bm05) GB8 (Bm06) GB9 (Bm07) GB10 (Bm08) GB11 (Bm09) GB12 (Bm10)	Pathogene Vertreter; Erreger der Riskogruppe 3	D.E. Woods, Univ. of Calgary, Alberta, Canada

Tab. 2-6: Bakteriophagen und Plasmide

Phagen	Genotyp oder relevante Eigenschaften	Referenz
PY100	Isoliert aus Schweinegülle	Schwudke et al., 2008
phiE058	induziert aus <i>B. thailandensis</i> E058	diese Arbeit
phiE067	induziert aus <i>B. thailandensis</i> E067	diese Arbeit
phiE0131	induziert aus <i>B. thailandensis</i> E0131	diese Arbeit
phiE0202	induziert aus <i>B. thailandensis</i> E0202	diese Arbeit
phiBp10	induziert aus <i>B. pseudomallei</i> Bp10	diese Arbeit
phiBp12	induziert aus <i>B. pseudomallei</i> Bp12	diese Arbeit
Plasmid	Genotyp oder relevante Eigenschaften	Referenz
pet200/D-TOPO (s. 6.1 im Anhang)	Expression eines rekombinanten Proteins mit einem N-terminalen 6×His tag	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pet200- <i>PlyE067</i> (pet200::Orf19)	Orf19 von phiE067 kloniert in die Topo cloning Site von pet200/D-TOPO	diese Arbeit
pet200- <i>Ply100</i> (pet200::Orf48)	Orf48 von PY100 kloniert in die Topo cloning Site von pet200/D-TOPO	diese Arbeit
pet200-49 (pet200::Orf49)	Orf49 von PY100 kloniert in die Topo cloning Site von pet200/D-TOPO	diese Arbeit
pet200-50 (pet200::Orf50)	Orf50 von PY100 kloniert in die Topo cloning Site von pet200/D-TOPO	diese Arbeit
pet200-51 (pet200::Orf51)	Orf51 von PY100 kloniert in die Topo cloning Site von pet200/D-TOPO	diese Arbeit
λgt11 (s. 6.1 im Anhang)	Vektor geschnitten mit <i>EcoR</i> I und Dephosphoryliert; hat eine Mutation im S-Gen, welches für das λ-Holin kodiert	Stratagene, Kalifornien, USA
λgt11-49 (λgt11::Orf49)	Orf49 von PY100 kloniert in die <i>EcoR</i> I Site von λgt11	diese Arbeit
λgt11-Test (λgt11::Test-Insert)	pRho/ <i>EcoR</i> I Test-Insert (~2.8 kb)	diese Arbeit

Tab. 2-7: Primer (Metabion)

Bezeichnung	Sequenz	Funktion
phi067-left-End-1	GCTCGGCGTGCTGTTCGT	Analyse phiE067 Phagen-Enden
phi067-right-End-1	GCACCATCTGCGGGCT	Analyse phiE067 Phagen-Enden
phi067-Analyser-A'	CGCGTGACCGACAGATCG	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-A	AACTCGACGACAGCCGGG	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-B	GTAGGCCAGCCAGGCGG	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-C	GGCGGGTTGAGCATCGC	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-D	CGTCGTACTTCTTCAGGATC	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-D'	TGCAGTGACGAATTCGACAT AGCG	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-X	AACACGAGCATCGCCGCG	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-Y	TGAGGTTCTGTTCGCGCG A	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067

Tab.: 2-7 (Fortsetzung): Primer (Metabion)

Bezeichnung	Sequenz	Funktion
phi067-Analyser-T1	CAGCTGGTTGAAGCCGCC	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T2	GGTGTTCGCTGGAGAGCGAT	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T3	TCGAAACCTGCTCGGGCC	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T4	TCCTGATAGCTCGACTCGTC GA	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T5	CGTCTGTTTCCTTGATCGCCTC G	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T6	CTGCCAAGGTCGCACAGC	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T7	GGCGGCTTCAACCAGCTG	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T8	ATCGCTCTCCAGCGACACC	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T9	GGCCCGAGCAGGTTTCGA	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T10	TCGACGAGTCGAGCTATCAG GA	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T11	CGAGGCGATCAAGGAACAG ACG	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Analyser-T12	GCTGTGCGACCTTGGCAG	Analyse putativer „cos-sites“; Phage phiE067
phi067-Lys-F1	CACCATGGCGATGGCGCT	Amplifikation ORF19; Lysozym; Phage phiE067
phi067-Lys-R1	TCATGCGTCGCTCCATGCA	Amplifikation ORF19; Lysozym; Phage phiE067
pet200-340-F1	TGACTGGTGGACAGCAAA	Analyse “multiple cloning site” pET200/D-TOPO
pet200-592-R1	TTGGTTATGCCGGTACTG	Analyse “multiple cloning site” pET200/D-TOPO
PY100-17422F	CACCATGGAAGTTCAACCAA CAATA	Amplifikation ORF48; Lysozym; Phage PY100
PY100-17838R +StopCodon	TTATTTATACACCCCATACG	Amplifikation Orf48; Lysozym; Phage PY100
PY100-17838F	CACCATGAGCATCCGGCAAC TG	Amplifikation ORF 49; Phage PY100
PY100-18176R +StopCodon	TCAATCCGGTTGTTGCAT	Amplifikation ORF 49; Phage PY100
PY100-18145F	CACCGTGCAAATTGCGGAAT GC	Amplifikation ORF 50; Phage PY100
PY100-18336R +StopCodon	TCAACGACTACCGGAACC	Amplifikation ORF 50; Phage PY100
PY100-18311F	CACCGTGATAACGGTTCCGG TA	Amplifikation ORF51; Phage PY100
PY100-18466R +StopCodon	TTATAGCTCCTTACTGCAC	Amplifikation ORF51; Phage PY100

2.2 Enzyme und Kits

Tab. 2-8: Verwendete Enzyme und Kits

Enzym/Kit	Hersteller
Taq DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
DNase	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Ribonuclease A (RNase A); DNase free	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Inc.
Lambda Exonuklease	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Proteinase K	QIAGEN, Hilden Deutschland
Lysozym	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Qiaquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden Deutschland
Qiaquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden Deutschland
DNA-Purification Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
DIG DNA Labeling Kit	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Lambda gt11/ <i>EcoR</i> I/CIAP-Treated Vector Kit	Stratagene, Kalifornien, USA
Packagene® Lambda DNA Packaging System	Promega, Mannheim, Deutschland
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pET Directional TOPO® Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ProBond™ Purification System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Nanoquant	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.3 Größenstandards

Tab. 2-9: Größenstandards

Substanz	Hersteller
DNA-Größenstandards: - λ DNA / Eco130I (StyI) Marker - GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus - GeneRuler™ 100bp DNA ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Protein-Größenstandards: - PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10kDa to 170kDa) - PageRuler™ Protein Ladder (10kDa to 200kDa)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

2.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Für molekularbiologische Arbeiten wurde „Water for molecular biology“ der Firma Fluka Bio Chemika verwendet.

2.5 Allgemeine Mikrobiologische Techniken

2.5.1 Nährmedien und Wachstumsbedingungen

Tab. 2-10: Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
Luria Bertani (LB)-Medium (Sambrook and Russel, 2001)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,0
Luria Bertani (LB)-Agar (Sambrook and Russel, 2001)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,0
Top Agarose	1 g Pepton / 100 ml 0,5 g NaCl 0,6 g Agarose
Columbia-Blutagar	39 g Columbia-Agar 23 g Pepton 1 g Stärke 5 g NaCl 10 g Agar ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,0; autoklavieren, auf 50-55°C abkühlen lassen, 50 ml frisches defibriniertes Schafblut zusetzen
NZCYM-Medium	10 g Casein, enzymatisch verdaut 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 1 g Casaminsäuren 1 g MgSO ₄ ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,0
SOB-Medium	20 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ ad 1 l H ₂ O _{bidest.} ; pH 7,0
SOC-Medium	SOB-Medium 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose pH 7,0
Sodiumchloride-MgSO ₄ -Puffer/SM-Puffer (Phagen-Puffer)	5,8g NaCl 2g MgSO ₄ •7H ₂ O 50 ml Tris-Cl (1 M, pH 7.5) (5 ml Gelatin (2%, w/v)) ad 1 l H ₂ O _{bidest.}

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Medien bei 121°C für 20 min autoklaviert.

Zur Kultivierung der bakteriellen Zellen wurden diese in LB-Medium oder auf LB- bzw. Columbia Blut -Agarplatten bei 37°C (*B. thailandensis*, *B. pseudomallei*, *B. mallei* und *E. coli*) bzw. 28°C (*Yersinia* spp.) inkubiert. Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 200 rpm/min bis zur gewünschten OD₆₀₀ inkubiert. Falls notwendig, erfolgte das Wachstum des entsprechenden Stammes durch Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum in folgender Konzentration:

Tab. 2-11: Antibiotika

Antibiotikum	Enkonzentration
Ampicilin	100 µg/ml
Chloramphenicol	100 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml
Gentamycin	100 µg/ml

Die Antibiotika wurden von der Firma Sigma-Aldrich in Steinheim, Deutschland bezogen.

2.5.2 Stammhaltung

Bakterienzellen in Nährmedien oder auf Agarplatten sind nur begrenzt haltbar. Zum längeren Aufbewahren von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 0,8 ml einer Übernachtskultur mit 0,2 ml sterilem Glycerin gemischt, schockgefroren und bei –80°C gelagert. Glycerinkulturen sind über mehrere Jahre haltbar.

Desweiteren wurden die meisten Stämme (Ausnahme *Yersinia* sp.) mit Hilfe des Cryobank-Systems (Mast Diagnostica) archiviert. Die Bakterienkulturen sind bei diesem System an Keramikkügelchen gebunden und werden bei -20 °C und bei -80 °C gelagert. Die Archivierung erfolgte entsprechend dem Protokoll der Herstellerfirma.

2.5.3 Herstellung von Protoplasten Gram-negativer Bakterien

Die Herstellung der Protoplasten erfolgte wie in „*Nakimbugwe, D. et al; 2006*“ beschrieben. 10 ml einer über-Nacht-Kultur wurden bei 3800 g und RT für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml Chlorofom/Tris-Puffer (obere Phase) resuspendiert und für 45 min bei 25°C geschüttelt und bei 8000g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Zur Entfernung von Chloroform-Resten wurde das Pellet vorsichtig in Tris-HCl (50mM, pH7) gewaschen. Resuspendiert wurde das Pellet dann in Tris-HCl (50mM, pH je nach Versuchsdurchführung) und eine OD₆₀₀ von ca. 1,0 eingestellt. BSA wurde dann in einer Konzentration von 0,5mg/ml zugegeben.

2.5.4 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop nach Negativkontrastierung der Bakteriophagen. Bei der Probenauftragung wurde die Methode „GridOnDrop“ angewandt, da sich Phagen dieser Größe i. d. R. an der Grenzfläche von Tropfen anreichern. Die „Grids“ (=Objektträger) waren mittels Glimmentladung hydrophilisiert.

2.6 DNA Techniken

2.6.1 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Zur Isolierung genomischer DNA bakterieller Erreger wurde das „DNeasy Blood & Tissue Kit“ von Qiagen verwendet. 2 ml einer über-Nacht-Kultur wurden durch Zentrifugation pelletiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspendieren des Pellets in 180 µl Lysis Puffer und einer einstündigen Behandlung mit Proteinase K bei 56°C. Alle weiteren Schritte erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 – 100 µl H₂O eluiert.

2.6.2 Isolierung von DNA aus Bakteriophagen

Die Präparation der DNA erfolgte in Anlehnung an Sambrook et al. [133]. Zur Extraktion der Phagen-DNA wurde ein Volumen (i. d. R. 500µl) von Phagen in SM-Puffer (s. Tab. 2-10) aufgenommen, mit einem Volumen Phenol gemischt, 30 sec gevortext und anschließend 2 min bei 13200 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) versetzt, mehrfach invertiert und wiederum bei 13200 rpm zentrifugiert. Im nächsten Extraktionsschritt wurde der Überstand mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) gemischt und erneut invertiert und zentrifugiert. Die folgende DNA-Präzipitation mit Ethanol wurde, wie unter Punkt 2.6.4 beschrieben, vollzogen.

2.6.3 Isolierung von Plasmid DNA

Die entsprechenden Mengen flüssigen LB-Mediums (4 ml bei einer Mini-Plasmidpräparation, 50 ml bei einer Midi-Plasmidpräparation und 200 ml im Falle einer Maxi-Plasmidpräparation) wurden mit den jeweiligen bakteriellen Erreger-Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach Pelletierung der Bakterien durch Zentrifugation die Aufreinigung der Plasmid-DNA. Das DNA-Präparationskit

„NucleoSpin® Plasmid“ der Firma NucleoSpin diente der Präparation von Plasmiden, die entsprechend den Vorschriften des Herstellers erfolgte. Der Aufschluss von *E. coli*-Zellen erfolgte durch alkalische Lyse und die Reinigung der DNA über Absorptionschromatographie an einer Silicamembran (Mini Kits) bzw. Anionenaustauscherchromatographie (Midi und Maxi Kit) entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.6.4 Ethanolpräzipitation von DNA

Die Fällung von DNA diente ihrer weiteren Reinigung und Aufkonzentrierung für nachfolgende Arbeiten. DNA-Lösungen wurden zur Fällung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen eiskaltem absolutem Ethanol versetzt, vorsichtig durchmischt und für mindestens 2 Std. bei -20°C aufbewahrt. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 13200 rpm und RT ließ sich die DNA als Pellet gewinnen. Der ethanolische Überstand wurde verworfen, die DNA wurde zum Waschen mit 70 %igem Ethanol versetzt und erneut für 30 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des ethanolischen Überstands wurde das DNA-Pellet für ca. 10 min getrocknet, in 40-100 μl H_2O resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine automatisierte Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Dabei gelingt der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR-Reaktion besteht aus einem wiederholten Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension (Reaktionsansatz und Cyclyerbedingungen siehe Tab. 2-12).

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der präparativen Amplifikation von DNA-Abschnitten und der Analyse von DNA-Konstrukten. Für analytische Zwecke wurde eine *Taq* DNA Polymerase verwendet. Eine Kolonie-PCR wurde zur Kontrolle transformierter *E. coli* Stämme eingesetzt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Klone von den entsprechenden Agar-Platten gepickt und in je 23 μl eines 1/10 Mix aus PCR-Puffer und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ 10 min bei 99°C kochend lysiert. Die restlichen Komponenten wurden dann, dem im folgenden beschriebenen 25 μl PCR-Ansatz entsprechend, zugefügt und die PCR nach dem unten beschriebenen Programm durchgeführt.

Für präparative Zwecke wurde eine Polymerase mit 3'-5'-„proof-reading“-Aktivität (*Pfu* DNA Polymerase) eingesetzt.

Tab. 2-12: Allgemeiner Ansatz für PCR-Reaktionen und Mastercycler-Bedingungen

Reaktionsansatz	Temperaturprofil		
2,5 µl 10 × Puffer	94°C	5 min	1 ×
2,5 µl MgCl ₂ (25 mM)	94°C	30 s	25 - 35 ×
2,5 µl dNTP-Mix (2 mM)	50 - 65°C*	30 s	
0,5 µl DNA Polymerase (1 U/µl)	72°C	30 s	
0,5 µl Forward-Primer (10 µM)	72°C	5 min	
0,5 µl Reverse-Primer (10 µM)			
1 µl Template-DNA			
ad 25 µl			

*die Wahl der Annealing-Temp. richtete sich nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer

2.6.6 Kolonie-PCR

Zur Identifikation rekombinanter Klone wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Als Template wurden die nach der Transformation auf Selektivagar angewachsenen Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen gepickt, in den PCR-Ansatz getaucht und vorsichtig an der Gefäßwand abgestreift. Zusätzlich wurde die benutzte Pipettenspitze verwendet, um die Kolonie auf Selektivagar zu überimpfen. Dies ermöglichte den Erhalt der Klone und die spätere Isolation der Plasmide von Klonen, die das Plamid mit einem Genkonstrukt der erwarteten Größe enthielten. Das Temperaturprofil und der PCR-Ansatz entsprachen, abgesehen von der Template-DNA, dem in Tab. 2-12 beschriebenen Ansatz, mit doppelten Volumina der Komponenten, so dass ein Gesamtvolumen von 50 µl vorlag.

2.6.7 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) für *B. mallei*, *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* basiert auf der Analyse von sieben Haushaltsgenen. Hierfür werden bestimmte Bereiche der Gene *ace*, *gltB*, *gmhD*, *lepA*, *lipA*, *narK* und *ndh* (s. Abb. 2-1) mit einer Größe von ca. 550 bp mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Für jeden Bakterienstamm wird für jeden der sieben Loci je nach Basenaustausch ein bestimmter Alleltyp ermittelt. Eine Kombination der sieben Alleltypen definiert einen Sequenztyp des entsprechenden Stammes (s. Abb. 2-1). Mit Hilfe der MLST-Webseite „<http://bpseudomallei.mlst.net>“ wurden die Allel- bzw Sequenztypen analysiert.

Da bei dieser PCR große Mengen genomischer DNA nötig sind, wurden DNA-Konzentrationen von 50-150 ng/µl eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug beim PCR-Ansatz

der MLST 50 µl, so dass entsprechend die doppelten Mengen eingesetzt wurden. Ansonsten entsprachen Reaktionsansatz und Temperaturprofil der Tab. 2-12.

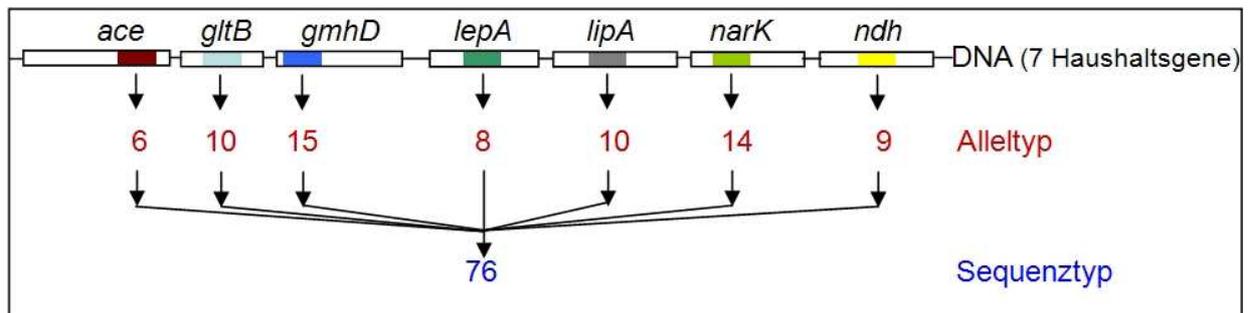


Abb. 2-1: Prinzip der Multilokus-Sequenztypisierung (MLST). Die Sequenzen der sieben Haushaltsgene bestimmen den Alleltyp, die Kombination der Alleltypen definiert den Sequenztyp. *ace* = Acetyl coenzyme A reductase, *gltB* = Glutamate synthase, *gmhD* = ADP glycerol mannoheptose epimerase, *lepA* = GTP-binding elongation factor, *lipA* = Lipoic acid synthetase, *narK* = Nitrite extrusion protein, *ndh* = NADH dehydrogenase.

2.6.8 PCR zur DNA-Sondenherstellung für den Southern Blot

Zur Hybridisierung der im Southern Blot (s. 2.6.20) auf Nylonmembran geblotteten DNA wurden digoxigeninmarkierte (DIG-markierte) DNA-Sonden eingesetzt. Mit dem „DIG DNA Labeling Kit“, das hier zur Anwendung kam, wurden die Sonden nach der Methode des „Random Priming“ [57] erzeugt. Hierbei lagern sich Oligonukleotide mit zufälliger Sequenz an die Template DNA. Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* nutzt diese Primer, um den komplementären Strang mit Hilfe DIG-markierter Nukleotide zu synthetisieren, wodurch dieser markiert ist.

Der Reaktionsansatz zur Herstellung der DIG-markierten DNA-Sonden sah wie folgt aus:

Tab. 2-13: PCR zur Sondenherstellung

Reaktionsansatz	Temperaturprofil	
x µl Template-DNA (500 - 1000 ng)	→ 100°C im Wasserbad	10 min
ad 15 µl H ₂ O _{bidest}		→ Eis

+ 2 µl 10 × Hexanucleotide Mix	→ 37°C	20 Std.
2 µl dNTP Labeling Mix		
1 µl Klenow Enzyme labeling grade		
→ vorsichtig vortexten und zentrifugieren	→ 65°C	10 min
→ Stoppen der Reaktion		

2.6.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde zur Kontrolle von DNA-Amplifikaten und Plasmidkonstrukten erzeugter Klone durchgeführt und erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren [134]. Dabei

wurde durch enzymatische Synthese eine markierte, komplementäre Kopie des zu sequenzierenden Matrizenstranges erstellt. Die Sequenzierungs-PCR wurde mit dem „BigDye Terminator Sequencing Kit 3.1“ im Thermocycler durchgeführt.

Tab. 2-14: Reaktionsansatz und Mastercycler-Bedingungen für DNA-Sequenzierungen.

Reaktionsansatz	Temperaturprofil		
1,5 µl 5 × Puffer	95°C	1,5 min	1 ×
1 µl BigDye 3.1 Premix	95°C	30 s	25 ×
0,5 µl Primer (10 pmol)	50 - 65°C*	05 s	
1-4 µl Template-DNA	60°C	4min	
ad 10 µl steriles H ₂ O _{bidest}	72°C	5 min	

*die Wahl der Annealing-Temp. richtete sich nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurde von den Mitarbeitern im Sequenzierungslabor des Robert Koch-Instituts durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Programmen von Lasergene v8.0 analysiert (s. 2.9.2).

Die Sequenzierung des kompletten Phagen-genoms wurde von der GATC Biotech AG durch die Herstellung einer DNA-„Shotgun-Bank“ übernommen. Hierfür wurden der GATC Biotech AG 10 µg gradientengereinigter Phagen-DNA zur Verfügung gestellt. Eine „Shotgun-Bank“ besteht aus mechanisch generierten DNA-Fragmenten in einer Größenordnung von 1,5 bis 3 kb. Diese Fragmente wurden in Plasmid-Vektoren ligiert und in *E. coli* Wirtsstämme transfiziert. Die präparierten und aufgereinigten Klone wurden für die Shotgun-Sequenzierung mit der Sanger-Technologie verwendet. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde ein 8-faches der anfallenden Stücke sequenziert. Man spricht von 8-facher Deckung (coverage). Zur Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen wurden auch hier die Programme von Lasergene 8 verwendet.

2.6.10 Enzymverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen im DNA-Doppelstrang erkennen und je nach Typ Einzel- (ss) oder Doppelstrang (ds) Restriktionen in der Erkennungssequenz durchführen. Die Restriktion von DNA erfolgte zu analytischen Zwecken in einem Gesamtvolumen von 30 µl, zu präparativen Zwecken in bis 50 µl. Die Enzymlösung nahm maximal 0,1 × Volumen des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die 10fach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro µg DNA wurden 2-

5 U Restriktionsendonuklease zugeben und mindestens 1 Stunde bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. Wenn nötig wurden die Enzyme durch Hitzebehandlung (10 min bei 65°C) inaktiviert. Nach Überprüfung auf vollständige und korrekte Spaltung mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.6.15) konnten die entstandenen Produkte gegebenenfalls aus dem Restriktionsansatz per Ethanol-Fällung aufgereinigt werden.

2.6.11 Ligation von DNA

Die Ligation dient der Verbindung eines dephosphorylierten Vektors mit einem DNA-Fragment mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase. Vektor und DNA-Fragment wurden dazu mit denselben oder kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den benachbarten 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden katalysiert die Ligase. Das Verhältnis von „Insert“-DNA zu Vektor-DNA lag i. d. R. bei 2:1, variierte aber je nach Größe der „Insert“-DNA.

Tab. 2-15: Ligationsansatz

Ligationsansatz		Temperaturprofil	
10-50 ng	Vektor-DNA	16°C	über Nacht oder
2-3× Menge der Vektor-DNA	Insert-DNA	37°C	1-2 Std.
1,5 µl	10 × Ligase-Puffer		
1 U	T4-DNA-Ligase		
ad 10 µl	H ₂ O _{bide} st.		

Der Ligationsansatz wurde gemischt und im Falle kohäsiver Enden über Nacht bei 16°C, im Falle glatter Enden für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Bis zur Weiterbearbeitung wurden die Proben auf Eis gelagert.

2.6.12 Ligation mit der TOPO-Cloning-Strategie

Bei dem „Champion pET Directional TOPO[®] Expression-Kit“ wird die Klonierungsstrategie des „TOPO-Cloning“ genutzt (s. Abb. 2-2), um blunt-end PCR-Produkte gerichtet in einen Expressionsvektor zu klonieren. Es wird keine Ligase benötigt, da die am Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus die Ligation mit den PCR Produkten katalysiert. Verwendet wurde der Vektor pET200/D-TOPO (s. Abb. 6-1 im Anhang). Voraussetzung für die gerichtete TOPO-Klonierung ist eine spezifische Sequenz (5'-CACC) am Zielgen, welche mit Hilfe speziell generierter Primer durch eine PCR angehängt wird. Im Vektor ist eine komplementäre Sequenz (3'-GTGG) als Einzelstrang-Überhang vorhanden, der in das 5'-Ende des PCR-Produkts inseriert und so zur korrekten Orientierung des

inserteren Gens führt (s. Abb. 2-2). Für eine spätere Aufreinigung des zu synthetisierenden Proteins wird das klonierte Gen bei Expression mit einem N-terminalen His-6-Tag fusioniert, der zwischen Startcodon des Gens und Ribosomenbindestelle des Plasmids lokalisiert ist.

Die hohe Spezifität der T7-RNA-Polymerase, die beim pET-Expressionssystem zum Einsatz kam, ermöglichte ausgehend vom T7-Promotor eine regulierte Expression von heterologen Genen in *E. coli* [149;150]. Die DNA wurde in dem *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) exprimiert, der einen defekten, lysogenen λ -Phagen DE3 enthält. Ein Kanamycin-Resistenz-Gen auf dem Plasmid pET200/D-TOPO ermöglichte eine Selektion der Klone.

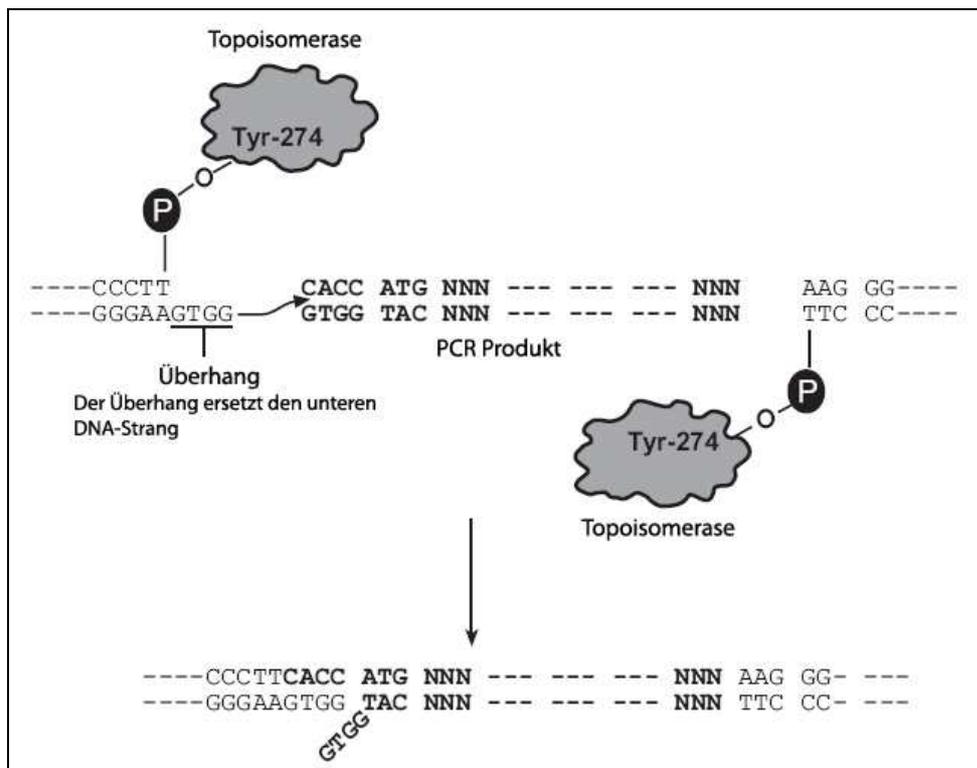


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der gerichteten TOPO-Klonierung. Die am Vektor kovalent gebundene Topoisomerase katalysiert die Ligrationsreaktion, der Überhang (GTGG) am Vektor und die Anfangssequenz CACC am PCR-Produkt sind notwendig für die gerichtete Klonierung.

Die Ligrationsansätze sahen bei Verwendung des „Champion pET Directional TOPO® Expression-Kit“ bei chemisch- bzw. elektrokompenten Zellen wie folgt aus:

Tab. 2-16: Ligrationsansatz bei Verwendung des „TOPO® Expression-Kit“

Reagenzien	chemisch kompetente <i>E. coli</i>	elektrokompente <i>E. coli</i>
PCR Produkt	0,5 – 4 µl	0,5 – 4 µl
Salz Lösung	1 µl	-
Salz Lösung (1 : 4 verdünnt)	-	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 5 µl	ad 5 µl
TOPO® vector	1 µl	1 µl
Gesamtvolumen	6 µl	6 µl

Der jeweilige Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei -20°C über Nacht gelagert oder auf Eis gestellt und direkt für eine DNA-Transformation weiterverwendet.

2.6.13 DNA-Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation durch Hitzeschock wurden die im jeweiligen Kit mitgelieferten kompetenten Zellen verwendet. $50\ \mu\text{l}$ Zellalliquots chemisch kompetenter Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von je $3\ \mu\text{l}$ Ligationsansatz oder 5-10 ng Plasmid-DNA pro Aliquot wurde vorsichtig gemischt und die Ansätze 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 sec im Wasserbad bei 42°C . Der Ansatz wurde anschließend sofort wieder auf Eis gebracht und $250\ \mu\text{l}$ raumtemperiertes SOC-Medium zur Zellregeneration zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator bei 200 rpm bebrütet.

Zur Erzeugung der gewünschten Klone wurden nach der Inkubation $100 - 200\ \mu\text{l}$ der Transformationsansätze auf LB- Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und 24 Std. bei 37°C bebrütet. Die gewachsenen Kolonien konnten am nächsten Tag nach dem Blue-White-Screening selektiert werden.

Sollte der Transformation eine Expression des klonierten Gens folgen, wurden 10 ml LB mit dem entsprechendem Antibiotikum, mit dem gesamten Volumen des Transformationsansatzes versetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 200 rpm weiter bebrütet. Am nächsten Tag konnte die Expression durch IPTG-Induktion durchgeführt werden (s. 2.6.19).

2.6.14 DNA-Transformation durch Elektroporation

2.6.14.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

$200\ \text{ml}$ LB-Medium wurden mit $1\ \text{ml}$ frischer über-Nacht-Kultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C (*E. coli*) bis zu einer OD_{600} von $0,8 - 0,9$ inkubiert. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert (15 min, 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 1 Volumen eiskaltem Aqua-bidest. resuspendiert. Es folgten drei weitere Zentrifugationsschritte, (15 min, 6000 rpm, 4°C) und die jeweilige Resuspendierung des Zellpellets in $35\ \text{ml}$ eiskaltem Aqua-bidest. nach dem ersten, in $20\ \text{ml}$ 10 %iger Glycerollösung nach dem zweiten und in $0,5\ \text{ml}$ 10 %iger Glycerollösung nach dem dritten Zentrifugationsschritt. Die gewonnenen kompetenten Zellen wurden in $50\ \mu\text{l}$ Portionen

aliquotiert und konnten sofort zur Transformation eingesetzt werden oder für einige Monate bei -80°C gelagert werden, nachdem sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

2.6.14.2 Transformation

50 μl Zellaliquots elektrokompenter Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von je 3 μl Ligationsansatz oder 5-10 ng Plasmid-DNA pro Aliquot wurde vorsichtig gemischt und in eine sterile vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt.

Die Elektroporation erfolgte im Gene Pulser TM (BioRad) bei 25 μF , 200 Ω und 2,5 kV, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und eine Zeitkonstante von 3,5 bis 4,5 ms erzeugt wurde. Nach dem Stromimpuls wurde sofort 1 ml SOC-Medium in die Küvette gegeben und der Transformationsansatz in ein 15 ml Falcon Tube überführt und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz wie unter Punkt 2.6.13 bereits beschrieben zur Erzeugung von Klonen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert oder zur Genexpression zu 10 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben.

2.6.15 Agarosegelelektrophorese

verwendete Puffer und Lösungen:

1 \times TBE	89 mM TRIS Base (10,781 g) 89 mM Borsäure (5,501 g) 2 mM EDTA- Na_2 ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, pH 8
4 \times PCR-Ladepuffer	30 % Saccharose in TE-Puffer (pH 8,0) 0,1 % Xylencyanol

DNA-Fragmente, Plasmide und Genome unterschiedlicher Größe wurden in einem horizontalen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1 \times Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE). Die Agarose wurde in 1 \times TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf etwa 60°C mit 3 μl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro 100 ml versetzt. Die Agarose-Konzentration variierte je nach Größe der zu trennenden Fragmente zwischen 0,7 und 1,5% (w/v). Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und auf das entsprechende Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit konstanter Spannung von 60 – 120 V für 30 – 90 min, je nach Größe des Gels und der Laufstrecke der nachzuprüfenden Fragmente, in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (Peqlab Biotechnologie GmbH). Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (s. 2.6.16).

2.6.16 Färbung und Dokumentation von Agarose-Gelen

Agarose, die zur Herstellung von Agarose-Gelen zur Auftrennung von DNA Molekülen verwendet wurde, wurde mit 1 µg Ethidiumbromid versetzt, so dass eine Färbung nach der Elektrophorese nicht notwendig war. Die Sichtbarmachung der DNA-Banden im DNA-Gel erfolgte im UV-Durchlicht (254 nm) mit einem „Molecular Imager ChemiDoc XRS System“ (BioRad), die Auswertung mit der „Quantity One 1-D Analysis“ Software.

2.6.17 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Um eine Größenbestimmung von im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmenten durchzuführen, wurde die Software „Quantity One 1-D Analysis“ und das System „Molecular Imager ChemiDoc XRS“ (BioRad) herangezogen. Hierbei werden DNA-Banden eines DNA-Markers mit definierter Größe mit den erzeugten Banden des Bandenmusters mit Hilfe der Software verglichen und die Größe in Basenpaaren zugeordnet. Nach Berechnung der Größen der einzelnen Banden ergibt sich durch die Summe der Bandengrößen die Gesamtgröße. Diese Methode konnte z. B. zur groben Größenbestimmung eines Phagengenoms verwendet werden.

2.6.18 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der DNA wurden am Spektrophotometer Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies) gemessen. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ist zu der Nukleinsäurekonzentration in der Lösung proportional und kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden. Bei einer Doppelstrang-DNA entspricht eine OD₂₆₀-Einheit einer DNA-Menge von 50 µg/ml. Zur Berechnung der DNA-Konzentration ergibt sich folgende Beziehung: $OD_{260} \times 50 = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$. Eine zusätzliche Messung bei 280 nm lässt eine Aussage über Verunreinigungen mit Proteinen zu. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} sollte bei DNA-Messungen bei etwa 1,8 liegen. Von den unverdünnten DNA-Lösungen wurden für einen Messvorgang 2 µl eingesetzt. Das Spektrophotometer wurde vor jedem Messvorgang mit dem jeweiligen Medium, in dem die DNA bei der Elution aufgenommen wurde, geeicht. Zum Messen der Lösungen wurden dabei stets 2 µl direkt auf den Messfühler des Gerätes pipettiert und die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.6.19 Genexpression mit dem „pET Directional TOPO® Expression“-Kit

LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde mit ca. 1/100 Volumen Übernachtskultur von *E. coli* Zellen BL21(DE3), die das gewünschte Expressionsplasmid (pet200+Insert) trugen, angeimpft und bei 37°C/200 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 wurde die Kultur in zwei separate, gleich große Volumina geteilt. Eine der beiden Kulturen wurde ohne IPTG-Induktion als Negativkontrolle verwendet, bei der anderen wurde die Genexpression mit IPTG (1mM) induziert und für 1-6 Std. bei 37°C/200 rpm vollzogen. Eine Probenentnahme zur Expressionsanalyse erfolgte alle 60 min. Daraufhin wurden die Zellen bei 5000 rpm/5 min abzentrifugiert und die gewonnenen Pellets wie unter Punkt 2.7.1 beschrieben weiter behandelt.

2.6.20 Southern Blot

verwendete Lösungen:

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 1,0 M Tris-HCl, pH 7,4 (21° C)
20 × SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0
Standard-Hybridisierungspuffer (SHP)	5 × SSC 0,1 % Na-Laurolysarkosin 0,02 % SDS 1 % Blocking Reagent
Waschpuffer A	2 × SSC/0,1 % SDS
Waschpuffer B	0,5 × SSC/0,1 % SDS
DIG Puffer 1	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5
DIG Puffer 3	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5

Die Southern Blot Methode besteht aus den Arbeitsschritten Blotting, Hybridisierung und Filter-Entwicklung und wurde 1975 von Edwin Southern [145] entwickelt.

Die Methode wurde durchgeführt, um DNA Moleküle, die zuvor mittels Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe getrennt wurden, auf einer Membran (Hybond N+, Amersham) zu fixieren (Blotting). Man unterscheidet zwischen Kapillarblotting, Vakuumblotting und Elektroblotting. In dieser Arbeit wurde mit dem Kapillarblot gearbeitet. Die treibende Kraft dabei war ein Flüssigkeitsstrom (Blotpuffer), der von einem Reservoir, ausgehend von unten durch das Gel, weiter durch die Membran zu einem Stapel saugfähigen Filterpapiers gesaugt wurde. Durch den erzeugten Strom wurde die DNA aus dem Agarosegel mitgezogen und blieb anschließend in den Maschen der Membran hängen (s. Abb. 2-3). Das Verfahren wurde 12-16 Stunden (über Nacht) vollzogen. In späteren Hybridisierungen mit

DIG-markierten Sonden (s. 2.6.8) konnten dann einzelne DNA-Moleküle nachgewiesen werden.

Da die DNA für die Hybridisierung einzelsträngig vorliegen muss, wurde diese vor dem Transfer der Nukleinsäure auf die Membran denaturiert. Dies geschah durch eine Abfolge verschiedener Puffer-Behandlungen des Gels. Alle Schritte wurden bei RT und unter leichtem Schütteln durchgeführt und zwischen dem Wechseln der Puffer wurde jeweils für 5 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Die Depurinierung (saure Hydrolyse der glykosidischen Bindungen) erfolgte durch eine Inkubation von 10 min in 0,25 M HCl. Die Denaturierung erfolgte für zweimal 15 min mit jeweils frischer Lösung. Zur Neutralisierung wurde zweimal für 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Um das Gel auf die Blotbedingungen einzustellen, wurde es für 10 min in $20 \times \text{SSC}$ geschwenkt.

Der Blot wurde entsprechend der Abb. 2-3 mit den vorbereiteten Materialien aufgebaut.

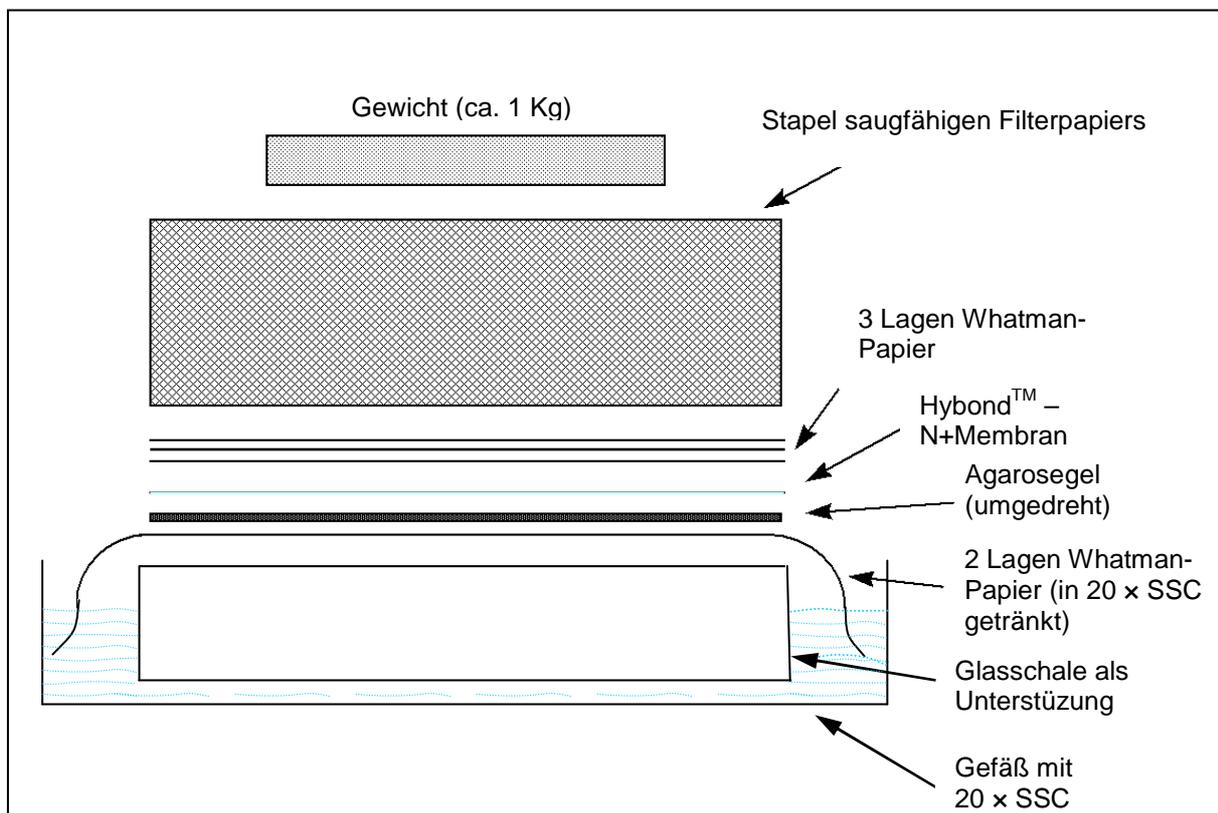


Abb. 2-3: Schematische Darstellung vom Aufbau des Southern Blots.

Danach wurde die Membran getrocknet und die DNA im Transilluminator (Biometra) durch UV-Licht, das sogenannte Crosslinking ($0,12\text{J}/\text{cm}^2$), dauerhaft auf der Membran fixiert.

Zur Vorbereitung der Membran auf die Hybridisierung wurde eine Prähybridisierung durchgeführt. Dieser Schritt sollte eine unspezifische Bindung der Sonde auf der Membran vermeiden. Dazu wurde die Membran und 20 ml SHP-Lösung in das Hybridisierungsröhrchen

gegeben und bei 65°C im Hybridisierungssofen für 4 Std. inkubiert. Bei der anschließenden Hybridisierung wurde die DIG-markierte DNA-Sonde in einer Endkonzentration von 20 ng/ml eingesetzt. Damit die Sonde einzelsträngig vorlag, wurde sie für 5 min bei 95°C erhitzt und dann sofort auf Eis abgekühlt, um eine erneute Basenpaarung der getrennten Fragmente zu verhindern. Die entsprechende Menge markierter Sonde wurde dann in 20 ml SHP gegeben und gegen die Prähybridisierungslösung getauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C im Hybridisierungssofen.

Um den ungebundenen Anteil der Sonde restlos zu entfernen, wurde die Membran zweimal 5 min bei RT mit Waschpuffer A gewaschen, gefolgt von zweimal 30 min mit Waschpuffer B bei 50°C.

Der letzte Schritt der Southern Analyse, die Detektion der hybridisierten DNA Abschnitte, erfolgte durch Zugabe eines gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörpers sowie eines Chemilumineszenz-Substrats (CDP-Star). An den Antikörper war eine alkalische Phosphatase gekoppelt, die das Substrat umsetzen kann, was zu Entstehung der Chemilumineszenz führte.

2.7 Protein-Biochemische Techniken

2.7.1 Proteinaufreinigung mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

verwendete Puffer:

„Native Binding Buffer“	20 mM Na-Phosphat, 500 mM NaCl, pH 8
„Native Wash Buffer“	20 mM Na-Phosphat, 500 mM NaCl, 0 – 60 mM Imidazol, pH 8
„Native Elution Buffer“	20 mM Na-Phosphat, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8

Die Nickel-NTA-Affinitätschromatographie diente der Aufreinigung von putativen Phagen-Lysinen, die mit dem „pET Directional TOPO[®] Expression“-Kit überexprimiert wurden (s. auch 2.6.19). Die Aufreinigung fand unter nativen Bedingungen mit Hilfe des „ProBond Purification Systems“ statt. Die Zellen einer 50 – 500 ml mit IPTG induzierten über-Nacht Flüssigkultur wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm/5 min geerntet und in 8 – 20 ml „Native Binding Buffer“ gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte auf Eis durch eine 30 minütige Behandlung mit Lysozym und Ultra-Schall-Behandlung. Die Pelletierung von Zelltrümmern erfolgte durch Zentrifugation bei 3000 g/15 min. Pellet und Überstand wurden getrennt und aufbewahrt, bis durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese ermittelt wurde, ob sich das überexprimierte Protein unlöslich im Pellet oder löslich im Überstand befand. Da sich immer genügend Protein im Überstand befand, wurde dieser in folgenden Arbeiten weiter aufgereinigt.

Zur Vorbereitung der Nickel-NTA-Agarose wurden 2 - 3 ml in eine 10 ml Säule gefüllt und anschließend mit 6 ml H₂O und 2 × 6 ml „Native Binding Buffer“ gewaschen. Maximal 10 ml des Überstandes konnten auf eine Säule gegeben werden. Das Binden, des mit einem His-Tag markierten Proteins an die Nickel-Ionen, erfolgte unter vorsichtiger Bewegung auf dem Schütteltisch für 60 min. Um unspezifische Bindungen zu entfernen wurden drei Waschschrte mit „Native Wash Buffer“ durchgeführt. Die Imidazolkonzentration des „Native Wash Buffer“ wurde hierbei von 0 mM auf 20 mM und im dritten Waschschrte auf 60 mM erhöht. Die Elution des Proteins erfolgte mit „Native Elution Buffer“ (20 mM Na-Phosphat, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8). Durch die strukturelle Ähnlichkeit wird das His-tag aus der Nickel-Bindung durch Imidazol kompetitiv verdrängt. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt und gefärbt (s. 2.7.3), um die Qualität der Eluatfraktionen zu überprüfen. Die Fraktionen, in denen das überexprimierte Protein identifiziert werden konnte, wurden gepoolt und gegebenenfalls mit Hilfe von „Amic-on Ultra-15 Centrifugal Filter Devices“ (10kDa NMWL und 30kDa NMWL) weiter eingeeengt und ein Puffer-Tausch vorgenommen.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten erfolgte in Mikrotiterplatten unter Verwendung des „Roti-Nanoquant Assays“, welcher auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford basiert [27;191]. Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant Blau G250 an Proteine verändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm. Der Farbstoff bindet an basische (speziell Arginin) und aromatische Aminosäuren der Proteine, wodurch die Veränderung des Absorptionsmaximums erfolgt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 50 µl des Proteinlysats bzw. Verdünnungen in die Wells der Mikrotiterplatte vorgelegt und 200 µl Roti-Nanoquant-Lösung in einfacher Konzentration zupipettiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Absorptionen der Proben bei 595 nm und 450 nm mit einem Platten-Spektrophotometer bestimmt werden. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen. Jede Messung wurde mit Hilfe einer Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) kalibriert.

2.7.3 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

verwendete Puffer:

4 × Laemmli-puffer	4 ml 10% (w/v) SDS-Lösung
	2,3 ml H ₂ O _{bide} st
	4 ml Glycerin
	600 µl 0,5M Tris-HCl, pH 6,8
	400 µl 2-Mercaptoethanol
	200 µl 5% (w/v) Bromphenolblau
10 × SDS-PAGE Laufpuffer	250 mM Tris-Base
	1,92 M Glycin
	1 % (w/v) SDS
	ad H ₂ O _{bide} st

Proteine wurden entsprechend ihrer molekularen Masse nach der Methode von Laemmli [94] getrennt. Das dabei verwendete Detergenz, Sodiumdodecylsulfat, lagert sich gleichmäßig an Proteine an, wodurch diese stark negativ geladen und vollständig denaturiert werden. Somit erfolgt die Trennung von Proteinen in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe und nicht mehr nach ihrer Ladung.

Durch eine Änderung des prozentualen Anteils von Acrylamid kann die Porengröße in dem Gel gesteuert werden, um die Trennung unterschiedlich großer Proteine zu optimieren. Zur Herstellung zweier Gele, die jeweils aus Trenn- und Sammelgel bestehen, wurden die folgenden Komponenten miteinander gemischt.

Sammelgel (5%):

H ₂ O	1,8 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	320 µl
Acrylamid (30 %) [Rotiphorese Gel 30 (Roth)]	330 µl
10% SDS	25 µl
TEMED	12,5 µl
25% (w/v) Ammoniumpersulfatlösung (APS)	12,5 µl

Trenngel:

	7 %	10 %	12,5 %	15 %	17 %
H ₂ O	3,5 ml	2,5 ml	1,75 ml	3,6 ml	2,6 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	3,8 ml	3,8 ml
Acrylamidlösung	1,5 ml	2 ml	2,75 ml	7,5 ml	8,5 ml
10% SDS	60 µl	60µl	60µl	150 µl	150 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8µl	20 µl	20 µl
25% APS	8 µl	8 µl	8 µl	20 µl	20 µl

Für die SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen (Biometra) mit 1mm dicken „Spacern“ verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 4 × Laemmli-Puffer (s. oben) gemischt und die Proteine für 5 min bei 95°C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als Molekulargewichtsmarker dienten zwei Protein-Größenstandards (s. 2.3).

Für die Fokussierung im Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Auftrennung der Proben im Trenngel wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Als Elektrophoresepuffer diente 1 × SDS-PAGE Laufpuffer (s. oben). Für die anschließende Analyse der Proteine wurden SDS-Gele entweder mit Coomassie gefärbt oder für Western Blots verwendet.

2.7.4 Färbung und Dokumentation von SDS-Polyacrylamidgelen

verwendete Puffer und Lösungen:

Coomassie – Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 65% (v/v) H ₂ O _{bidest}
Coomassie – Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure 40 % (v/v) Methanol 50 % (v/v) H ₂ O _{bidest}

SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese für mindestens 30 – 45 min bei RT auf einem Schütteltisch in Coomassie-Brilliant Blau Färbelösung gefärbt. Das Entfernen überschüssiger Farbe bis zur Sichtbarkeit der Proteinbanden erfolgte über einen Zeitraum von mehreren Stunden auf einem Schütteltisch durch Inkubation in Coomassie-Entfärbelösung. Anschließend konnten die Gele entweder im hauseigenen Fotolabor des Robert Koch Instituts eingescannt und das Bandenmuster mit der Adobe Photoshop Software qualitativ und quantitativ analysiert werden oder es erfolgte eine weitere Behandlung des Gels durch „Western Blotting“ (s. 2.7.5).

2.7.5 Western Blot

Blotpuffer	50 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS 20 % Methanol
------------	---

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer von Proteinen auf eine feste Matrix, welche anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können.

In unserem Fall erfolgte die Übertragung der zuvor im SDS-Gel entsprechend ihrem Molekulargewicht (MW) elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben diese an der Membranoberfläche haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Es wurde die Methode des "Semi-Dry-Blottings" eingesetzt [158].

Vor dem Transfer wurde die Membran mit 100 % Methanol aktiviert und anschließend, wie das Gel und 4 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes Whatman-Papier, kurz in Blotpuffer äquilibriert. Die Schichtung der einzelnen Lagen auf die Kathode erfolgte luftblasenfrei und in folgender Reihenfolge:

- 2 Lagen Whatman – Papier
- SDS – Gel
- PVDF – Membran
- 2 Lagen Whatman – Papier als direkter Abschluss zur Anode

Nach Verschluss der Apparatur erfolgte der Transfer für 60 – 80 min bei 120 mA. Anschließend wurden die gesuchten Proteine immunologisch nachgewiesen.

2.7.6 Immunfärbung und Detektion mittels Chemilumineszenz

TBS-T 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
 137 mM NaCl
 0,1 % (v/v) Tween 20

Nach dem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran 1 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 10% Milchpulver (w/v) in TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen.

Anschließend wurde der primäre Antikörper in 1% Milchpulver (w/v) in TBS-T verdünnt und mit der Membran für 1 Std. bei RT inkubiert. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurde bis zu einer Verdünnung von 1: 2000 in 1% Milchpulver (w/v) in TBS-T eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 Std. bei RT auf einem Schwenktisch. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Membran für je 10 min mit den folgenden Lösungen gewaschen:

1. TBS – T
2. TBS – T + 0,5 M NaCl
3. TBS – T + 0,5 % (v/v) Triton X-100

Die Detektion mittels Chemilumineszenz basiert auf einer Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Bei

dieser Reaktion wird Licht freigesetzt, das einen Röntgenfilm belichtet. Diese Methode stellt ein hochempfindliches Nachweisverfahren zur Detektion von immobilisierten Antigenen dar.

Das „Lumi-Light Western Blot Substrat“ (Roche) wurde den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt. Die gewaschene Membran wurde bei RT für ca. 1-2 min mit Substrat benetzt. Danach wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Klarsicht-Folien gelegt. Die Belichtung eines Röntgenfilms (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences) auf der so eingeschlagenen Membran erfolgte je nach Reaktionsstärke für einige Sekunden bis zu 20 min. Der Film wurde in einer Entwicklungsmaschine (AGFA curix 60) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

2.7.7 Aktivitätsbestimmungen durch Mikrotiterplattentests

Mikrotiterplattentests (96-Lochplatten) wurden zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivitäten der isolierten putativen Phagenlysine gegenüber bakteriellen Zell- und Protoplastenlysaten durchgeführt.

Zur Dokumentation enzymatischer Aktivität wurden 270µl Zell- oder Protoplastenlysate pro *well* mit 30µl (entsprechend 500 ng) des isolierten Proteins versetzt. Die OD₆₀₀ der Lysate wurde kurz vor Beginn des Versuches auf 1,0 eingestellt und direkt nach Zugabe des Proteins über einen Zeitraum von bis zu 25 min im Minutentakt durch den ELISA-Reader und die Software MagellanTM von Tecan dokumentiert. Als Negativkontrolle wurde erstens Puffer verwendet, indem das putative Lysin gelöst vorlag und zweitens Proteineluat des Plasmid (ohne Insert) tragenden Expressionsstammes, das unter gleichen Bedingungen gewonnen wurde wie das jeweilige putative Phagenlysin.

2.8 Phagen-Techniken

2.8.1 Mitomycin C-Induktion und Aufreinigung von Phagen

Mitomycin wurde erstmalig 1958 aus *Streptomyces caespitosus* isoliert. Es ist ein Arzneistoff und wird als zytotoxisches Antibiotikum verwendet. Mitomycin hemmt die DNA-Synthese, indem es zwischen zwei Strängen der DNA interkaliert. Dadurch werden die DNA-Stränge kovalent miteinander verbunden, so dass eine Dissoziation der DNA-Stränge, wie sie zur Replikation bzw. auch zur Transkription benötigt wird, nicht mehr möglich ist. Auf eine Zellschädigung dieser Art reagiert die Zelle mit einem SOS-Reparatursystem. Dieses System beinhaltet neben einer gesteigerten Synthese von Reparaturenzymen und einer verzögerten

Zellteilung auch die Freisetzung von temperenten Phagen, die vom Prophagenstatus in der lysogenen Zelle in den lytischen Vermehrungszyklus wechseln [34].

Nach Etablierung der Phageninduktion durch Mitomycin C wurde es in einer Konzentration von 2,5 µg/ml bei einer OD₆₀₀ der Kultur von 0,25 dazugegeben. Es folgte eine Inkubation über mehrere Stunden, meist über Nacht, schüttelnd bei 200 rpm und 37°C, bis eine Reduktion der OD₆₀₀ der Kultur auf 0,2 bis 0,6 zu erkennen war. Nach Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C wurde der Überstand mit 1 µg/ml DNase, 1 µg/ml RNase und einer Endkonzentration von 10 mM MgSO₄ versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin folgte eine Sterilfiltration (0,22 µm und 0,45µm).

2.8.2 Konzentrierung von Phagen durch Ultrazentrifugation

Zur weiteren Konzentration der Phagen wurde das sterilfiltrierte Lysat nach der Aufreinigung (s. 2.8.1) in spezielle, verschweißbare Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 10°C und 31000 rpm für 90 min ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das glasig sichtbare Sediment in SM-Puffer resuspendiert. Das gewonnene Phagenlysate konnte für Spotttests oder Phagenvermehrung eingesetzt werden.

2.8.3 Phagentiterbestimmung

Zur Phagentiterbestimmung der Lysate wurden Verdünnungsstufen des Phagenlysats hergestellt und mit der oben beschriebenen Methode, der „Soft Agar Overlay Technik“ (1), mit dem Wirtstamm und Softagar auf LB-Platten ausplattiert. Anhand der Anzahl der geformten „Plaque Forming Units“ (pfu) auf der Platte der höchsten Verdünnungsstufe konnte die Phagenkonzentration pro Milliliter Phagenlysate nach folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Plaqueanzahl} \times 10}{\text{Verdünnungsstufe}} = \text{pfu/ml}$$

2.8.4 Phagenvermehrung

Zur Vermehrung und Aufreinigung von Phagen wurde die „Soft Agar Overlay Technik“ (1) verwendet. Hierzu wurden 100 µl Phagenlysate bzw. deren Verdünnungen mit 100 µl log-Phase Kultur (OD₆₀₀ ~ 0,8) des Wirtstammes für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 4 ml, ca. 50 - 55°C warmen Softagar wurde die Mischung auf LB-Platten gegossen, bei RT getrocknet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Softagar einer Platte, bei der konfluente

Lyse zu erkennen war, wurde in 10 ml SM-Puffer überführt. In der Regel wurden zur Phagenvermehrung 20 Platten mit konfluenter Lyse verwendet. Durch mehrstündiges Schütteln bei RT wurden die Phagen aus dem Agar eluiert und anschließend wie beschrieben unter den Punkten 2.8.1 und 2.8.2 zentrifugiert, DNase- und RNase-verdaut, sterilfiltriert und konzentriert. Um restliche Kontaminationen im Phagenlysat zu entfernen, wurde eine Aufreinigung mit Hilfe eines Cäsiumchlorid (CsCl) Gradienten durchgeführt. Hierbei werden unterschiedliche Konzentrationen von Cäsiumchlorid-Lösungen übereinander geschichtet (s. Abb. 2-4). Phagen und Kontaminationen sammeln sich dabei durch Zentrifugation bei 28000 rpm über Nacht für 12-16 Stunden je nach Dichte im Gradienten an. Die sichtbaren Banden konnten mit Einmalspritze (Braun) und Einmal-Injektions-Kanüle (Braun) abgezogen werden. Die gewonnenen Phasen wurden 8 – 12 Std. bei 4°C gegen SM-Puffer dialysiert und anschließend mittels DNA-Isolation, Spotttest oder elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf vorhandene Phagen untersucht und der Phagentiter bestimmt (s. 2.8.3).

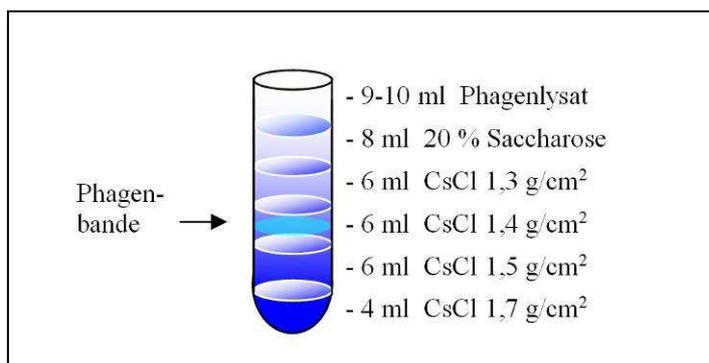


Abb. 2-4: Schichtung des Cäsiumchlorid (CsCl) Gradienten. Über die unterschiedlich konzentrierten CsCl-Schichten wurde eine 20 %ige Lösung Saccharose, darüber das konzentrierte Phagenlysat geschichtet.

2.8.5 Einzelplaque-Isolierung

Mit Hilfe eines sterilen Spatels wurden einzelne als positiv identifizierte Phagen-Plaques aus dem Softagar ausgestochen und in ein Eppendorfgefäß mit 0,2 – 0,5 ml SM-Puffer überführt. Durch mehrstündiges Schütteln bei RT wurden die Phagen aus dem Agarstückchen eluiert und mit Zentrifugenfiltern (Millipore) sterilfiltriert. Die Lagerung der Phagenstocks erfolgte bei 4°C. Diese Einzelphagen konnten wie unter Punkt 2.8.4 beschrieben weiter vermehrt werden.

2.8.6 Bestimmung der Wirtsspektren isolierter Phagen mittels Spotttest

Zur Bestimmung des Lysisspektrums wurde ein Spotttest durchgeführt. Dazu wurden 100 µl Kultur der log-Phase ($OD_{600} \sim 0,8$) jedes zu testenden Bakterienstammes in je ein steriles Röhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde dann mit 4 ml ca. 50°C warmen Softagar versetzt und der gemischte Inhalt auf eine LB-Platte gegossen. Nach dem Erhärten des Softagars wurden 10 µl Phagenlysate oder Kulturüberstand einer induzierten Flüssigkultur zur Infektion des Stammes auf die gewünschte Platte aufgetropft. Bis zum Antrocknen des Tropfens verblieb die Platte auf waagerechter Unterlage stehen. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37°C. Anhand der entstandenen Lysezonen (Spots) konnte das Lysisspektrum abgelesen werden.

2.8.7 Lysogenisierung

In den Lysezonen eines temperenten Phagen befinden sich immer sowohl lysierte als auch nicht lysierte Zellen. Nicht lysierte Zellen treten u. a. auf, wenn der Phage in das Wirtsgenom des Bakterienstamms als Prophage integriert. Bei diesem Vorgang spricht man von Lysogenisierung.

Zur Etablierung eines Phagen als Prophagen in einem Bakterienstamm wurde zunächst, so wie unter 2.8.6 beschrieben, eine Infektion mittels Spotttest durchgeführt. Einige Bakterien wurden mit einer Impföse aus dem Lyseareal gepickt und in 250 µl LB gelöst. Verdünnungsstufen der gelösten Bakterien wurden auf LB-Platten ausplattiert. Ausgehend von einer Einzelkolonie des Stammes wurde eine stationäre Übernachtskultur in LB-Medium angezogen und wie unter 2.8.1 beschrieben Phagen isoliert. Bei Auftropfen des gewonnenen Lysates (Spotttest) auf den nicht-lysogenen Indikator muss eine Lyse durch die freigesetzten Phagen erfolgen (Positivkontrolle). Auf dem lysogenen Indikator dagegen dürften keine Plaques mehr entstehen (Negativkontrolle). Die Vermehrung der Phagen erfolgte wie unter Punkt 2.8.4 beschrieben.

2.8.8 Sterilkontrollen der Phagenlysate

Nach Isolation der Phagen aus den unterschiedlichen Proben wurden Sterilkontrollen der Isolate durchgeführt. Hiefür wurde jeweils 1/10 Volumen des Isolats in 1 Volumen steriles, bei 37°C vorbebrütetes LB-Flüssigmedium gegeben und bis zu 5 Tagen bei 37°C aufbewahrt. Zusätzlich wurden 100 µl des Isolats auf LB- oder Columbiablut-Agar ausgestrichen und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 5 Tagen wurden von der Flüssigsterilkontrolle

weitere 100 µl auf LB- oder Columbiablut-Agar ausgestrichen und für mindestens 3 Tage bei 37°C inkubiert. Wenn nach dieser Zeit keine Erreger gewachsen waren, wurde das Phagenlysat als steril deklariert und konnte, wenn nötig, aus dem L3-Bereich ausgeschleust werden.

2.9 Bioinformatik

2.9.1 Auswertung der DNA-Sequenzen

Die Sequenzierung und das Zusammensetzen der einzelnen Sequenzen zu einem Contig wurden durch die GATC-Biotech AG durchgeführt. Anschließend wurde die DNA-Sequenz unter Verwendung von GeneMark.hmm [108] nach „open reading frames“ (ORFs) mit ATG, GTG oder TTG als Startcodon und mit einer Größe von mindestens 30 Codons abgesucht. Zur Identifikation von ORFs führt das Programm eine automatische Suche nach Ribosomen-Bindungsstellen (RBS), nach den Regeln von Stormo [147], durch. Weitere Kriterien zur Bestimmung eines ORF waren die mögliche Homologie vorhandener ähnlicher ORFs, welche mit der Datenbank (NCBI) analysiert wurden oder die genaue Einpassung des Gens in ein Operon.

Die Identifikation von Promotoren erfolgte durch Homologie-Vergleiche zu *E. coli* Promotoren des Typs σ^{70} nach dem Algorithmus von Mulligan et al. [114] mit Hilfe der Online Programme „Bprom“ und „Neural Network Promoter Prediction“ (s. 2.9.2). Die möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden ebenfalls mit Hilfe von BPROM ermittelt.

2.9.2 Software und Internet-Datenbanken

Tab. 2-17: Software und Datenbanken

Programm/Datenbank	Funktion	Hersteller / Website
Magellan™ (ELISA Reader Software)	Enzymaktivitäts- Messungen	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Adobe Photoshop	Bildauswertung und - bearbeitung	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Microsoft Office Excel	Datenauswertung	Microsoft Deutschland GmbH
Genemark.hmm	Suche nach ORFs	http://exon.gatech.edu/GeneMark/
NCBI („National Center for Biotechnology Information“)	Homologie Vergleiche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
BPROM - Prediction of bacterial promoters	Identifikation bakterieller Promotoren	http://linux1.softberry.com/
Neural Network Promoter Prediction	Identifikation bakterieller Promotoren	http://www.fruitfly.org
Quantity One 1-D Analysis Software	Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	BioRad, München, Deutschland

Tab. 2-17 (Fortsetzung): Software und Datenbanken

Programm/Datenbank	Funktion	Hersteller / Website
LaserGene: EditSeq, PrimerSelect, SeqMan, MapDraw, MegAlign	verschiedene DNA-Analysen	DNA Star Inc.
Multi Locus Sequence Typing (MLST)	Bestimmung der Sequenztypen von <i>Burkholderia</i>	http://www.mlst.net/
TMpred - Prediction of Transmembrane Regions and Orientation	Transmembran Analyse von Aminosäuresequenzen	http://www.ch.embnet.org/
TMHMM Server v. 2.0 Prediction of transmembrane helices in proteins	Transmembran Analyse von Aminosäuresequenzen	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
ProtScale/ Hphob. / Kyte & Doolittle	Hydrophobizitäts-Analyse von Aminosäuresequenzen	http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl
PEDANT - Protein Extraction, Description and Analysis Tool	verschiedene Proteinanalysen	http://pedant.gsf.de/

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der *Burkholderia* Isolate durch Multilokus Sequenztypisierung (MLST)

Die dieser Arbeit zur Verfügung gestellten Isolate gehören zu Vertretern der apathogenen (*B. thailandensis*) als auch pathogenen (*B. pseudomallei*, *B. mallei*) *Burkholderia*-Spezies. *B. thailandensis* ist in Risikogruppe 1 eingestuft, hingegen ist *B. mallei* und *B. pseudomallei* in Risikogruppe 3 eingestuft und muss auch unter entsprechendem Containment (BSL 3) bearbeitet werden. Bei den Isolaten handelte es sich um bis dato uncharakterisierte bakterielle Stämme der oben genannten Spezies. Um eine Bearbeitung der Isolate unter korrekten Sicherheitsbedingungen vorzunehmen, wurden die 22 zur Verfügung gestellten Stämme zunächst mit Hilfe der MLST (s. 2.6.7) charakterisiert. Mit der MLST konnten 10 der 22 Isolate als *B. thailandensis*-Stämme und 12 als *B. pseudomallei*-Stämme identifiziert werden. Für vier der 12 *B. pseudomallei*-Stämme konnte dem Allel-Profil kein Sequenztyp zugeordnet werden. Somit handelt sich bei diesen Stämmen um bisher noch nicht bekannte Sequenztypen für die entsprechende Spezies. Die Allelprofile und die daraus resultierenden Sequenztypen (ST) wurden nach Eingabe der ermittelten DNA-Sequenzen mit Hilfe der Webseite „<http://bpseudomallei.mlst.net>“ analysiert und in Tab. 3-1 zusammengefasst.

Tab. 3-1: MLST-Analyse der uncharakterisierten *Burkholderia* Isolate.

Isolat	Allel-Profil							ST	bisher bekannte Stämme	Spezies
	<i>ace</i>	<i>gltB</i>	<i>gmhD</i>	<i>lepA</i>	<i>lipA</i>	<i>nark</i>	<i>ndh</i>			
E049	6	10	15	8	10	14	9	76	LE1	<i>B. thailandensis</i>
E058	6	10	15	30	10	14	9	360	E0146	<i>B. thailandensis</i>
E067	6	10	16	8	10	14	8	80	E111, E216, G32	<i>B. thailandensis</i>
E131	6	10	15	30	10	14	9	360	E0146	<i>B. thailandensis</i>
E143	6	10	16	8	10	14	8	80	E111, E216, G32	<i>B. thailandensis</i>
E153	6	10	15	8	9	14	9	361	E0433	<i>B. thailandensis</i>
E163	6	10	16	30	9	14	9	356	E0336	<i>B. thailandensis</i>
E184	6	10	15	8	10	14	8	354	E254	<i>B. thailandensis</i>
E202	6	31	15	8	10	14	8	357	E0202	<i>B. thailandensis</i>
E207	6	10	15	8	10	14	8	345	E254	<i>B. thailandensis</i>
Bp01	1	12	2	1	1	1	1	38	SID 3477, Ranong 70 W	<i>B. pseudomallei</i>
Bp02	1	12	10	2	1	2	1	43	SID 3811, SID 4045, 2000032026	<i>B. pseudomallei</i>
Bp03	3	1	2	1	6	4	3	49	SID 6025	<i>B. pseudomallei</i>
Bp04	1	1	2	1	5	1	1	92	2002721123	<i>B. pseudomallei</i>
Bp05	4	1	6	2	6	2	1	unbekannt	-	<i>B. pseudomallei</i>
Bp06	3	1	2	1	1	3	3	46	NCTC 10276, MK1867, SID 3783	<i>B. pseudomallei</i>
Bp07	3	4	11	3	5	4	6	70	383.5, 383.9, LE2	<i>B. pseudomallei</i>
Bp08	3	2	3	1	6	4	1	unbekannt	-	<i>B. pseudomallei</i>
Bp09	1	12	6	1	1	4	6	unbekannt	-	<i>B. pseudomallei</i>
E021 (Bp10)	3	4	11	3	5	6	6	unbekannt	-	<i>B. pseudomallei</i>
E032 (Bp11)	3	1	2	1	5	4	1	168	E0233, 2666, E0233	<i>B. pseudomallei</i>
E044 (Bp12)	3	2	11	3	5	4	6	654	479a	<i>B. pseudomallei</i>

Die Spezies-Zuordnung der Isolate unbekannter STs wurde anhand der nächst-ähnlichen Sequenztypen vorgenommen. In der Spalte "bisher bekannte Stämme" sind jeweils maximal drei Stämme aufgeführt. *ace* = „Acetyl Koenzym A Reduktase“, *gltB* = „Glutamate Synthase“, *gmhD* = „ADP Glycerol Mannoheptose Epimerase“, *lepA* = „GTP-Bindung Elongationsfaktor“, *lipA* = „Liponsäure Synthetase“, *nark* = „Nitrit Sekretionsprotein“, *ndh* = „NADH Dehydrogenase“.

3.2 Mitomycin C-Induktion der *Burkholderia*-Kulturen

Zur Gewinnung von temperenten Phagen aus den *Burkholderia*-Wirtsstämmen wurde eine Mitomycin C-Induktion in Flüssigkulturen durchgeführt. Unter dem Einfluss dieses Induktors beenden temperente Phagen ihren Prophagenstatus in der lysogenen Zelle und wechseln in den lytischen Vermehrungszyklus. Weitere andere Induktoren, wie z. B. Norfloxacin oder UV-Licht, wurden ebenfalls überprüft. Sie führten nicht zur Freisetzung von Phagen aus den getesteten *Burkholderia*-Stämmen.

Um eine optimale Induktion von möglichen Phagen aus *Burkholderien* zu erreichen, wurden die Mitomycinkonzentration und der Induktionszeitpunkt variiert. Die Phageninduktion wurde anhand der Reduktion der OD₆₀₀ der Kultur nach Zugabe von Mitomycin C gemessen. Die Reduktion der OD₆₀₀ der Kultur weist auf eine Freisetzung von Bakteriophagen und die damit verbundene Wirtszelllyse hin. Als Versuchsstamm wurde der Wirtsstamm des

charakterisierten Phagen phiE125, *B. thailandensis* E125 [179], verwendet. Die Zugabe von Mitomycin zu 5ml Flüssigkultur erfolgte in einer Endkonzentration von 1,0 – 5,0 µg/ml. Die Untersuchung ergab, dass eine Mitomycinkonzentration unter 1,0 µg zu einer schwachen Reduktion der OD₆₀₀, bis auf etwa 0,8 - 1,0 führten. Bei Konzentration von 1,0 - 5,0 µg/ml konnte keine direkte Korrelation zwischen Reduktion der OD₆₀₀ und Mitomycinkonzentration detektiert werden, in allen Fällen konnte die OD₆₀₀ aber auf Werte von 0,2 - 0,5 reduziert werden, was auf eine ausreichende Freisetzung von Phagen hindeutet. Um den optimalen Induktionszeitpunkt herauszufinden wurde Mitomycin zu unterschiedlichen Wachstumsphasen der Bakterien in der Flüssigkultur dazugegeben (OD₆₀₀ 0,1 - 0,4). Auch hier konnte keine direkte Korrelation zwischen Induktionszeitpunkt und Reduktion der OD₆₀₀ festgestellt werden. In wiederholten Versuchen war eine Reduktion auf eine OD₆₀₀ von 0,2 – 0,5 bei allen Zeitpunkten zu erkennen. Für alle weiteren Versuche wurde somit entschieden, die Induktion der möglichen Phagen aus den *Burkholderia*-Stämmen mit einer Mitomycin C-Konzentration von 2,5 µg/ml und bei einem Induktionspunkt OD₆₀₀ von 0,25 durchzuführen. Dies entspricht auch den aus der Literatur beschriebenen Daten [49;179].

Nach Induktion der Kulturen der 10 *B. thailandensis*-Stämme als auch der 12 *B. pseudomallei*-Stämme wurde die Reduktion der OD₆₀₀ über einen Zeitraum von 17 Stunden beobachtet. Die stärksten Reduktionen bis auf eine OD₆₀₀ von 0,21 – 0,32 konnten bei den *B. thailandensis*-Kulturen E058, E067, E131 und E202 beobachtet werden (s. Abb. 3-1). Auffallend bei diesen Kulturen ist auch der schnelle Einbruch der OD₆₀₀ über einen kurzen Zeitraum, der auf eine Freisetzung von Bakteriophagen und die damit verbundene Wirtszell-lyse deutet. Im Vergleich dazu wiesen die anderen mit Mitomycin induzierten Kulturen eine langsame Verringerung der OD₆₀₀ auf, die eher auf eine toxische Wirkung des Mitomycins auf die Kultur hindeutet. Die Reduktion der optischen Dichten von *B. pseudomallei*-Kulturen konnte auf Grund der Gegebenheiten im L3-Labor lediglich per Augenmaß beurteilt werden. Die am stärksten eingebrochenen Flüssigkulturen waren Bp2, Bp10 und Bp12. Eine zusammenfassende Dokumentation der OD₆₀₀-Verläufe nach Zugabe von Mitomycin C ist in Tab. 3-2 und Abb. 3-1 dargestellt.

Dass die lytische Aktivität in Mitomycin C-induzierten Kulturüberständen auf die Anwesenheit von Phagen zurückzuführen war, konnte, abgesehen vom E202- und vom Bp2-Kulturüberstand, bei den genannten Stämmen durch Spotttests bzw. die Infektion verschiedener *Burkholderia*-Stämme nachgewiesen werden. Auch durch intensive Versuche war es nicht möglich, Prophagen in den anderen Burkholderien zu detektieren. Womöglich

sind diese Stämme nicht lysogen oder vorhandene Prophagen sind defekt und somit z. B. nicht in der Lage, vom lysogenen in den lytischen Zyklus zu wechseln.

Tab. 3-2: Reduktion der optischen Dichten (OD₆₀₀) der *B. thailandensis*- (a) und der *B. pseudomallei* Kulturen (b) nach Mitomycin C-Induktion.

(A) Wirtsstamm (<i>B. thailandensis</i>)	Reduktion der OD ₆₀₀ der induzierten Kulturen nach 17h	Spotttest	(B) Wirtsstamm (<i>B. pseudomallei</i>)	Reduktion der OD ₆₀₀ der induzierten Kulturen nach 17h	Spotttest
E049	0,99	-	Bp1	Reduktion	-
E058	0,23	+	Bp2	sehr starke Reduktion	-
E067	0,21	+	Bp3	Reduktion	-
E131	0,28	+	Bp4	Reduktion	-
E143	0,98	-	Bp5	Reduktion	-
E153	1,17	-	Bp6	Reduktion	-
E163	1,61	-	Bp7	Reduktion	-
E184	0,96	-	Bp8	Reduktion	-
E202	0,32	-	Bp9	Reduktion	-
E207	1,07	-	Bp10	sehr starke Reduktion	+
			Bp11	Reduktion	-
			Bp12	sehr starke Reduktion	+

Mitomycin C-Zugabe erfolgte in einer Endkonzentration von 2,5µg/ml. Ein „+“ signalisiert die Plaquebildung im Spotttest, ein „-“ keine Plaquebildung auf den *Burkholderia*-Wirtsstämmen durch die jeweiligen Kulturüberstände.

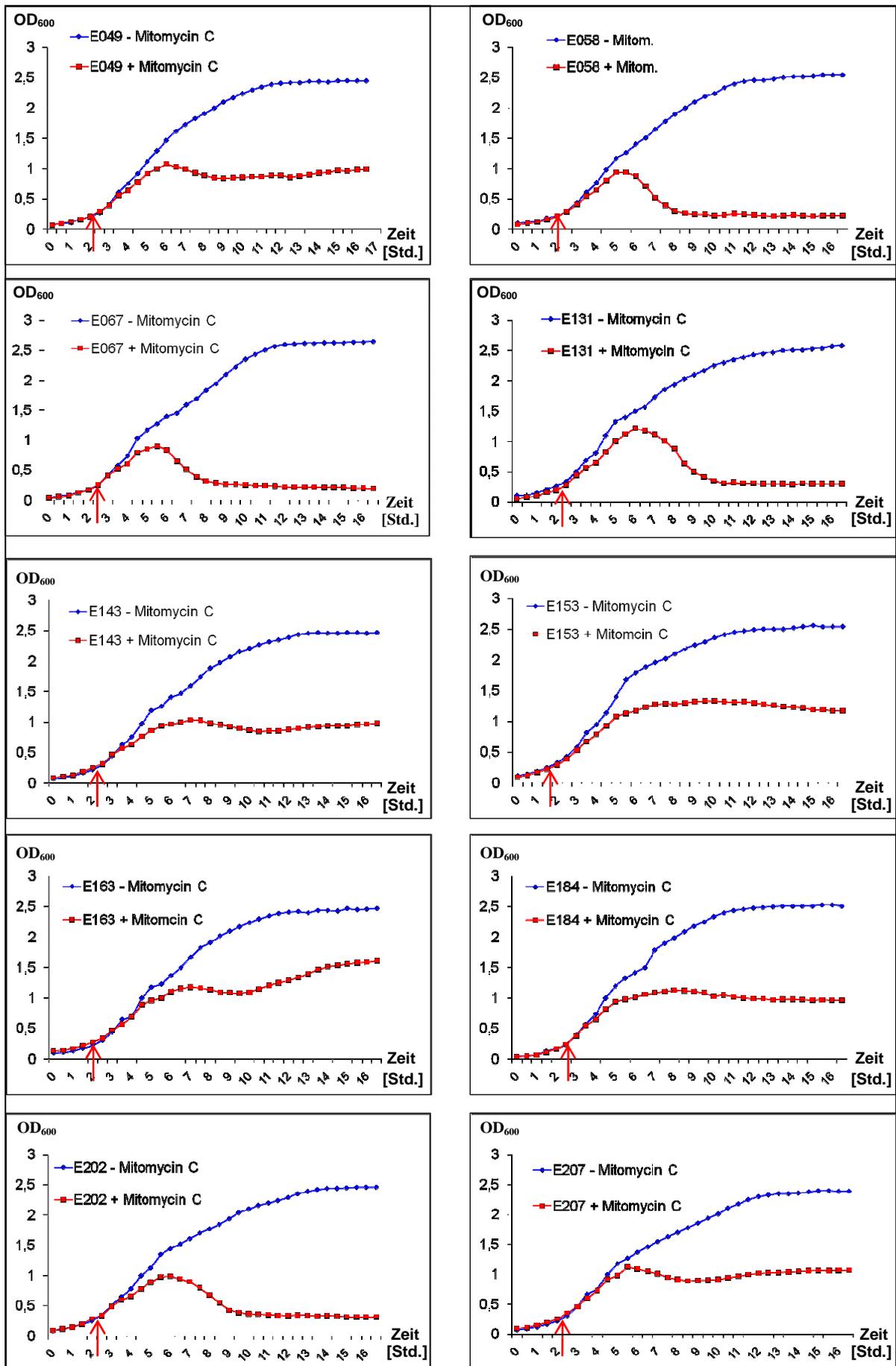


Abb. 3-1: Wachstumskurven der *B. thailandensis*-Kulturen mit Mitomycin C-Induktion (rote Linie) und ohne Mitomycin C-Induktion (blaue Linie). Die Mitomycin C-Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,25 (roter Pfeil) in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml.

3.3 Isolierung und Vermehrung von *B. thailandensis* und *B. pseudomallei* Phagen

In 4 von 10 sterilfiltrierten Überständen Mitomycin C-induzierter *B. thailandensis*-Kulturen und bei 2 von 12 *B. pseudomallei*-Kulturen konnte lytische Aktivität beobachtet werden, die auf die Anwesenheit von Phagen zurückzuführen war. Die Vermehrung der Phagen, ausgehend von einem Einzelplaque, erfolgte über Softagarplatten mit konfluenter Lyse des Wirtstammes. Eine Konzentrierung konnte durch die Pellettierung in der Ultrazentrifuge erreicht werden. Durch die anschließenden CsCl-Dichtegradientenzentrifugation konnten die Phagen in sehr reiner Form gewonnen und noch stärker konzentriert werden. Eine Ausnahme hierbei stellten die beiden Phagen aus den *B. pseudomallei* Stämmen Bp10 und Bp12 dar. Die Aufreinigung durch den CsCl-Gradienten zeigte bei diesen Phagen keinen Erfolg. Nach mehrfachen Versuchen konnten in den abgezogenen Banden wiederholt lediglich Phagenpartikel nachgewiesen werden, obwohl intakte Phagen nach der Konzentrierung durch Ultrazentrifugation vorhanden waren.

Aus den induzierten Kulturen E058, E067, E131, E202, Bp2, Bp10 und Bp12 konnten die Phagenlysate mit dem Phagen phiE058, phiE067, phiE131, phiE202, phiBp10 und phiBp12 gewonnen werden. Diese neuen Phagen wurden in dieser Arbeit erstmalig isoliert und einer Charakterisierung unterzogen. Die Anwesenheit von Bakteriophagen in den Lysaten konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen eindeutig bewiesen werden (s. Abb. 3-4). Zur weiteren Charakterisierung der Phagen wurde u.a. die Bestimmung des Wirtsspektrums im Zuge eines Spotttests (s. 2.6.7) und DNA-Isolierung mit anschließender Restriktionsanalyse (s. 2.6.10) durchgeführt.

3.4 Wirtsspektren der Phagen

Bakteriophagen besitzen eine in manchen Fällen hochspezifische und stark lytische Fähigkeit gegenüber Wirtsbakterien. Diese Fähigkeit kann unter anderem als ein nützliches Instrument bei der Diagnostik unbekannter mikrobiologischer Proben genutzt werden. Die Phagen phiE125 [179] und phi1026b [49] beispielsweise, können auf Grund ihrer spezifischen Lyse von *B. mallei* zur Identifikation dieses Erregers genutzt werden. Darum sollten weitere Phagen aus Burkholderien isoliert und bezüglich ihres Wirtsbereiches und damit ihrer möglichen Nutzbarkeit für die spezifische Diagnostik charakterisiert werden.

Für die Bestimmung der Wirtsspektren der isolierten Phagen wurden zuerst die Stämme der Gattung *Burkholderia* untersucht. Neben den *Burkholderia* sp. wurde eine Vielzahl weiterer Bakterienspezies auf ihre Phagen-Sensitivität getestet. Keine der isolierten Phagen zeigte im

Spotttest eine lytische Wirkung auf einen Stamm einer anderen Gattung (s. Tab. 3-3). Auf ihrem jeweiligen Ursprungsstamm zeigten die Phagen ebenfalls keine lytische Aktivität. Die Phagen unterschieden sich aber in ihren Wirtsspektren innerhalb der *Burkholderia* sp.

Die *B. thailandensis*-Phagen phiE058 und phiE131, die sich durch weitere Analysen als identisch herausstellten (s. 3.7), zeigten eine lytische Wirkung auf 10 von 12 getesteten *B. thailandensis*, auf 3 von 13 *B. mallei* und auf 10 von 12 *B. pseudomallei*-Stämmen. phiE067 konnte 11 von 12 *B. thailandensis*, keinen der 13 *B. mallei* und alle 12 *B. pseudomallei*-Stämme lysieren. phiE202 wies keine lytische Aktivität auf, weder auf den apathogenen noch auf den pathogenen *Burkholderia*-Stämmen.

Die aus den *B. pseudomallei*-Stämmen isolierten Phagen phiBp10 und phiBp12 wiesen ein Wirtsspektrum auf, das sich auf die pathogenen Spezies *B. pseudomallei* und *B. mallei* beschränkte. Weder andere getestete *Burkholderia*-sp. noch andere Bakterien Spezies wurden im Spotttest durch diese Phagen lysiert. Die lytische Aktivität gegenüber *B. pseudomallei* war jedoch eingeschränkt, so dass nur 5 von 12 Stämmen lysiert wurden. phiBp2 wies keine lytische Aktivität auf, weder auf den apathogenen noch auf den pathogenen *Burkholderia*-Stämmen.

Tab. 3-3: Wirtsspektren der isolierten Phagen aus *B. thailandensis* (a) und *B. pseudomallei* (b).

Phagenlysate	phiE058	phiE067	phiE131	phiE202
Wirtstamm (Anzahl getesteter Stämme)				
<i>B. pseudomallei</i> (12)	+ - (Bp2, Bp5)	+	+ - (Bp2, Bp5)	-
<i>B. mallei</i> (13)	+ (Bm6, Bm7, Bm10) -	-	+ (Bm6, Bm7, Bm10) -	-
<i>B. thailandensis</i> (12)	+ - (E058, E131)	+ - (E067)	+ - (E058, E131)	-
weitere <i>Burkholderia</i> sp.	-	-	-	-
weitere Bakterien sp.	-	-	-	-
Phagenlysate	phiBp2	phi Bp10	phi Bp12	
Wirtstamm (Anzahl getesteter Stämme)				
<i>B. pseudomallei</i> (12)	-	+ - (Bp4, Bp5, Bp6, Bp7, Bp9, Bp10, Bp12)	+ - (Bp4, Bp5, Bp6, Bp7, Bp9, Bp10, Bp12)	
<i>B. mallei</i> (12)	-	+	+	
<i>B. thailandensis</i> (12)	-	-	-	
weitere <i>Burkholderia</i> sp.	-	-	-	
weitere Bakterien sp.	-	-	-	

Ein „+“ signalisiert die Plaquebildung im Spotttest, ein „-“ keine Plaquebildung auf den getesteten Wirtsstämmen durch die jeweiligen Phagenlysate. Die in Klammern geschriebenen Stämme zeigen die Ausnahmen an. Komplette Liste getesteter Bakterien: siehe Tab. 6-1 und Tab. 6-2 im Anhang.

Nach Betrachtung der Wirtsspektren hinsichtlich einer möglichen Verwendung der Phagen für die Diagnostik von pathogenen *Burkholderia* und insbesondere zur Differenzierung von apathogenen *B. thailandensis* Stämmen und pathogenen *B. pseudomallei* bzw. *B. mallei*-Erregern wurden die Phagen phiE067 und phiBp10 ausgewählt und somit in den folgenden Arbeiten einer detaillierteren Charakterisierung unterzogen.

Die Spezifität des Phagen phiBp10 gegenüber den pathogenen Spezies *B. pseudomallei* und *B. mallei* ermöglicht die Unterscheidung der pathogenen von den apathogenen *Burkholderia*. Verwendet man dazu in Kombination den Phagen phiE067, der eine Spezifität gegenüber *B. thailandensis* und *B. pseudomallei* aufweist, kann zusätzlich eine Differenzierung zwischen *B. pseudomallei* von *B. mallei*-Stämmen erfolgen. Allerdings muss angemerkt werden, dass

der Phage phiBp10 den Wirtstamm *B. pseudomallei* nur eingeschränkt lysiert, 7 der 12 getesteten Stämme zeigten keine Sensitivität gegenüber dem Phagen.

3.5 Analyse der Plaquemorphologie

Zur Charakterisierung der Plaquemorphologie ist die Erzeugung von Einzelplaques eine Voraussetzung, welche man durch Herstellung einer Verdünnungsreihe des jeweiligen zu testenden Phagenlysates und Ausbringung auf den jeweiligen Wirtstamm mit der „Soft Agar Overlay Technik“ erreicht. Bei dem aus *B. thailandensis* gewonnenen Phagen phiE067 erfolgte die Einzelplaquerzeugung auf *B. pseudomallei* Bp1 als Wirtstamm. Die Plaques, die durch diesen Phagen erzeugt wurden, hatten einen Durchmesser von 1-3 mm, waren klar und hatten einen scharf abgegrenzten Rand (s. Abb. 3-2).

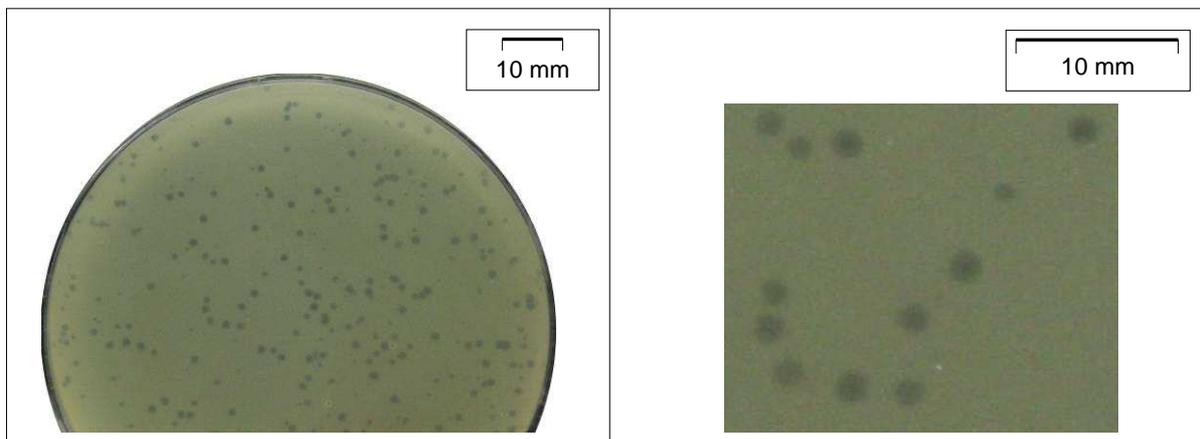


Abb. 3-2: Plaquemorphologie von phi067 auf dem Wirt *B. pseudomallei* Bp1. Die Fotos wurden zur deutlichen Darstellung der Plaques mit einem schwarzen Hintergrund angefertigt.

Zur Dokumentation der Plaques des Phagen phiBp10 wurde *B. mallei* als Wirtstamm verwendet. Die Plaques des Phagen waren denen des Phagen phiE067 sehr ähnlich. Der Durchmesser betrug 1-3 mm, die Plaques waren klar und von dem umgebenden Bakterienrasen klar abgegrenzt (s. Abb. 3-3).

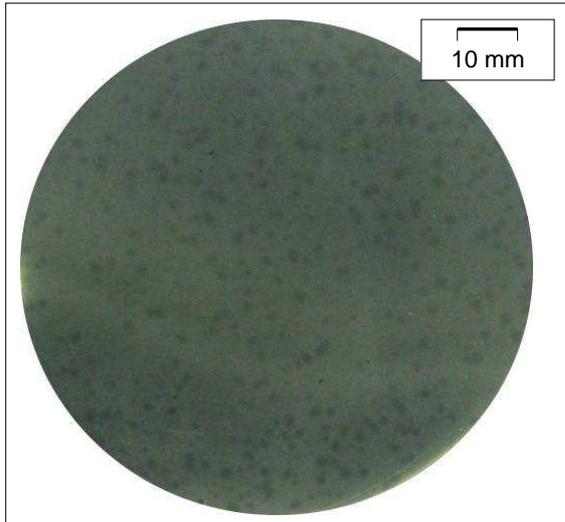


Abb. 3-3: Plaquemorphologie von phiBp10 auf dem Wirt *B. mallei* Bm3. Auf Grund der Gegebenheiten im L3-Labor wurden die Fotos zur deutlichen Darstellung der Plaques mit einem schwarzen Hintergrund angefertigt.

3.6 Analyse der Phagenmorphologie durch elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Einordnung von Bakteriophagen erfolgt wie einleitend beschrieben u. a. aufgrund ihrer Morphologie, also der Phagenkopfstruktur und, falls vorhanden, der Phagenschwanzstruktur. Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es sich sowohl bei den aus *B. thailandensis* als auch bei den aus *B. pseudomallei* gewonnenen Phagen um geschwänzte Phagen mit ikosaedrischem Kopf handelt, die demnach der Ordnung *Caudovirales* zugeordnet werden können (s. Abb. 3-4). Die Schwanzstrukturen sind dick, sehr strukturiert und kontraktionsfähig. Am distalen Schwanzteil sind bei einigen Phagen Bodenplatten zu erkennen, an die *spike*-förmige Fortsätze und Schwanzfibern anschließen. Ferner ist bei den Phagen eine sich verjüngende Halsstruktur zu erkennen, an welches sich das ikosaedrische Kapsid anschließt. Die Phagen haben eine Größe von ca. 170-200 nm. Alle Phagen gehören somit zur Familie der *Myoviridae*.

Auffällig bei den *B. pseudomallei*-Phagen waren die oft in Bestandteile zerfallenen Phagen. Nicht selten waren einzelne Phagenstrukturen, wie Phagenschwänze und Phagenköpfe zu erkennen. Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des *B. thailandensis*-Phagen phi202 zeigten nur Phagenartikel, was erklären könnte, dass dieser Phage im Spotttest keine Aktivität zeigte. Es liegt offenbar ein Defekt bei der Assemblierung der Phagenartikel vor.

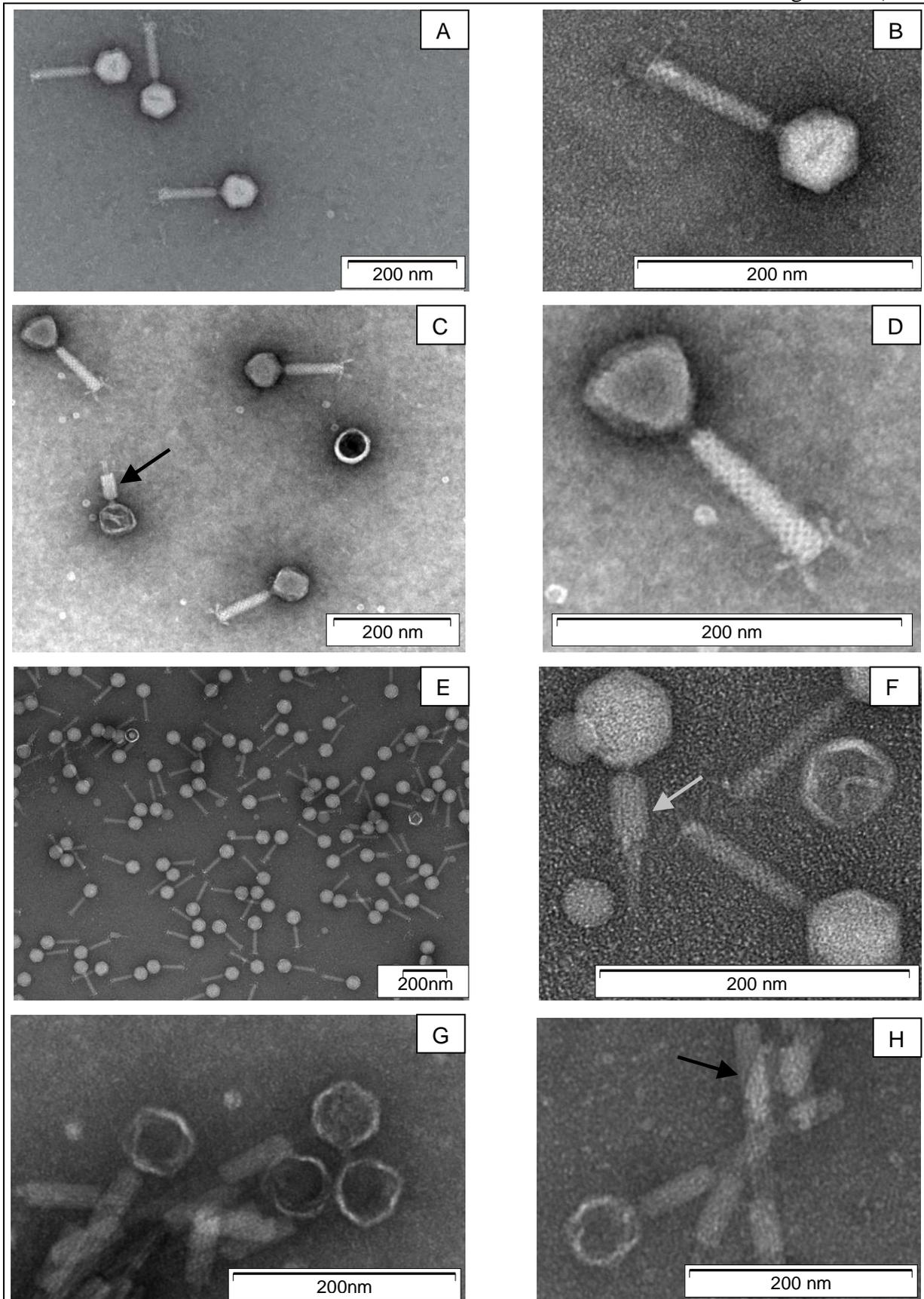


Abb. 3-4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *Burkholderia* Phagen. phiE058 (A, B), phiE067 (C, D), phiE131 (E, F), phiBp10 (G) und phiBp12 (H). Sie gehören morphologisch zu den *Myoviridae*. Zum Teil sind kontrahierte Schwanzteile (Pfeil in C und F) und einzelne Phagenstrukturen zu erkennen (G und H). Die Bilder wurden angefertigt von Herrn Dr. Michael Laue, RKI, Berlin.

3.7 DNA Analysen

3.7.1 DNA Restriktionen

Zur weiteren Charakterisierung der Phagen und um eine Größenbestimmung der isolierten Phagen-DNA durchzuführen, erfolgten Restriktionsanalysen. Durch diese konnte gezeigt werden, dass alle isolierten Phagen doppelsträngige DNA enthalten. Die Restriktionen wurden mit verschiedenen Enzymen durchgeführt, wobei sich *EcoRI* als am besten geeignet für die Restriktion der *B. thailandensis*-als auch *B. pseudomallei*-Phagen-DNAs herausstellte, so dass damit gut differenzierbare DNA-Fragmente nach Restriktion im Agarosegel dargestellt werden konnten (s. Abb. 3-5, Abb. 3-6). Die im Agarosegel zu erkennenden Fragmente hatten eine Größe von ca. 300 – 9000 bp. Das Enzym *RsaI* erzeugte DNA-Fragmente, die im Agarosegel im niedermolekularen Bereich jedoch zunehmend schwieriger zu differenzieren waren. Die Restriktionsendonukleasen *BamHI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HpaII* und *SmaI* dagegen zeigten Bandenmuster, deren Produkte sich im Agarosegel im Bereich eines höheren Molekulargewichts bewegten und die einzelnen Fragmente aufgrund ihrer Größe nicht deutlich genug voneinander getrennt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Anhand der produzierten Bandenmuster konnte des Weiteren festgestellt werden, dass es sich bei den Phagen phiE058 und phiE131 um dieselben Phagen handelte. Alle verglichenen Bandenmuster waren, bei Verwendung des gleichen Enzyms, für diese beiden Phagen identisch. Abb. 3-5 zeigt die Restriktionsverdau und die identischen Restriktionsmuster von phiE058 und phiE131 durch die Enzyme *EcoRI* und *RsaI*. Bestätigt werden konnte diese Annahme durch die Analyse der Wirtsspektren beider Phagenlysate, welche sich ebenfalls als identisch herausstellten (s. 3.4). Die MLST der Wirtsstämme E058 und E131 zeigten außerdem übereinstimmende Sequenztypen. Auch die *Burkholderia pseudomallei*-Phagen phiBp10 und phiBp12 wiesen ein identisches Restriktionsmuster auf und konnten als dieselben Phagen identifiziert werden (s. Abb. 3-6). Zusätzlich ist anzumerken, dass die DNA von phiBp10 und phiBp12 nur in einer geringen Konzentration von ca. 10ng DNA/ μ l H₂O isoliert werden konnte. Im Vergleich dazu konnten bei den *B. thailandensis*-Phagen zum Teil Konzentrationen von bis zu 2 μ g DNA/ μ l H₂O erreicht werden. Grund hierfür war die Tatsache, dass sich die Phagen phiBp10 und 12 wegen ihrer Instabilität nicht über eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufreinigen ließen und somit Verunreinigung aufwiesen. Bei der DNA-Isolation konnte der DNase- und RNase-Verdau zur Reduktion kontaminierender bakterieller DNA des Weiteren nur eingeschränkt durchgeführt werden, da sich ein großer Teil der Phagen-DNA wahrscheinlich bereits außerhalb der kaputten Phagenköpfe befand.

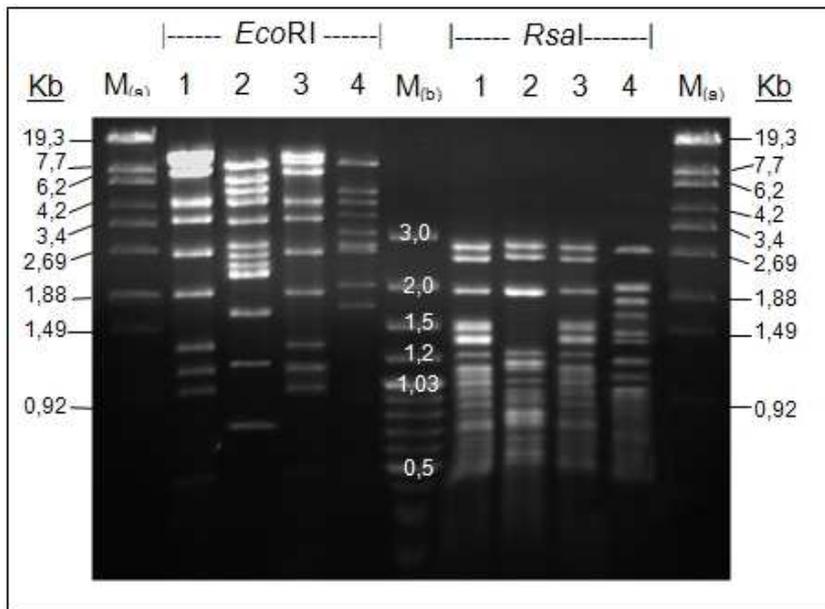


Abb. 3-5: DNA-Restriktionsmuster der isolierten *B. thailandensis*-Phagen. Gezeigt sind die Restriktionsmuster der Phagen phiE058 (1), phiE067 (2), phiE131 (3) und phiE202 (4) nach Restriktion mit *EcoRI* und *RsaI*. $M_{(a)}$ = Marker Lambda DNA/Eco130I; $M_{(b)}$ = 100bp DNA ladder Plus.

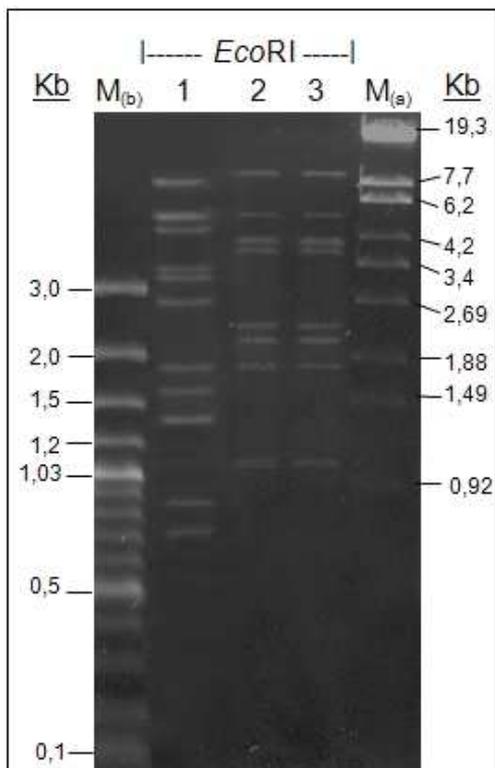


Abb. 3-6: DNA-Restriktionsmuster der isolierten *B. pseudomallei*-Phagen. Gezeigt sind die Restriktionsmuster der Phagen phiBp2 (1), phiBp10 (2) und phiBp12 (3) nach Restriktion mit *EcoRI*. $M_{(a)}$ = Marker Lambda DNA/Eco130I; $M_{(b)}$ = 100bp DNA ladder Plus.

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente und daraus resultierend der Phagen Genome wurde das Programm „Quantity One 1-D Analysis“ und das System „Molecular Imager ChemiDoc XRS“ herangezogen. Anhand der Größen der DNA-Fragmente der Marker wurden die Größen der einzelnen DNA-Fragmente der Phagen-DNA mit Hilfe der Software bestimmt und durch die Summe der Fragmentgrößen die Phagen Genomgröße berechnet. Beispielhaft ist das System für die *B. thailandensis*-Phagen in Abb. 3-7 dargestellt.

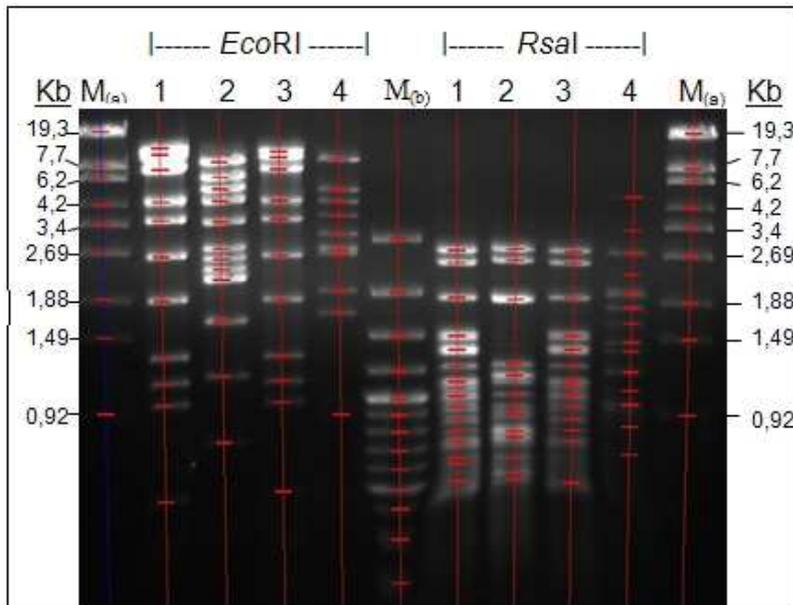


Abb. 3-7: Genomgrößenbestimmung der isolierten *B. thailandensis*-Phagen mit Hilfe der Software „Quantity One 1-D Analysis“. Durch den Vergleich der DNA-Banden der DNA-Marker definierter Größe, mit den erzeugten Banden des Bandenmusters mit Hilfe der Software, konnte auf deren Größe (in bp) geschlossen werden. 1 = phiE058; 2 = phiE067; 3 = phiE131; 4 = phiE202; $M_{(a)}$ = Marker Lambda DNA/Eco130I; $M_{(b)}$ = 100bp DNA ladder Plus.

Die Ergebnisse der Genomgrößenbestimmungen mit dem „Molecular Imager“ der *B. thailandensis* und der *B. pseudomallei*-Phagen sind in Tab. 3-4 dargestellt. Eine fast exakt gleiche Genomgröße der Phagen phiE058 und phiE131 sowie phiBp10 und phiBp12 bestätigt ein weiteres Mal, dass es sich bei diesen um je zwei identische Phagen handelt. Eine exakte Bestimmung der Genomgröße wurde für phiE067 durch die Sequenzierung von der „GATC Biotech AG“ durchgeführt (s. 3.8).

Tab. 3-4: Genomgrößen der isolierten Phagen.

phiE058	53,12
phiE067	42,96
phiE131	53,44
phiE202	37,00
phiBp2	34,00
phiBp10	34,41
phiBp12	34,25

Zur Anwendung kam hier die Software „Quantity One 1-D Analysis“ und das System „Molecular Imager ChemiDoc XRS“. Trotz der Annahme, dass phiE058 und phiE131 sowie phiBp10 und phiBp12 identische Phagen darstellen, wurden die Genomgrößen zunächst unabhängig voneinander bestimmt.

3.7.2 DNA Hybridisierungen

Um DNA-Homologien der isolierten Phagen untereinander und zu dem bereits publizierten *Burkholderia* Phagen phi1026b [49] identifizieren zu können, wurden DNA-Hybridisierungs-Experimente mit den Phagen-DNAs durchgeführt. Hierbei werden sequenzspezifische Homologien auf DNA-Ebene nachgewiesen. Mit *EcoRI* gespaltene Phagen-DNA wurde dazu gelelektrophoretisch getrennt und durch Southern Blot auf Nylonmembranen übertragen. Als Hybridisierungssonde wurde *EcoRI*-gespaltene, mit DIG markierte Gesamt-DNA der Phagen phiE067 und phiBp10 eingesetzt.

Durch die Versuche konnte festgestellt werden, dass Homologien zwischen den aus *B. thailandensis* gewonnenen Phagen phiE067 und phiE058 bzw. phiE131 bestehen. Von einigen DNA-Fragmenten der Phagen phiE058 und phiE131 ging nach Inkubation mit der phiE067-Sonde ein Hybridisierungssignal aus (s. Abb. 3-8 A). Die DNA-Fragmente des Phagen phiE067 als Positivkontrolle zeigten intensive Signale. Diese Ergebnisse verdeutlichen die hohe phylogenetische Beziehung zwischen den Phagen phiE058/phiE131 und phiE067. Interessanter Weise konnten mit der phiE067-Sonde keine Signale bei dem ebenfalls aus *B. thailandensis* stammenden Phagen phiE202 erzeugt werden. Signale bei den DNA-Fragmenten der *B. pseudomallei*-Phagen phiBp10 und phiBp12 und dem Phagen phi1026b wurden nicht detektiert. Des Weiteren konnte hier, wie schon bei der Restriktionsanalyse gezeigt, ein identisches Muster der Phagen phiE058 und E131 nachgewiesen werden.

Bei Verwendung der phiBp10-Sonde wiederum konnten keine Signale mit den aus *B. thailandensis* gewonnenen Phagen phiE067, phiE058 und phiE131 detektiert werden. Jedoch ließen sich Signale bei DNA-Fragmenten von aus *B. pseudomallei* stammenden Phagen nachweisen. phiBp10 als Positivkontrolle eingesetzt, zeigte starke Signale und auch bei dem Phage phi1026b [49] (s. Abb. 3-8 B) konnten Signale einiger Banden detektiert werden. Weiterhin konnten starke Signale bei dem aus *B. thailandensis* stammenden Phagen phiE202 festgestellt werden, welches ein Hinweis für eine phylogenetische Verwandtschaft der Phagen ist.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse der DNA-Hybridisierungen eine phylogenetische Verwandtschaft der *B. thailandensis*-Phagen phiE058/phiE131 und phiE067 untereinander sowie eine phylogenetische Verwandtschaft der *B. pseudomallei*-Phagen phiBp10, phiBp1026b untereinander und mit dem *B. thailandensis*-Phagen phiE202.

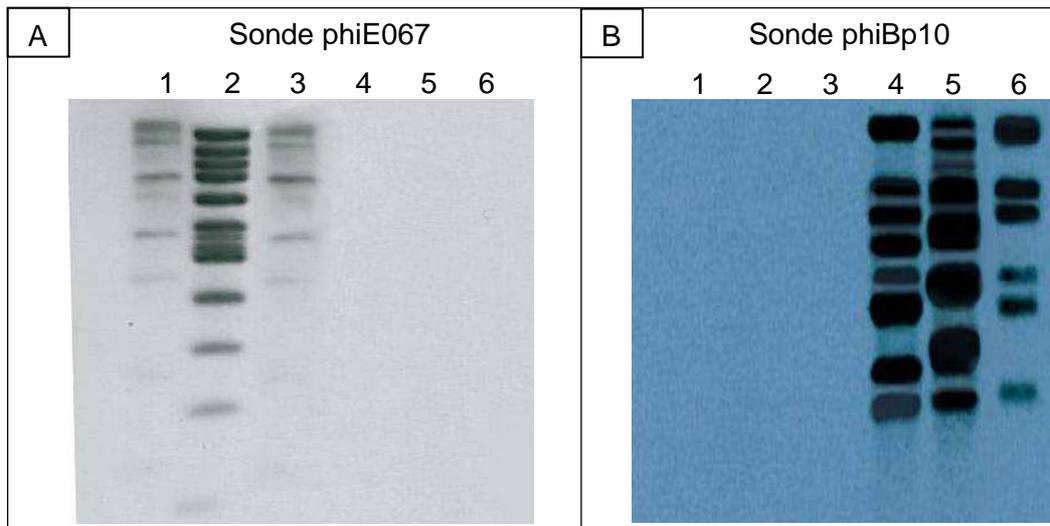


Abb. 3-8: Hybridisierung von Phagen-DNAs. Die verwendete Hybridisierungssonde war phiE067/*EcoRI* (A) und phiBp10/*EcoRI* (B). Die Phagengenome wurden vor dem Transfer auf die Nylonmembran mit *EcoRI* gespalten. Alle sichtbaren Banden sind Signale die durch Hybridisierung der jeweiligen Fragmente mit den jeweiligen markierten Sonden detektiert werden konnten. 1= phiE058; 2 = phiE067; 3 = phiE131; 4 = phiE202; 5 = phiBp10; 6 = phi1026b

3.8 DNA-Sequenzierung des Phagen phiE067

Die Sequenzierung der Phagen-DNA phi067 erfolgte durch die Firma „GATC-Biotech AG“. Der Phage phiBp10, welcher für diagnostische Zwecke in Kombination mit dem Phagen phi067 eingesetzt werden soll, konnte auf Grund der mangelnden DNA-Qualität nicht sequenziert werden.

3.8.1 DNA-Endstrukturen von phiE067

Wie einleitend beschrieben, können Bakteriophagen der Ordnung *Caudovirales* entweder kohäsive Enden („cos-sites“) oder terminale Redundanz als DNA-Endstrukturen aufweisen. Dies soll in der Folge zur Charakterisierung der Phagen-DNA untersucht werden.

Durch Restriktionsanalysen konnte bereits gezeigt werden, dass der Phage phiE067 doppelsträngige DNA besitzt. Die Sequenzdaten des Phagen wurden von der Firma „GATC Biotech“ generiert. Die DNA-Endstrukturen weisen nach Anotierung von GATC eine repetitive Sequenz auf. Nach Analyse der Sequenzierungsergebnisse mit Hilfe des Programms „MacVector“ (s. 2.9.2) konnte ein 509 bp langer „direct repeat“ am 3‘ und am 5‘-Ende der Phagen-DNA festgestellt werden. Dies entspricht einer terminalen Redundanz von 1,15%. Zur genauen Analyse wurden Amplifikationen der DNA-Endstrukturen durchgeführt.

Bei diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um eine repetitive Sequenz, sondern um eine singular vorkommende 509 bp lange Sequenz handelt. Deutlich gemacht wurde dies durch das von den Primern phi067-left-End-1 (1) und phi067-right-End-1 (2) erzeugte Amplifikat (s. Abb. 3-9). Im Falle einer repetitiv vorkommenden DNA-Region von 509 bp wäre mit den Primern ein Amplifikat einer Größe von 1068 bp zu erwarten gewesen, im Falle einer singular vorkommenden Region ein Fragment der Größe 534 bp. Im Agarosegel war nach Amplifikation ein Fragment, welches der Größe 534 bp entsprach, zu erkennen und zwei weitere Fragmente bei ca. 1350 und 3200 bp. Um sicher zu gehen, wurden alle drei Banden aus dem Gel eluiert und per Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungsergebnisse bestätigten die Annahme, dass es sich lediglich bei dem 534 bp Fragment um die in Frage kommende Sequenz handeln konnte. Die beiden größeren Amplifikate entstanden durch unspezifische Bindung der Primer an die template-DNA. Die Sequenzierung bestätigte somit, dass die DNA-Endsequenz nicht, so wie von GATC Biotech angegeben, repetitiv, sondern singular vorhanden war. Die durch GATC festgestellte Gesamtlänge des Phagen phiE067 von 44,158 kp wurde darum um die Größe des vermeintlichen direct Repeat von 509bp reduziert, so dass man eine Größe von 43,649 kb erhält.

Weiterhin konnte durch die Sequenzierung des 534 bp- Fragmentes festgestellt werden, dass es sich bei dieser DNA-Region nicht um die eigentlichen Phagen-Enden handelt, da über die Region hinaus amplifiziert und per Sequenzierung eine durchgehende Sequenz erzeugt werden konnte. Im Falle von vorhandenen Phagen-Enden hätte es zum Abbruch der Reaktionen kommen sollen.

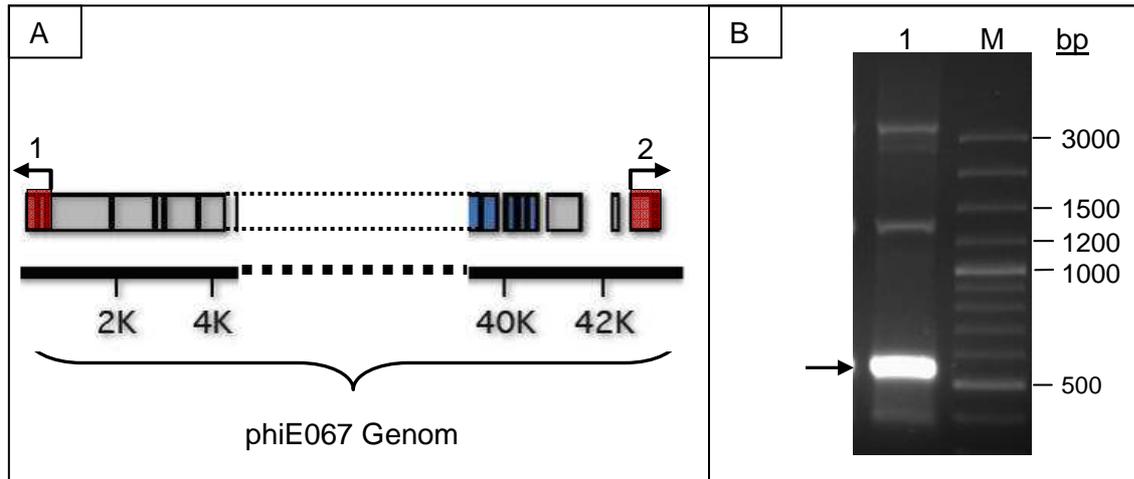


Abb. 3-9: PCR-Analyse der von „GATC Biotech“ vorgegebenen Phagen-DNA-Endsequenzen.

(A): Die Primer (schwarze Pfeile) sind in Position 515 – 531 (1) und 43622 – 43639 (2), also wenige Basenpaare up bzw. downstream der vermeintlich repetitiven Region (durch rote Felder markiert) am 3' und 5'-Ende der Phagen-DNA, lokalisiert. 1 = Primer phi067-left-End-1; 2 = Primer phi067-right-End-1. (B): Die Amplifikat repräsentierende Bande hat im Agarosegel eine ungefähre Größe von ca. 540bp (Pfeil). Darüber liegende Banden repräsentieren unspezifische Amplifikate.

Da festgestellt werden konnte, dass es sich bei der von GATC angenommenen und von uns untersuchten DNA-Region offenbar nicht um terminal redundante Endstrukturen handelt, sollte nun auf kohäsive Enden („cos-sites“) untersucht werden. Kohäsive Enden führen zu Konkaterisierung der DNA, wobei es allerdings nicht zu einem Ringschluss unter kovalenter Verknüpfung der DNA kommt, sondern lediglich zu einem Ringschluss der auf Basenpaarung der überhängenden „cos-sites“ basiert. Demzufolge ist eine Trennung dieser Form von DNA-Enden durch eine Erhitzung möglich.

Nach Hydrolyse der phiE067-DNA mit *EcoRI* und einer anschließenden 10 min/80°C Behandlung und sofortiger Abkühlung auf Eis konnte beobachtet werden, dass die *EcoRI*-Fragmente in Position 39434 – 42192 (2,758 kb) und 7437 – 8167 (730 bp) fast vollständig aus dem Restriktionsmuster verschwanden (s. Abb. 3-10, Spur 4). Ein zusätzliches Fragment, bei ca. 1,1 kb, konnte nach dieser Behandlung detektiert werden. Logischerweise sollte beim Zerfall des 2,758 kb großen Fragments in ein ca. 1,1 kb großes Fragment ein weiteres einer Größe von ca. 1,65 kb entstehen. Dieses Fragment konnte im Agarosegel aber nicht detektiert werden. Möglich ist, dass es von dem *EcoRI*-Fragment bei 1,621 kp verdeckt wurde. Zwei neue Fragmente nach Erhitzung der DNA, die das 730 bp große Fragment repräsentierten, konnten nicht detektiert werden. Durch Behandlung mit T4-Ligase vor der Restriktion konnte sowohl das 2,758 kb als auch das 730 bp große *EcoRI*-Fragment stabilisiert werden, so dass

diese in diesem Fall nach der 10 min/80°C Behandlung erhalten blieben und deutlich im Agarosegel zu sehen waren (s. Abb. 3-10, Spur 1 und 2).

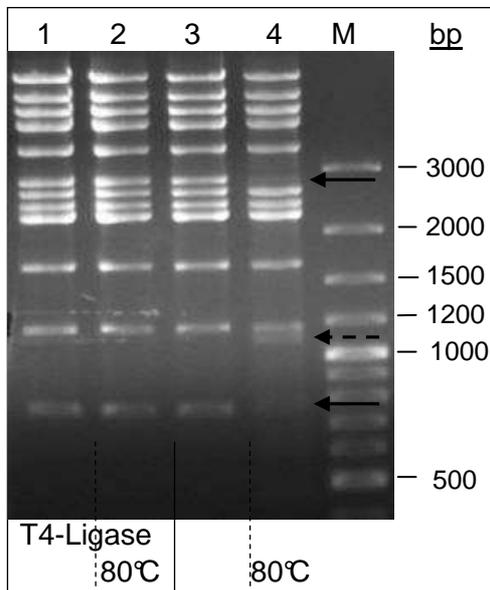


Abb. 3-10: *EcoRI*-Restriktionsanalyse der *phiE067* DNA, zur Detektion des „cos-sites“-enthaltendem *EcoRI*-Fragment im *phiE067*-Genom. M = Marker 100bp+; 1 = T4-Ligase behandelt + *EcoRI*; 2 = wie Spur1 +80°C/10min-Behandlung; 3 = nur *EcoRI*; 4 = *EcoRI*+80°C/10min-Behandlung. Schwarze Pfeile markieren die fehlenden *EcoRI*-Fragmente (2,758 kb und 730 bp); der gestrichelter Pfeil markiert ein neu auftretendes Fragment bei ca. 1,1 kb.

Diese Beobachtungen deuteten darauf, dass die DNA-Endstrukturen des Phagen *phiE067* „cos-sites“ aufweisen, die sich innerhalb der Region des 2,758 kb großen *EcoRI*-Fragments in Position 39434 – 42192 oder des 730 bp großen *EcoRI*-Fragments in Position 7437 – 8167 befinden. Zur Analyse dieser Annahme wurden Sequenzierungen der Genomregionen der Fragmente mit den Primern *phi067*-Analyser-A', -A, -B, -C, -D und -D' sowie den Primern *phi067*-Analyser-X und -Y vorgenommen (s. Abb. 3-11). Im Falle vorkommender „cos-sites“ sollte bei der Sequenzierung ein plötzlicher Sequenzabbruch auftreten. Die Resultate vieler Wiederholungen der kompletten Sequenzierung der beiden Regionen der *EcoRI*-Fragments ergaben allerdings immer eine durchgehende Sequenz (Daten nicht gezeigt). Somit konnte per Sequenzierung nicht bestätigt werden, dass es sich bei einem dieser Fragmente um ein „cos-sites“ tragendes Fragment handelte.

Die „cos-sites“ der *Burkholderia* Phagen *phiE125* und *phi1026b* befinden sich nur wenige Basenpaare aufwärts des Gens, kodierend für die große Terminase Untereinheit. Wegen der ähnlichen Genomorganisationen des Phagen *phiE067* mit diesen *Burkholderia* Phagen (siehe dazu auch Punkt 3.8.2 und Abb. 3-13) wurde zusätzlich die Region um ORF48 im *phiE067*-Genom, der für die große Untereinheit der Terminase kodiert, mit den Primern *phi067*-

Analyser-T1 - T12 sequenziert. Auch hier konnte in mehreren Wiederholungen eine durchgehende Sequenz erzeugt werden, die an keiner Position einen Abbruch aufwies. In Abb. 3-11 ist das phiE067-Genom in seiner Gesamtheit mit allen identifizierten ORFs und den genauen Lokalisationen der überprüften Genomregionen (rot markiert) dargestellt. Die exakte Lokalisation der Phagenendstrukturen von phiE067 konnte somit nicht bestimmt werden.

Wegen der Schwierigkeiten, die tatsächlichen Phagenendstrukturen zu identifizieren, wurde Anfang und Ende des Genoms so gewählt wie von GATC Biotech vorgegeben. Auch die Nummerierung der ORFS wurde anhand der Vorgabe von GATC Biotech vorgenommen.

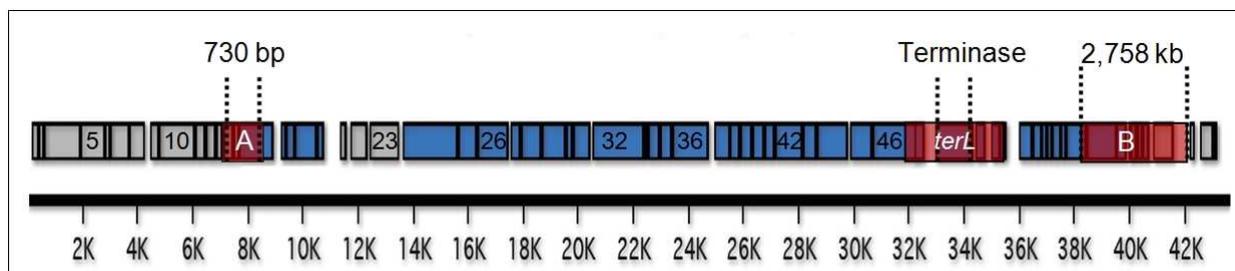


Abb. 3-11: Genetische Karte des phiE067 Genoms (43,649 kb) und Analyse putativer Phagenendstrukturen. Der untere schwarze Balken repräsentiert das gesamte Genom von phiE067 mit Größenangabe (hier K in kb). Die Kästchen (teilweise mit ORF-Nummerierung) oberhalb des schwarzen Balken symbolisieren ORFs des „+“ (grau) - und des „-“ (blau) -DNA-Stranges. Die rot markierten Bereiche kennzeichnen die Genomregionen, die durch Sequenzierung überprüft wurden. Die gepunkteten Linien markieren *EcoRI* Restriktionsstellen bzw. Start und Stop des Terminase Gens (*terL*). Über den rot markierten Regionen ist die Größe der *EcoRI*-Fragmente angegeben. A = 730 bp *EcoRI*-Fragment in Position 7437 – 8167; B = 2,758 kb *EcoRI*-Fragment in Position 39434 – 42192. *terL* = ORF kodierend für die große Terminase-Untereinheit in Position 32989 – 34371.

3.8.2 Eigenschaften und Organisation des phiE067 Genoms

Durch die Sequenzierung und anschließende Untersuchungen (s. 3.8) wurde eine Gesamtlänge des Phagen phiE067 von 43,649 kb festgestellt. Der GC-Gehalt liegt mit 64,44% etwas niedriger als der durchschnittliche Wert des *B. thailandensis*-Genoms mit 69,3% [3]. In der 43,649 kb großen Sequenz konnten mit Hilfe von „Genemark.hmm“ (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>) 69 potentielle ORFs identifiziert werden, die 91,6% der Sequenz abdecken (s. Abb. 3-12). Sieben ORFs weisen GTG als Startcodon auf, sechs ORFs TTG, alle anderen haben ATG als Startcodon. Die Orientierung der ORFs des phiE067-Genoms lässt darauf schließen, dass es in mindestens vier Operons eingeteilt ist (s. Abb. 3-12). Am Start der jeweiligen Operons konnten Promotorsequenzen des *E. coli* Typs σ^{70} mit Hilfe des Programms BPROM festgestellt werden (s. 2.9.2). Die Detektion von

Ribosomenbindungsstellen nach den Regeln von Stormo [147] ist in die Funktion von „Genemark.hmm“ integriert und erfolgte automatisch bei der Identifikation der ORFs.

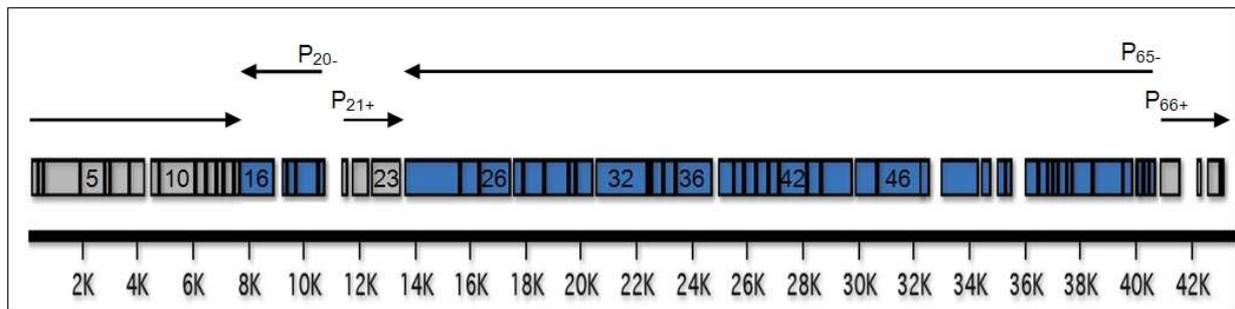


Abb. 3-12: Genetische Karte des phiE067 Genoms (43,649 kb). Der untere schwarze Balken repräsentiert das gesamte Genom von phiE067 mit Größenangabe (hier K in kb). Die Kästchen (teilweise mit ORF-Nummerierung) oberhalb des schwarzen Balken symbolisieren ORFs des „+“- und des „-“-DNA-Stranges. Die Pfeile über den ORFs stellen die vermutlichen transkriptionellen Einheiten mit dem jeweiligen Promotor (P_x) dar (siehe auch Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Putative Promotoren und Transkriptionsfaktoren der phiE067 Genomsequenz.

Promotor	Lage	Sequenz (-30 Region; -10 Region)	Transkriptionsfaktoren (Bindungssequenz; Position)
P_{20-}	11103 - 11086	<u>CGTTAA</u> -N ₁₇ - <u>ATTTGACC</u>	-
P_{21+}	11109 - 11141	<u>TTGAAA</u> -N ₁₈ - <u>CGGTCAAAT</u>	rpoD17 (AAATCAGA; 11112)
P_{65-}	40822 - 40795	<u>TTGAAA</u> -N ₁₃ - <u>GGATACAAT</u>	-
P_{66+}	40828 - 40858	<u>TCGTAA</u> -N ₁₅ - <u>TAATAGAAT</u>	rpoD18 (TTGCTTTT; 40812) ihf (GCTAATAG; 40847)

Die Identifikation erfolgte durch Homologie-Vergleiche zu *E. coli*-Promotoren des Typs σ^{70} nach dem Algorithmus von Mulligan et al. [114] mit Hilfe des Programmes Bprom (s. 2.9.2). Die möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden ebenfalls mit Hilfe von BPROM ermittelt. rpoD = “RNA polymerase, σ^{70} (sigma D) factor”; ihf = “integration host factor”

Um die Genom Organisation mit anderen Phagen besser vergleichen zu können, wurde das phiE067-Genom in der Abb. 3-13 mit der großen Terminase Untereinheit (ORF48) voran skizziert. Die Genanordnung des Phagen phiE067 entspricht einem typischen mosaiken Genom, ähnlich den lambdoiden Phagen. Beim Vergleich des Genoms von phiE067 mit dem Coliphagen Lambda (GI:215104) und den *Burkholderia* Phagen phiE125 (GI:17484022), phi1026b (GI:38505382), BcepGomr (GI:145321088) und Bcep176 (GI:76885811) wird die Konservierung der strukturellen Genanordnung deutlich. Sowohl bei dem Myophagen phiE067 als auch bei den nicht-kontraktile, geschwänzten Siphophagen folgen auf die Strukturgene kodierend für Phagenkopffproteine die der Phagenschwanzproteine. Daran schließen Gene, deren Produkte den Lyseapparat zur Wirtszellyse stellen. Daraufhin folgen Gene, die an Integration und Lysogenie-Regulation (z. B. Repressor, Integrase und

Transkriptionsregulator) beteiligt sind. Im letzten Abschnitt, in der Abb. 3-13 auf der rechten Seite dargestellt, sind Gene vorhanden, die für Proteine der Replikation des Genoms kodieren. Im Gegensatz zu den anderen *Burkholderia* Phagen weist phiE067 allerdings keine Gensequenz-Homolgien zu Lambda auf. Auf die einzelnen ORFs wird in den nachfolgenden Abschnitten unter Punkt 3.8.3 näher eingegangen.

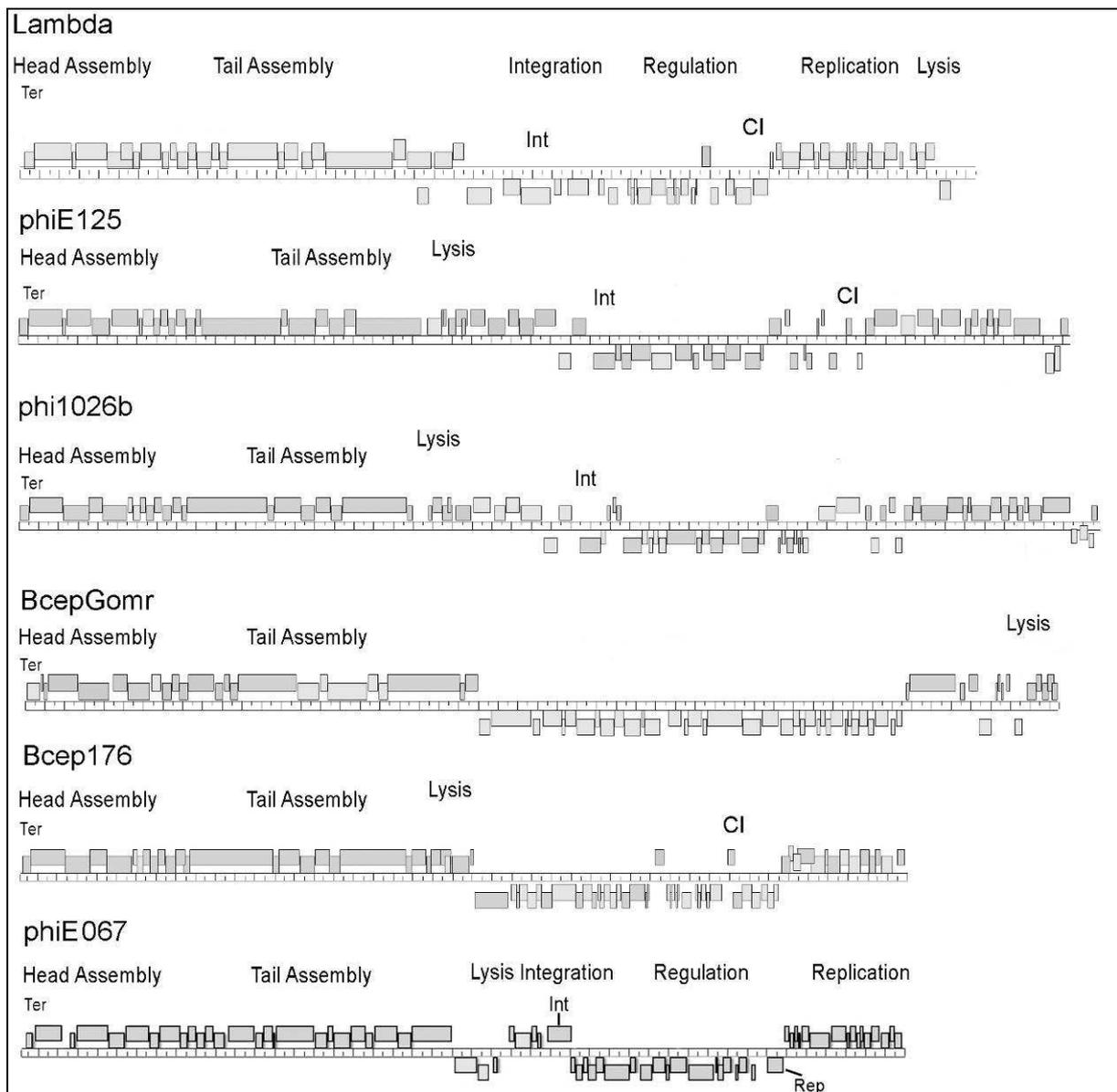


Abb. 3-13: Genetische Karten des Coliphagen Lambda, phiE125, phi1026b, BcepGomr, Bcep176 und phiE067 im Vergleich. Verdeutlicht wird die konservierte lambdaoide Genanordnung von phiE067 im Vergleich zu Lambda und den *Burkholderia* Phagen. Transkriptionsorientierung auf „+“ und „-“ Strang werden durch die Position der Kästchen oberhalb bzw. unterhalb der Linie dargestellt. Ter = Terminase; Int = Integrase; Rep = Phagenrepressor; CI = Phagenrepressor. Abbildung modifiziert nach: Summer et al. 2007 [151].

3.8.3 Bioinformatische Analyse der phiE067 Genprodukte

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der 69 identifizierten ORFs wurden mit der Datenbank von NCBI mit Hilfe der Blast-Funktion verglichen, um Homologien zu Genen bekannter Funktion zu detektieren. Von den 69 ORFs weisen 36 signifikante Homologien zu bekannten Proteinen oder Genprodukten der NCBI-Datenbanken auf, 21 sind homolog zu hypothetischen Proteinen und 12 haben keine signifikante Homologie zu bisher bekannten oder hypothetischen Proteinen (s. auch Tab. 6-3 im Anhang). Die signifikanten Homologien zu anderen Proteinen und eine funktionelle Zuordnung sind in Tab. 3-6 aufgelistet und in Abb. 3-14 dargestellt. Die Resultate der 19 ORFs, bei denen eine funktionelle Zuordnung möglich war, sind detaillierter in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

Bei der DNA-Hybridisierung (s. 3.7.2) konnten keine Homologien des phiE067 Genoms zum Genom des *B. mallei* spezifischen Phagen phi1026b [49], der zur Diagnostik von *B. mallei* eingesetzt werden kann, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte durch die Analyse mit Hilfe der Datenbank-Vergleiche von NCBI weitgehend bestätigt werden. Die einzigen signifikanten Homologien, die zu diesem Phagen und zu dem ebenfalls veröffentlichten Phagen phiE125 [179] gefunden werden konnten, sind in ORF9 [gp46 (*Burkholderia* Phage phi1026b)] und ORF10 [gp38 (Phage phiE125)] lokalisiert (s. auch unten).

Tab. 3-6: Offene Leserahmen (ORF), potentielle Funktionen und signifikante Homologien der Aminosäuresequenzen des phiE067 Phagen-Genoms.

ORF Nr.	Start – Stop	Größe (AS)	Potentielle Funktion	Signifikante Homologien
5	1977 – 2828	284	Transkriptionsregulator	transcriptional regulator, Fis family [<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222]
7	3021 – 3701	227	Endonuklease	phage-type endonuclease [<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060]
9	4481 – 4825	115	-	gp46 [<i>Burkholderia</i> phage phi1026b]
10	4822 – 6117	432	-	gp38 [<i>Bacteriophage</i> phiE125]
15	7514 – 7732	73	Transkriptionsregulator	prophage CP4-57 regulatory protein (AlpA) [<i>Burkholderia pseudomallei</i>]
16	7701 – 8948	416	Integrase	Integrase [<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 13177]
19	9729 – 10547	273	Endolysin	Phage-related lysozyme [<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668]
20	10528 – 10821	98	Holin	-
22	11782 – 12381	200	Lipase (GDSL-Familie)	lipolytic protein G-D-S-L family [<i>Burkholderia phymatum</i> STM815]

Tab. 3-6 (Fortsetzung): Offene Leserahmen (ORF), potentielle Funktionen und signifikante Homologien der Aminosäuresequenzen des phiE067 Phagen-Genoms.

ORF Nr.	Start – Stop	Größe (AS)	Potentielle Funktion	Signifikante Homologien
23	12449 – 13519	357	Acetyltransferase	acetyltransferase [<i>Burkholderia pseudomallei</i> DM98]
24	13656 – 15659	668	Schwanzfiber	tail fiber protein [<i>Burkholderia</i> phage BcepNY3]
25	15694 – 16353	220	-	gp32 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781] <i>Enterobacteria</i> phage T1]
26	16354 – 17535	394	Basalplatte	putative baseplate protein [<i>Pseudomonas</i> phage SN]
27	17601 – 17951	117	-	gp53 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep1]
28	17951 – 18706	252	Basalplatte	phage P2 baseplate assembly protein gpV [<i>E. coli</i> 53638]
29	18696 – 19565	290	-	gp38 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
30	19562 – 19864	101	-	gp50 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
31	19864 – 20481	206	-	gp45 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
32	20540 – 22408	623	Schwanzstruktur Protein („tale tape measure protein“)	Phage-related tail protein [<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H]
35	23023 – 23427	136	-	gp03 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
36	23468 – 24778	437	-	gp04 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
37	24968 – 25513	182	-	BcepNY3gp04 [<i>Burkholderia</i> phage BcepNY3]
38	25521 – 25910	130	-	gp06 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
39	25907 – 26368	154	-	gp07 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep1]
40	26355 – 26777	141	-	gp08 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep1]
41	26777 – 27184	136	-	gp09 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep1]
42	27186 – 28196	337	Großes Kapsid Protein	major capsid protein [<i>Burkholderia</i> phage BcepNY3]
43	28193 – 28669	159	-	gp13 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
44	28682 – 29836	385	-	gp14 [<i>Burkholderia cepacia</i> phage Bcep781]
45	29898 – 30707	270	Phagen Kapsid Protein	head protein [<i>Burkholderia</i> phage BcepNY3]
46	30707 – 32338	544	Kleines Kapsid Protein	minor head protein-like protein [<i>Burkholderia ambifaria</i> phage BcepF1]
48	32989 – 34371	461	Terminase (Große UE)	phage large terminase subunit [<i>Salmonella</i> phage E1]
50	34986 – 35315	110	-	p26 [<i>Burkholderia pseudomallei</i> Pasteur 52237]
51	35331 – 35564	78	-	Bcep22gp19 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep22]
52	35561 – 36034	158	Transkriptionsfaktor (ERF)	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF protein [<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4]
53	36037 – 36525	163	Rekombinase	endodeoxyribonuclease RusA [<i>Burkholderia phymatum</i> STM815]
66	40864 – 41625	254	Repressor	putative phage repressor [<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616]

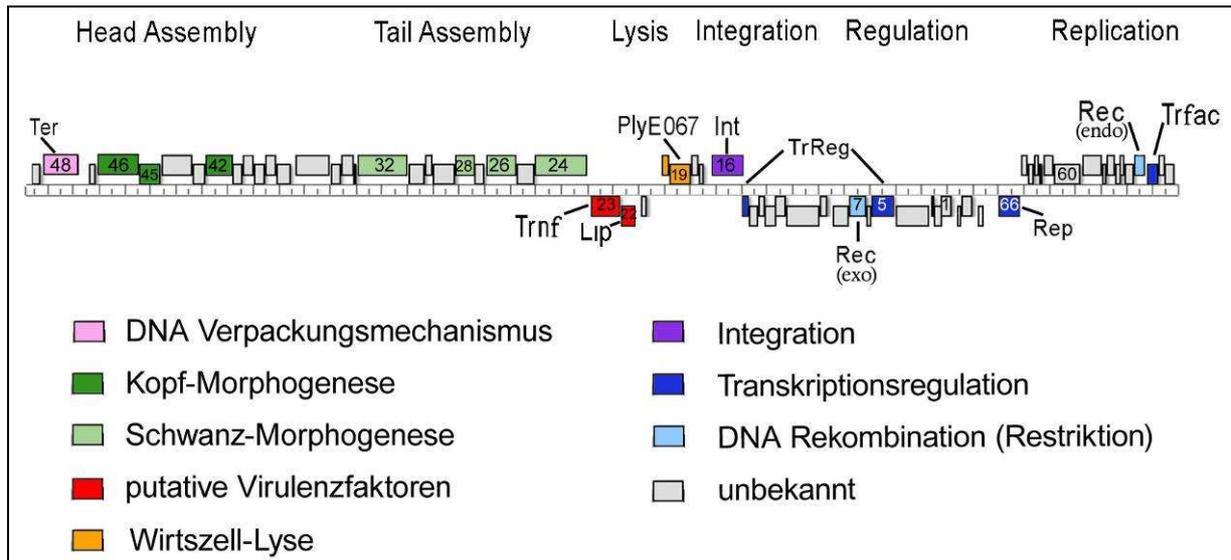


Abb. 3-14: Genetische Karte von phiE067 und ORF-Funktionszuordnung. Das phiE067-Genom ist hier mit der großen Terminase Untereinheit (ORF48) voran skizziert. Transkriptionsorientierung auf „+“ und „-“ Strang werden durch die Position der Kästchen oberhalb bzw. unterhalb der Linie dargestellt. Int = Integrase; Lip = Lipase; PlyE067 = Endolysin (s. auch 3.8.3.6); Rec = Rekombinase (Endo- bzw. Exonuklease); Rep = Phagenrepressor; Ter = Terminase; Trfac = Transkriptionsfaktor; Trnf = Acetyltransferase; TrReg = Transkriptionsregulator.

3.8.3.1 ORF5

Das Genprodukt des ORF5 (Gp5) zeigt eine zu 46% identische Aminosäuresequenz zu einem Transkriptionsregulator der Fis Familie von *Paracoccus denitrificans* PD1222 [38]. Außerdem weist das Protein eine sehr ähnliche Sequenz (87%) zu einem hypothetischen Phagen Protein unbekannter Funktion von *Burkholderia cenocepacia* J2315 [75] auf.

3.8.3.2 ORF7

Eine signifikante Similarität (38%) in der Aminosäuresequenz besteht z. B. zu der Endonuklease „phage-type endonuclease“ von *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 [107], aber auch zu verschiedenen Exonukleasen unterschiedlichen Ursprungs. Die größte Ähnlichkeit besteht zu einem hypothetischen Phagen Protein unbekannter Funktion von *Burkholderia cenocepacia* J2315 [74]. Des Weiteren wurde eine YqaJ Domäne [163] gefunden, welche in vielen bakteriellen Spezies gefunden wird, aber von viralem Ursprung ist. Proteine mit dieser Domäne fungieren als Exonukleasen, die doppelsträngige DNA in einer Mg^{2+} abhängigen Reaktion hydrolisieren und stellen eine Funktionseinheit einer viralen Rekombinase dar [163].

3.8.3.3 ORF9, ORF10

Gp9 ist das einzige putative Protein, welches mit 32% Sequenzidentität Homologie zu einem Protein des Phagen phi1026b [49] aufweist. Die höchste Ähnlichkeit besteht mit 84% zu einem uncharakterisierten Protein (gp46) von *Burkholderia multivorans* CGD2M. ORF10 kodiert ein Protein, das eine 48%ige Sequenzhomologie zu dem hypothetischen Protein gp38 des Bakteriophagen phiE125 [179] hat. Beiden Proteinen konnte anhand der Homologievergleiche mit der NCBI-Datenbank keine Funktion zugeordnet werden.

3.8.3.4 ORF15

ORF15 kodiert wahrscheinlich für einen Transkriptionsregulator. Ähnlichkeiten zu einem regulatorischen Prophagen Protein („CP4-57 regulatory protein“ (AlpA) [*Burkholderia pseudomallei*]) [48] von bis zu 84% konnten gefunden werden. In der Sequenz des Proteins wurde in der N-terminalen Region (As 1 – 51) eine AlpA Domäne identifiziert, die an der Transkriptionsregulation beteiligt ist [160].

3.8.3.5 ORF16

Die Aminosäuresequenz des vom ORF16 kodierten Proteins hat eine 92%ige Ähnlichkeit mit dem Integraseenzym von *Burkholderia pseudomallei* NCTC 13177 [126]. Viele weitere bei NCBI gefundene Homologien deuten auf eine virale Herkunft. Die identifizierte INT-P4 Domäne in der Region der 15. – 370. Aminosäure ist eine dem Phagen P4 ähnliche Integrase, die u.a. in temperenten Phagen gefunden werden kann [175]. Die untersuchte Sequenz weist zusätzlich sechs von sechs „active sites“ im C-terminalen Bereich auf, welche für die Aktivität des Proteins verantwortlich sind und somit sehr wahrscheinlich für die ortsspezifische Rekombination des Phagen phiE067 in das Wirtsgenom benötigt werden.

3.8.3.6 ORF19

Das Produkt dieses Gens hat eine 88%ige Sequenzähnlichkeit mit dem Phagen-Lysozym von *Burkholderia pseudomallei* 668 [48]. Viele weitere signifikante Homologien, die mit Hilfe der Datenbank von NCBI gefunden werden konnten, deuten ebenfalls auf eine Funktion als Phagen-Lysozym hin. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Identifikation einer Endolysin-Domäne ([168], PF00959) im Bereich der 77. – 260. Aminosäure der 272 Aminosäuren langen Sequenz (s. Abb. 3-15) mit Hilfe der Pfam-Datenbank. Die Sequenz enthält die beiden für diese Domäne charakteristischen katalytischen Reste im N-terminalen Bereich des Proteins. Entsprechend den bioinformatischen Analysen handelt es sich hierbei

wahrscheinlich um eine N-Acetyl- β -D-Muramidase. Phagen-Lysozyme oder Endolysine, haben die Funktion, die Peptidoglykanschicht am Ende des Phagen-Reproduktionszyklus zu hydrolisieren und somit die Phagen freizusetzen. Eine Infektion weiterer Zellen durch die freigesetzten Phagen wird so ermöglicht.

Das beschriebene Endolysin-Gen, im Folgenden mit *plyE067* benannt, wurde kloniert und die Funktion des Produktes PlyE067 experimentell bewiesen (s. 3.9.1).

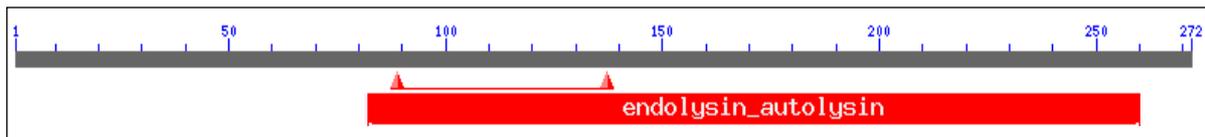


Abb. 3-15: Lokalisation der Endolysin-Domäne in der Aminosäuresequenz des phiE067 Lysins, PlyE067. Die Größe des Proteins (in AS) ist mit blauen Zahlen gekennzeichnet, die Lokalisation der Endolysin-Domäne durch den roten Balken, die katalytischen Reste sind durch rote Dreiecke markiert.

3.8.3.7 ORF20

Für ORF20 konnten zwar keine Homologien gefunden werden, aufgrund von Untersuchungen der Aminosäuresequenz konnten aber signifikante strukturelle Homologien mit bekannten Holinen identifiziert werden. Nach einer Analyse mit den Programmen „TMpred“ und „TMHMM“ (s. 2.9.2) konnten zwei Transmembrandomänen von der 21. – 43. und 58. – 78. Aminosäure mit hoher Hydrophobizität in der Struktur von Gp20 detektiert werden, was darauf hindeutet, dass es sich um ein Klasse II Holin handelt (s. Abb. 3-16). Die Lokalisation direkt abwärts von ORF19, das für ein Lysin kodiert, lässt weitergehend vermuten, dass es sich bei Gp20 um das phiE067 Holin handelt. Holine katalysieren die Ausbildung von Poren in der cytoplasmatischen Zellmembran, wodurch den Endolysinen ermöglicht wird, diese zu passieren, um zur Peptidoglykanschicht vorzudringen.

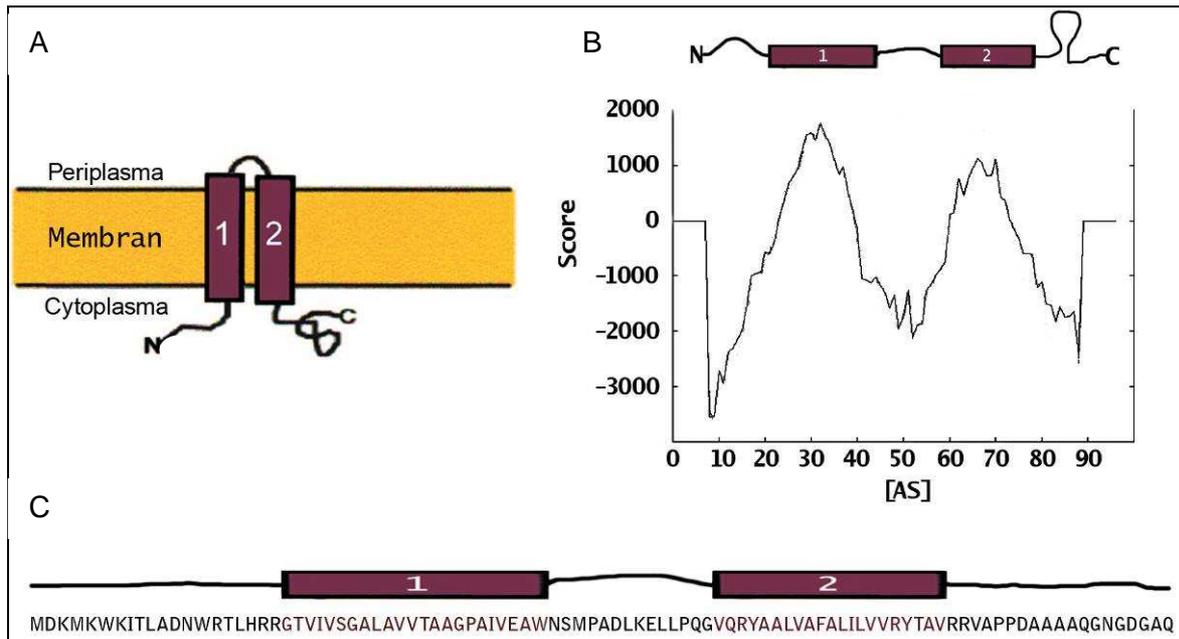


Abb. 3-16: Darstellung des putativen phiE067 Holin. (A): Gezeigt ist die mögliche Anordnung des Holins mit den beiden Transmembrandomänen (1 und 2), einem mittleren Bereich der ins Periplasma ragt und den N- und C-terminalen Bereichen, die ins Cytoplasma ragen. (B): Vorhergesagtes Model der Transmembran-Topologie (mit „TMpred“). Werte über 500 deuten signifikant auf eine Transmembran-Domäne hin. AS = Aminosäure. (C): Lokalisation der Transmembrandomänen in der Aminosäuresequenz von GP20.

3.8.3.8 ORF 22

Die größte Homologie von Gp22 besteht zu einem hypothetischen Protein unbekannter Funktion von *B. pseudomallei* DM98 mit einer zu 88% identischen Sequenz. Viele weitere signifikante Homologien deuten darauf hin, dass es sich bei dem Protein um ein lipolytisches Enzym der GDSL-Familie handelt [9]. Eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von 35% konnte u.a. zu einem lipolytischen Protein („lipolytic protein G-D-S-L family“ [*Burkholderia phymatum* STM815]) [37] gefunden werden. Es konnte auch eine Domäne der SGNH Hydrolase in der Region der 45. – 234. Aminosäure identifiziert werden. Zur Familie der GDSL-Hydrolasen gehören sowohl Esterasen als auch Lipasen [9]. Lipasen stellen putative Virulenzfaktoren dar [138].

3.8.3.9 ORF23

Die gefundenen Homologien lassen vermuten, dass das kodierte Protein eine Acetyltransferase darstellt. Acetyltransferasen sind Enzyme, die am Lipidmetabolismus beteiligt sind. Die größte Homologie mit einer Sequenzähnlichkeit von 87% besteht zu einer putativen Acetyltransferase des *Burkholderia*-Phagen Bups phi1 [55]. Viele weitere Homologien zeigen ebenfalls, dass es sich bei der untersuchten Sequenz wahrscheinlich um ein Protein der genannten Funktion handelt. Zusätzlich wurde eine Acetyltransferase-Domäne

entdeckt, die in der Region der 39. – 153. Aminosäure lokalisiert ist. Acetyltransferasen stellen putative Virulenzfaktoren dar [10].

3.8.3.10 ORF24

Das von ORF24 kodierte, 678 Aminosäuren große Protein ist vermutlich ein Schwanzstrukturprotein des Phagen phiE067. Es hat die größte Homologie (86%) zu einem hypothetischen Protein BpseD_41531 von *B. pseudomallei* DM98 [126]. Viele andere Treffer der NCBI Datenbank zeigen, dass das Protein als Schwanzfiber fungieren könnte. Die Aminosäuresequenz hat eine ebenfalls 86%ige Ähnlichkeit mit dem putativen Schwanzstrukturprotein des Phagen Bups phi1 [55] und 48% Ähnlichkeit mit dem Schwanzfiber Protein des *Burkholderia*-Phagen BcepNY3 [154].

3.8.3.11 ORF26

Gp26 hat u.a. signifikante Homologien zu einem putativen Protein der Phagen-Basalplatte („putative baseplate protein“ [YP_002418850] [*Pseudomonas* phage SN]) und ist damit als Strukturprotein einzuordnen. Im N-terminalen Bereich konnte eine “Baseplate J-like” Domäne identifiziert werden, die diese Annahme unterstützt.

3.8.3.12 ORF28

Das Genprodukt von ORF28 (Gp28) stellt mit hoher Wahrscheinlich ein Baustein der Basalplatte des Phagen phiE067 dar. Es besteht eine Aminosäuresequenz-Homologie von 37% zu dem „phage P2 baseplate assembly“-Protein gpV von *E. coli* 53638 [ZP_02998990]. Homologien zu Proteinen, welche als Bausteine von Basalplatten vieler anderer Phagen fungieren, konnten identifiziert werden.

3.8.3.13 ORF32

Das Produkt von ORF 32 kodiert für ein sehr großes Protein mit 622 Aminosäuren und mit Homologie (26% der Sequenz) zu einem Schwanzstrukturprotein („putative tail length tape measure protein“) des *Xanthomonas*-Phagen OP2 [YP_453651].

3.8.3.14 ORF42

Die Aminosäuresequenz weist eine 44%ige Ähnlichkeit zu dem großen Kapsidprotein des *Burkholderia*-Phagen BcepNY3 auf [YP_001294848]. Weitere signifikante Homologien zu

Strukturproteinen anderer Phagen konnten nachgewiesen werden und somit hat Gp42 vermutlich die Funktion des großen Kapsidproteins.

3.8.3.15 ORF45

Ein weiteres Genprodukt (Gp45), das zur Assemblierung des Phagenkopfes beiträgt, ist wahrscheinlich durch ORF45 kodiert. Gp45 hat die größte Sequenz-Homologie (49%) zu dem putativen Protein „putative phage head morphogenesis protein“ von *Klebsiella pneumoniae* 342 [60]. Zu vielen weiteren Strukturproteinen unterschiedlicher Phagen, meistens Bestandteile des Phagenkopfes, z. B. zum Kopfprotein des *Burkholderia*-Phagen BcepNY3 [YP_001294853] oder „minor head protein-like protein“ des *Burkholderia ambifaria*-Phagen BcepF1 [YP_001039807], bestehen ebenfalls signifikante Sequenz-Homologien.

3.8.3.16 ORF46

Gp46 hat, wie auch Gp45, seine höchste Similarität (41%) zu einem hypothetischen Protein KPK_4142 von *K. pneumoniae* 342 [60]. Genauso wurden auch hier weitere Phagenkopf-Strukturproteine als Homologe ausgemacht, z. B. „minor head protein-like protein“ des *B. ambifaria* Phagen BcepF1 [YP_001039807] mit 29% Sequenzsimilarität.

3.8.3.17 ORF48

Gp48 hat seine höchste Similarität (43%) zu der großen Terminase-Untereinheit des *Salmonella*-Phagen E1 („phage large terminase subunit“) [YP_001742039]. Signifikante Homologien zur großen Untereinheit von Terminasen konnten bei vielen weiteren Phagen identifiziert werden. Außerdem konnte eine Terminase 3 Domäne in der Region der 103. – 484. Aminosäure von Gp48 identifiziert werden. Durch Terminasen wird die Verpackung des Phagen-genoms eingeleitet, indem spezifische Restriktionen an den „cos-sites“ in die konkatemerierte Phagen-DNA eingefügt werden [69].

3.8.3.18 ORF52

Das Genprodukt von ORF52 hat Sequenzhomologien (49%) mit einem Transkriptionsfaktor aus *Burkholderia vietnamiensis* G4 („pathogenesis-related transcriptional factor and ERF protein“). Zusätzlich konnte eine AP2 Domäne [169] im C-terminalen Bereich (Aminosäure 99-148) identifiziert werden. Protein-Domänen dieser Art werden in Transkriptionsfaktoren vorgefunden und sind in der Lage, an DNA zu binden [169].

3.8.3.19 ORF53

Gp53 hat eine zu 57% identische Aminosäuresequenz zu der Endodeoxyribonuklease RusA von *Burkholderia phymatum* STM815 [YP_001859609]. In der Region der 9. – 143 Aminosäure konnte eine Domäne der RusA Familie entdeckt werden [109]. Zu dieser Familie gehören „Holliday junction resolvasen“, die durch ihre Nuklease-Aktivität die Holliday-Strukturen lösen und somit eine wichtige Funktion bei der DNA-Rekombination inne haben [14]. Gp53 könnte daher die Funktion einer Rekombinase einnehmen.

3.8.3.20 ORF66

Bei dem durch ORF66 kodierten Protein handelt es sich wahrscheinlich um einen Phagen-Repressor. Die Aminosäuresequenz weist eine 38%ige Sequenzsimilarität zu einem putativen Phagen-Repressor von *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 auf [YP_001580025] auf. Außerdem konnten Ähnlichkeiten zu einem Helix-Turn-Helix Motiv (HTH) (“helix-turn-helix motif:Peptidase S24, S26A and S26B”) von *Xylella fastidiosa* gezeigt werden, welches für die Bindung an DNA benötigt wird [ZP_00683692]. In der Region der 159. – 244. Aminosäure der Sequenz konnte eine LexA-ähnliche Domäne [99] identifiziert werden, die auch die beiden für diese Domäne charakteristischen katalytischen Reste aufweist. Proteine mit der LexA Domäne fungieren während der zellulären SOS-Antwort als Genrepressoren. Nach einer proteolytischen Spaltung dieser Enzyme kann es auch eine Proteaseaktivität entwickeln, die zu einer autokatalytischen Spaltung führt und so alle Operatoren von LexA freisetzt [99].

3.8.3.21 ORF25-27, 29-31, 33-41, 43 und 44

Für diese ORFs konnten keine Homologien zu Proteinen bekannter Funktion gefunden werden. Homologien, die identifiziert wurden, sind von bis zu 44%iger Ähnlichkeit und meist hypothetische Genprodukte der *Burkholderia cepacia*-Phagen Bcep781 [152] und Bcep1 [152]. Auf Grund ihrer Lokalisation im Genom, umgeben von ORFs gleicher Orientierung, die für Strukturproteine kodieren, könnte man annehmen, dass es sich auch bei diesen Proteinen um weitere Strukturproteine handelt.

Für alle weiteren ORFs, die in Tab. 3-6 nicht aufgeführt sind, konnte mit Hilfe der Homologie-Vergleiche der NCBI Datenbank ebenfalls keine Funktionszuordnung erfolgen. Entweder konnten Homologien nur zu hypothetischen Proteinen festgestellt werden oder die Sequenz war gänzlich unbekannt (ORF6, 11, 47, 54, 55, 56, 58, 62, 65, 67, 69). Die Gesamtheit aller ORFs des phiE067 Genoms sind mit Lokalisation, potentieller Funktion

(wenn vorhanden) und signifikanter Homologie (wenn vorhanden) in der Tab. 6-3 im Anhang aufgeführt.

3.9 Identifizierung und funktionelle Charakterisierung putativer Bakteriophagen-Endolysine

Endolysine sind Enzyme, die die Zellwand angreifen und im Endstadium des Phagen-Reproduktionszyklus von innen heraus die Peptidoglykanschicht hydrolisieren können. Neben dieser Tatsache können Endolysine Gram-positive Zellen auch nach exogener Anwendung rapide lysieren [105]. Durch ihre hohe Aktivität und Spezifität sind Endolysine sehr interessant für die Lebensmittelindustrie, die mikrobielle Diagnostik und für die Behandlung von Infektionen. In diesem Abschnitt der Arbeit sollten putative Endolysine der durchsequenzierten Phagen phiE067 und PY100 identifiziert und ihre Wirkung auf Gram-negative Erreger untersucht werden.

3.9.1 Charakterisierung des phiE067 Endolysins PlyE067

3.9.1.1 Identifizierung des Phagenlysins PlyE067

Der *B. thailandensis*-Phage phi067 ist ein temperenter Phage, dessen Wirtsspektrum sich auf die Gattung *Burkholderia* beschränkt. Für die Lyse der Wirtsbakterien ist u. a. das Bakteriophagen-Lysin verantwortlich. Nach der Sequenzierung des Genoms von phiE067 sollte nun das Gen identifiziert werden, welches für ein putatives Bakteriophagen-Lysin kodiert. Das durch dieses Gen kodierte Protein sollte seinerseits bezüglich hydrolytischer Aktivität gegenüber Gram-negativen Erregern untersucht werden.

Nach der Analyse der ORFs des phiE067-Genoms konnte der ORF 19 mit einer Größe von 818 bp als Gen für ein putatives Lysin identifiziert werden. Die Übersetzung in eine Aminosäuresequenz ergab ein Protein mit einer Länge von 272 Aminosäuren, einem MW von 28,06 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,1. Mit Hilfe der blastP-Funktion der NCBI-Hompage konnten signifikante Homologien zu verschiedenen Endolysinen (z. B.: „Phage-related lysozyme“ [*B. pseudomallei* 668; ref-YP_001063329.1]) gefunden werden (s. auch 3.8.3.6). Des Weiteren konnte durch die Pfam-Datenbank im N-terminalen Bereich des Proteins eine Phagen-Lysozym-Domäne (PF00959) mit einer N-Acetyl- β -D-Muramidase Aktivität entdeckt werden, zu dessen Familie unter anderem auch das Endolysin des Phagen T4 [168] gehört (s. auch Abb. 3-15). Das Gen wurde mit *plyE067* bezeichnet, das kodierte Protein entsprechend mit PlyE067. Die Sequenzen und ein Allignment mit einer homologen Aminosäuresequenz sind unter 6.4.1, 6.4.2 bzw. 6.4.3 im Anhang dargestellt.

3.9.1.2 Synthese des rekombinanten PlyE067 in *E. coli* BL21

Das funktionelle, rekombinante, mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-Tag (His-Tag) fusionierte Protein konnte mit Hilfe des Expressionssystems „Champion pET Directional TOPO Expression Kits“ synthetisiert werden. Als Expressionsvektor diente pET200/D-TOPO[®], der in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert wurde. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Die Dokumentation der Synthese erfolgte über einen Zeitraum von 5 Stunden ab der IPTG-Induktion. Die SDS-Page Analyse zeigte, dass PlyE067 nach 2-3 Stunden synthetisiert wurde (s. Abb. 3-17 A). Das erwartete Protein, das mit einem 3 kDa großen His-Tag fusioniert ist, hat ein MW von 31,06 kDa. Die PlyE067 repräsentierende Bande im SDS-Gel lag bei ca. 36 kDa. Mittels Western Blot und Anti-His-Antikörper-Nachweis konnte gezeigt werden, dass es sich um das gewünschte Protein handelt (Daten nicht gezeigt). Eine längere Inkubation hatte keine stärkere Synthese zur Folge, so dass der Zellextrakt 3 Stunden nach IPTG-Induktion über eine Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie aufgearbeitet und aufgereinigt wurde. Eine weitere SDS-Page Analyse zeigte, dass PlyE067 auch nach mehrfacher Wiederholung nicht komplett ohne Kontaminationen von anderen Proteinen aufgereinigt werden konnte (s. Abb. 3-17 B). Diese verunreinigenden Proteinmengen waren aber so gering, dass das Proteinlysat für weitere Versuche eingesetzt werden konnte. Das Protein konnte in einer Konzentration von ca. 50 µg/ml in Tris-HCl Puffer (50mM, pH7) gewonnen werden.

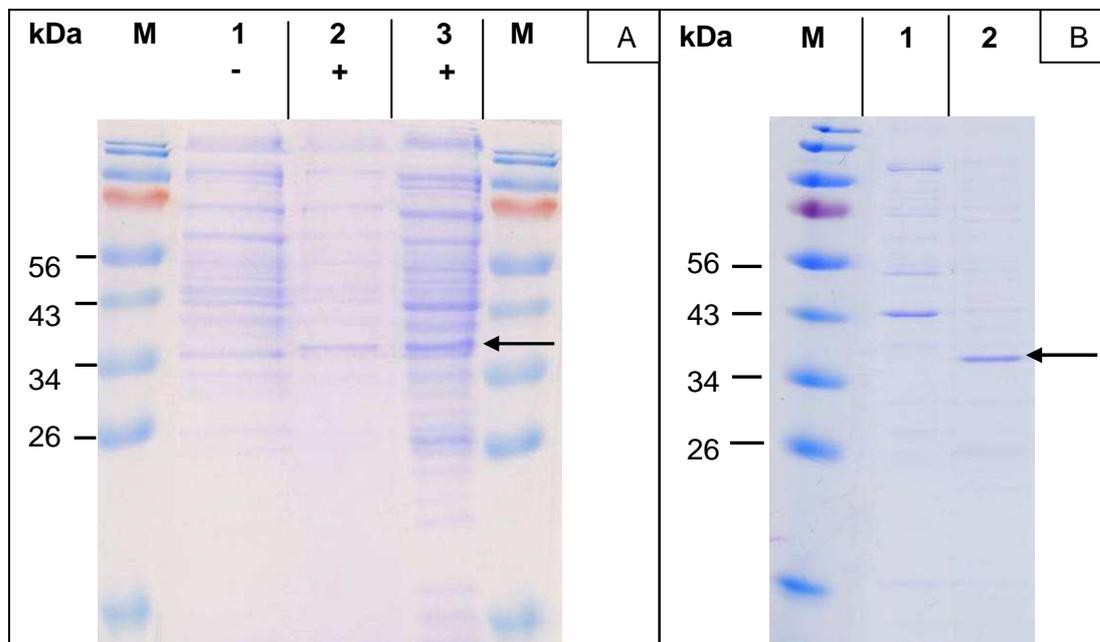


Abb. 3-17: Synthese des rekombinanten Endolysins PlyE067 in *E. coli* BL21 (pet200::plyE067). (A): M = Marker, Spalte 1 = Probe nicht induzierter Kultur (-) 2 Std. nach IPTG-Induktion, Spalte 2 = Probe induzierter Kultur (+) 2 Std. nach IPTG-Induktion, Spalte 3 = Probe induzierter Kultur (+) 3 Std. nach IPTG-Induktion. (B): PlyE067 nach Aufreinigung des Proteins (schwarzer Pfeil) mit Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie. Spalte 1 = Waschfraktion der Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie. Spalte 2 = Ply100 nach Elution und Umpufferung.

3.9.1.3 Lysis-Eigenschaften von PlyE067 / Bakterielle Sensitivität

Für die Sensitivitätsversuche durch enzymatische Lyse wurden bakterielle Zellsuspensionen der 10 *B. thailandensis*-Stämme E049 – E207 mit 500 ng des Isolats von PlyE067 versetzt. Pro Stamm wurden zwei Wiederholungen mit jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Hierbei konnte über einen Zeitraum von 20 min in Mikrotiterplatten-Tests keine Abnahme der OD₆₀₀ beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der gleiche Endolysinassay wurde mit lyophilisierten *Micrococcus lysodeikticus* durchgeführt. *M. lysodeikticus* ist ein Gram-positiver Erreger, der üblicherweise für Lysozymassays als Positivkontrolle verwendet wird. Jedoch konnte auch bei diesen Versuchen keine signifikante Verringerung der OD₆₀₀ gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Eine lytische Wirkung durch PlyE067 auf die untersuchten intakten Burkholderien und *M. lysodeikticus* konnte in diesen Versuchsansätzen nicht gezeigt werden.

Da Lysine die Peptidoglykanschicht angreifen [102] und Gram-negative Bakterien neben dem Peptidoglykan noch eine äußere Membran besitzen, wurden zum weiteren Nachweis der lytischen Eigenschaft des Phagen-Endolysins die Gram-negativen Erreger (*B. thailandensis* E049 – E207 und *E. coli* DH5 α) zur Entfernung der äußeren Membran mit Chloroform behandelt. Anhand der Reduktion der OD₆₀₀ bei dem Lysisassays mit den erzeugten Sphäroblasten konnte lytische Aktivität des Proteins PlyE067 nachgewiesen werden (s. Abb. 3-18). Die *B. thailandensis*-Sphäroblasten waren von der Lyse betroffen, allerdings zeigten die Stämme eine unterschiedlich starke Sensitivität. Am effektivsten wurde der *Burkholderia*-Wirtsstamm des Phagen phiE067 (E067) lysiert. Die OD₆₀₀ zu Beginn des Versuches wurde in einem Zeitraum von 22 min um 61,1% reduziert. Der *Burkholderia*-Stamm E153 wies die geringste Sensitivität auf, so dass eine Reduktion von 24,5% beobachtet werden konnte. Die durchschnittliche Reduktion der OD₆₀₀ lag nach 22 min bei 42,8%. Sphäroblasten des *E. coli*-Stammes DH5 α waren nicht von der Lyse betroffen (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden zwei *B. vietnamensis*-Stämme durch PlyE067 lysiert, womit deutlich gemacht wurde, dass die lytische Aktivität des Enzyms nicht spezifisch gegen eine Spezies, sondern gegen die Gattung *Burkholderia* gerichtet ist (Daten nicht gezeigt).

In allen Lysistests dienten der Puffer, indem das putative Lysin und die Sphäroblasten gelöst vorlagen, und zusätzlich das Proteineluat des Plasmid tragenden Expressionsstammes [BL21(pet200)], das unter gleichen Bedingungen gewonnen wurde wie das jeweilige putative Phagenlysin von BL21(pet200::Lysin), als Negativkontrollen.

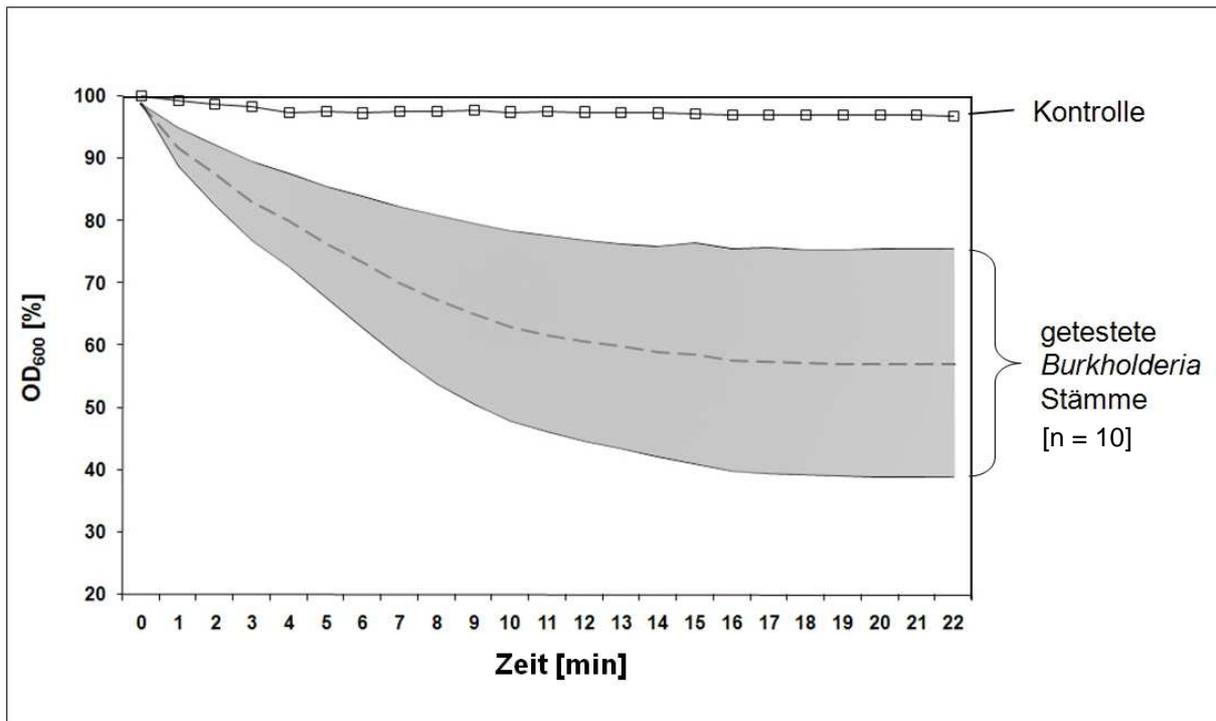


Abb. 3-18: Zusammenfassung der *B. thailandensis*-Lysisassays mit aufgereinigtem PlyE067. Dargestellt ist die Reduktion der optischen Dichten (OD_{600}) gegen die Zeit nach Zugabe von 500 ng des Enzyms zu 10 *B. thailandensis*-Sphäroblastensuspensionen (E049 – E207). Der Kontroll-Assay, *B. thailandensis*-Zellsuspensionen nach Zugabe von PlyE067, ist mit offenen Quadraten gekennzeichnet, die durchschnittliche Zelllyse durch die gestrichelte Linie und die Abweichungen davon durch den grau-schraffierten Bereich. Pro Stamm erfolgten zwei Wiederholungen mit jeweils Doppelbestimmungen.

3.9.1.4 pH-Wert- und Konzentrationsabhängigkeit der enzymatischen Aktivität von PlyE067

Der *B. thailandensis*-Stamm E049 zeigte nach E067, dem Wirtsstamm des Phagen, die stärkste Sensitivität gegenüber PlyE067. Aus diesem Grund wurde E049 für die biochemische Charakterisierung des Lysins herangezogen und nicht der Stamm, aus dem der Phage phiE067 und damit letztendlich auch das Protein PlyE067 gewonnen wurde.

Der pH-Wert ist ein wichtiger Faktor mit einem Starken Einfluss auf die Lysozym-Aktivität [132]. Es wurde sowohl der pH-Wert des Puffers, in dem das Enzym PlyE067 gelöst war, als auch der pH-Wert des Puffers, in dem die Chloroform-behandelten Burkholderien aufgenommen waren, zwischen pH-Wert = 4 und pH-Wert = 8 variiert. In den nachfolgenden Versuchen konnte die Abhängigkeit der lytischen Aktivität des PlyE067 vom pH-Wert gezeigt werden. Bei einem pH-Wert = 7 erfolgte die deutlichste Lyse der Sphäroblasten. Die Reduktion der OD_{600} lag bei 61,7%, verglichen mit dem Anfangswert der OD_{600} des Versuches (s. Abb. 3-19). Bei einem pH-Wert = 6 lag die Reduktion bei 55,7% und bei pH-Wert = 8 war sie mit 53,5% noch geringer. Ein im Vergleich dazu etwas größerer Aktivitätsverlust konnte bei weiter sinkendem pH-Wert gemessen werden. Ein pH-Wert = 5

ließ nur noch eine Reduktion von 39,8% zu und bei einem pH-Wert = 4 zeigte PlyE067 mit 15,1% nur noch schwach lytische Aktivität.

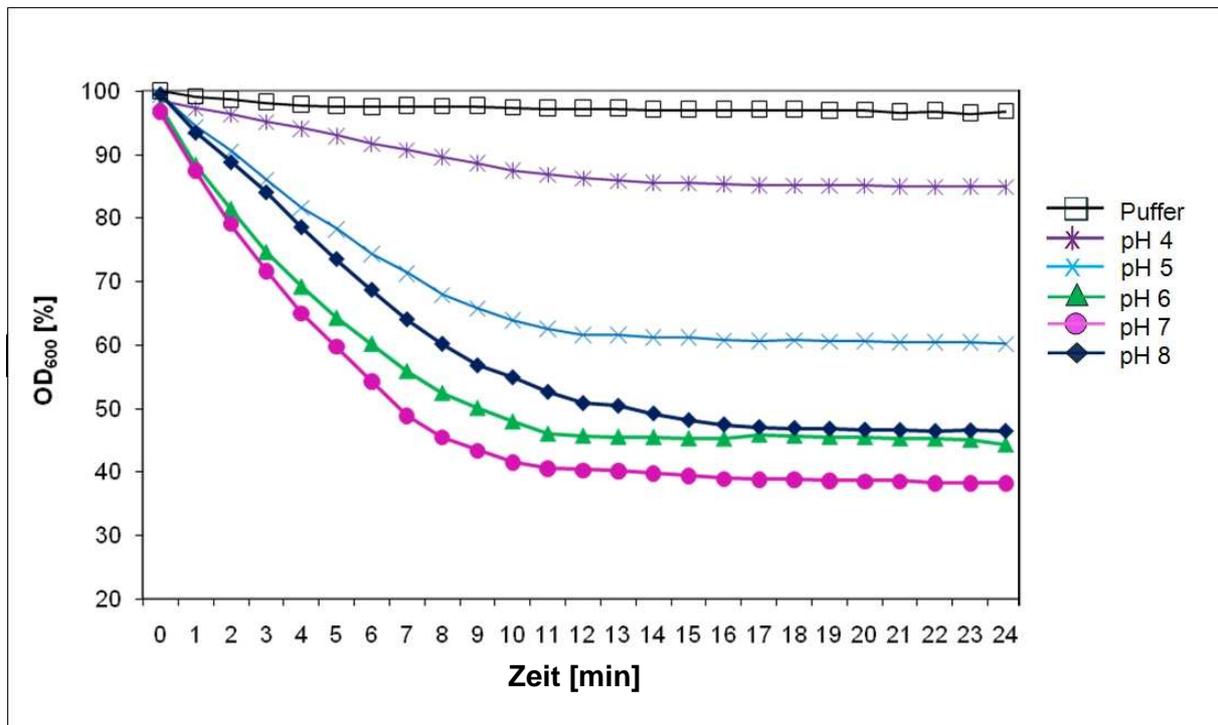


Abb. 3-19: Lytische Aktivität von PlyE067 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Aktivität von PlyE067 (in %) gegen *B. thailandensis* E049 ist dargestellt durch die Reduktion der OD₆₀₀ bei unterschiedlichen pH-Werten.

Endolysine haben eine hohe lytische Aktivität und können oft in geringsten Mengen wirksam werden. Um die lytische Aktivität von PlyE067 in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration festzustellen, wurden Verdünnungen des Enzyms in Tris-HCl (50mM, pH7) angesetzt und in den Lysisassays mit *B. thailandensis* E049 eingesetzt. Beim Einsatz von 1800 ng pro 300 µl Sphäroblasten konnte nach 22 min Testzeitraum eine Reduktion der OD₆₀₀ von 54,9% beobachtet werden (s. Abb. 3-20). Beim Einsatz von 900 ng zeigte sich eine ähnlich starke lytische Aktivität, die mit einer Reduktion von 57,9% sogar noch knapp darunter lag. Allerdings konnte schon bei einer Verringerung der Enzymmenge auf 360 ng eine deutliche Abschwächung der lytischen Aktivität beobachtet werden, so dass nur noch eine Reduktion von 46,8% gemessen wurde. Mit fallender PlyE067 Konzentration verringerte sich auch die lytische Aktivität zunehmend, bei 180 ng lag die Reduktion der OD₆₀₀ bei 37,9% und bei 120 ng noch bei 23,8%. Beim Einsatz von 90 ng konnte keine Sphäroblastenlyse mehr festgestellt werden.

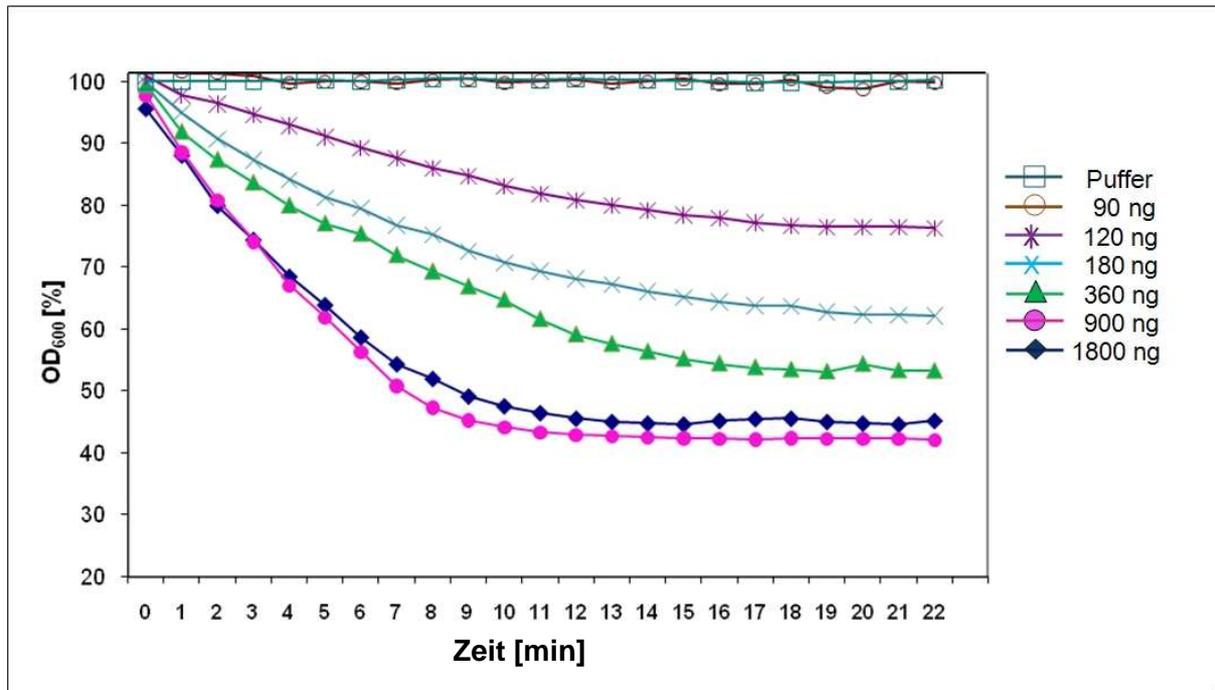


Abb. 3-20: Lytische Aktivität von PlyE067 in Abhängigkeit von der Konzentration. Dargestellt ist die lytische Aktivität anhand der Reduktion der optischen Dichten (OD_{600}) gegen die Zeit nach Zugabe des Enzyms PlyE067 in unterschiedlichen Konzentrationen zu *B. thailandensis* E049-Sphäroblastensuspensionen.

3.9.1.5 Hitzestabilität von PlyE067

Phagen-Endolysine sind nicht dafür bekannt, hitzestabil zu sein. Bei dem T4-Lysozym beispielsweise wird durch eine 5 minütige Behandlung bei 75°C eine komplette Inaktivierung des Enzyms erreicht [155]. Zur Feststellung der Hitzeresistenz von PlyE067 wurde das Enzym bei 99°C für 10, 60 und 120 min erhitzt. Als Versuchsstamm wurde wiederum *B. thailandensis* E049 verwendet. Das Enzym PlyE067 erwies sich als nicht-resistent gegenüber einer Temperatur von 99°C. Schon bei einer 10 minütigen Behandlung war nur noch eine geringe Aktivität zu erkennen. Die Reduktion der OD_{600} belief sich nach 20 min auf gerade 8,4% (s. Abb. 3-21). Nach 60 oder 120 min bei 99°C konnte keine lytische Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (Zugabe von Puffer zu der Sphäroblastensuspension) mehr nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle dagegen mit unbehandeltem Enzym zeigte eine Reduktion in ähnlich starker Intensität wie sie auch schon in vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte. Die Reduktion der OD_{600} lag nach 20 min bei 58%.

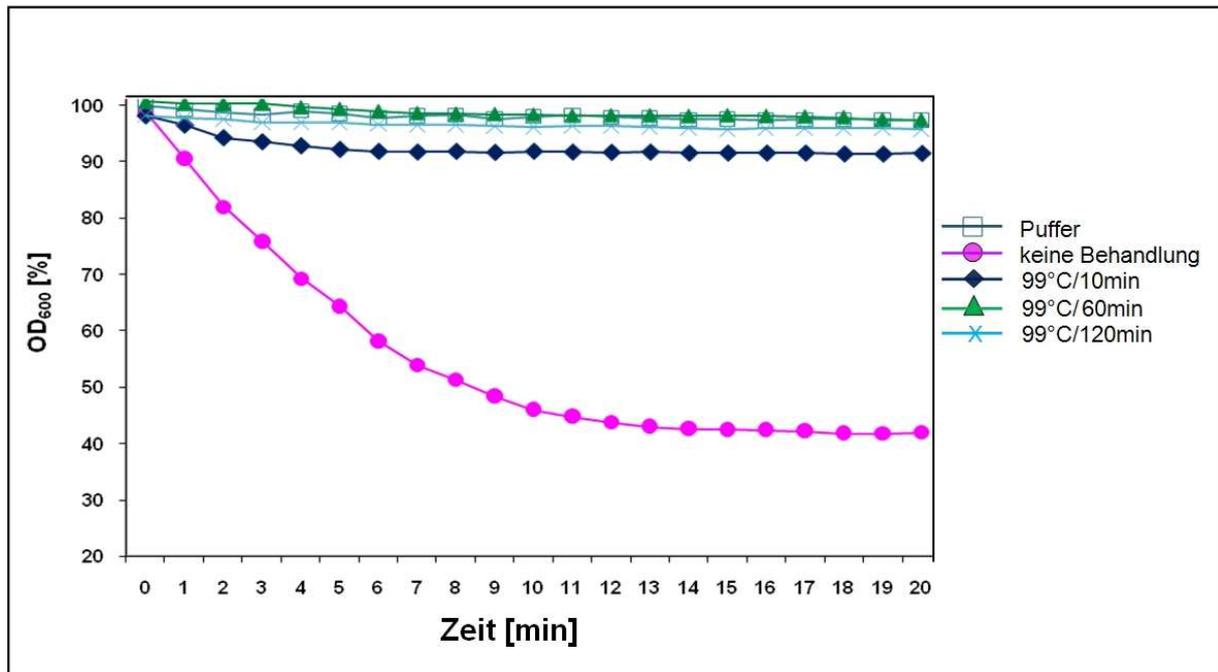


Abb. 3-21: Lytische Aktivität von PlyE067 nach Hitzebehandlung. Dargestellt ist die lytische Aktivität anhand der Reduktion der optischen Dichten (OD_{600}) gegen die Zeit nach Zugabe des bei 99°C für bis zu 120 min hitzebehandelten Enzyms PlyE067 zu *B. thailandensis*-Sphäroblastensuspensionen.

3.9.2 Charakterisierung des PY100 Endolysins Ply100

3.9.2.1 Identifizierung des Phagenlysin Ply100

Wie einleitend beschrieben, handelt es sich bei PY100 um einen lytischen Phagen mit einem breiten Wirtsspektrum in der Gattung von *Yersinia*. U.a. ist der Phage in der Lage, die drei humanpathogenen Spezies der Gattung *Yersinia*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* im Spotttest zu lysieren [140]. Wie zuvor schon für PlyE067 gezeigt (s. 3.9.1.1), sollte auch hier das Gen identifiziert werden, welches für ein putatives Bakteriophagen-Lysin kodiert und das entsprechende Protein bezüglich hydrolytischer Aktivität gegenüber Gram-negativer Bakterien untersucht werden.

Durch die Sequenzierung des Genoms von PY100 [140] konnte der ORF 48 mit einer Größe von 416 bp als Gen für das putative Lysin identifiziert werden (s. Abb. 3-22). Nach Übersetzung der Basensequenz mit dem Programm EditSeq (DNA-Star) in eine Aminosäuresequenz, konnten unter Verwendung der blastP-Funktion der NCBI-Hompage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) signifikante Homologien zu dem Endolysin des Bakteriophagen P7, welcher *Y. pseudotuberculosis* IP 32953 als Wirt hat, gezeigt werden. Weitere Analysen der Aminosäuresequenz mit Hilfe der Pfam-Datenbank zeigten die Anwesenheit einer Protease-Domäne, die zur VanY-Familie (PF02557) gehört und eine D-Alanyl-D-Alanin Carboxylpeptidase-Aktivität aufweist. Das durch ORF 48 kodierte Protein

hat eine Länge von 127 Aminosäuren, ein MW von 15,7 kDa und einen isoelektrischen Punkt bei 9,1. Das Gen wurde mit *ply100* bezeichnet, das kodierte Protein entsprechend mit Ply100. Die Sequenzen und ein Alignment mit einer homologen Aminosäuresequenz sind unter 6.4.4, 6.4.5 bzw. 6.4.6 im Anhang dargestellt. Untersuchungen der Region von ORF 48 im Genom von PY100 ergaben, dass dieser von mehreren uncharakterisierten ORFs (ORF 49, 50, 51) flankiert wird, die die gleiche Orientierung aufweisen. Außerdem konnte ein Transkriptionsterminator nach dem ORF 51 identifiziert werden. Beides deutet darauf hin, dass die genannten ORFs ein Operon bilden könnten (s. Abb. 3-22). In vielen Fällen ist ein Lysissystem von Bakteriophagen, bestehend aus mindestens einem Lysin und einem Holin, in einem Operon angeordnet [187].

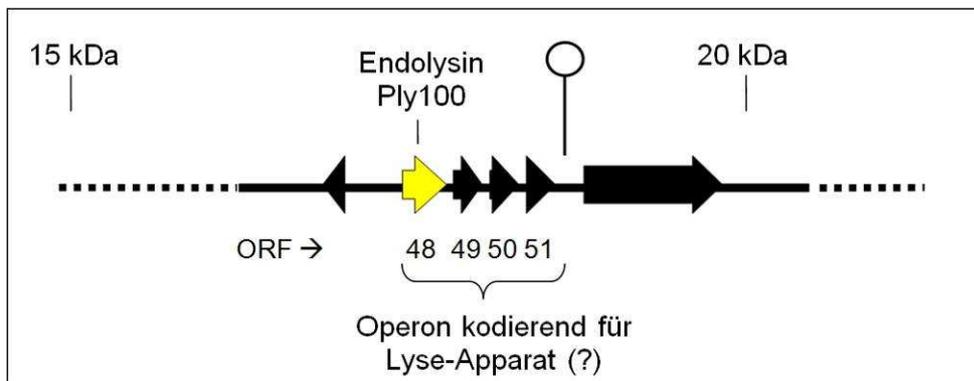


Abb. 3-22: Darstellung des putativen Operons, kodierend für das Lysis-System von PY100. Gezeigt ist der Bereich von 15 kDa bis 20 kDa des Phagengenoms. Die ORFs 48 – 51 könnten ein Operon darstellen. Bestärkt wird diese Annahme durch die gleiche Orientierung der ORFs und das Vorhandensein eines Transkriptionsterminators („Rho-independent terminator“) dargestellt durch die Haarnadel. Die ORFs sind durch die Pfeile dargestellt

3.9.2.2 Synthese des rekombinanten Ply100 in *E. coli* BL21

Ply100 konnte unter nativen Bedingungen, wie schon für PlyE067 beschrieben (s. 3.9.1.2), in funktioneller und rekombinanter Form mit Hilfe des Expressionssystems „Champion pET Directional TOPO Expression Kits“ synthetisiert werden. Durch SDS-Page Analyse konnte gezeigt werden, dass Ply100 bereits nach 2 Stunden in ausreichender Menge synthetisiert wurde (s. Abb. 3-23 A). Das erwartete MW von Ply100 liegt bei 15,7 kDa. Die Ply100 repräsentierende Bande ist im SDS-Gel bei ca. 18 kDa zu erkennen. Auf Grund der Fusion des Proteins mit einem His-Tag, dessen MW bei 3kDa liegt, ergibt sich eine Größe von 18,3 kDa, was dem MW der repräsentierenden Bande im SDS-Gel entspricht. Um sicher zu gehen, dass es sich bei der Bande um das gewünschte Protein handelt, wurde ein Western Blot und ein Anti-His-Antikörper-Nachweis durchgeführt, der die SDS-Page Ergebnisse bestätigte (Daten nicht gezeigt).

Die Aufreinigung von Ply100 aus dem vorbehandelten Zellextrakt erfolgte über eine Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie. Mit einer weiteren SDS-Page Analyse konnte bestätigt werden, dass Ply100 ohne erhebliche Kontaminationen durch andere Proteine aufgereinigt werden konnte (s. Abb. 3-23 B). Es konnte in einer Konzentration von ca. 60µg/ml in Tris-Hcl Puffer (50mM, pH7) gewonnen werden.

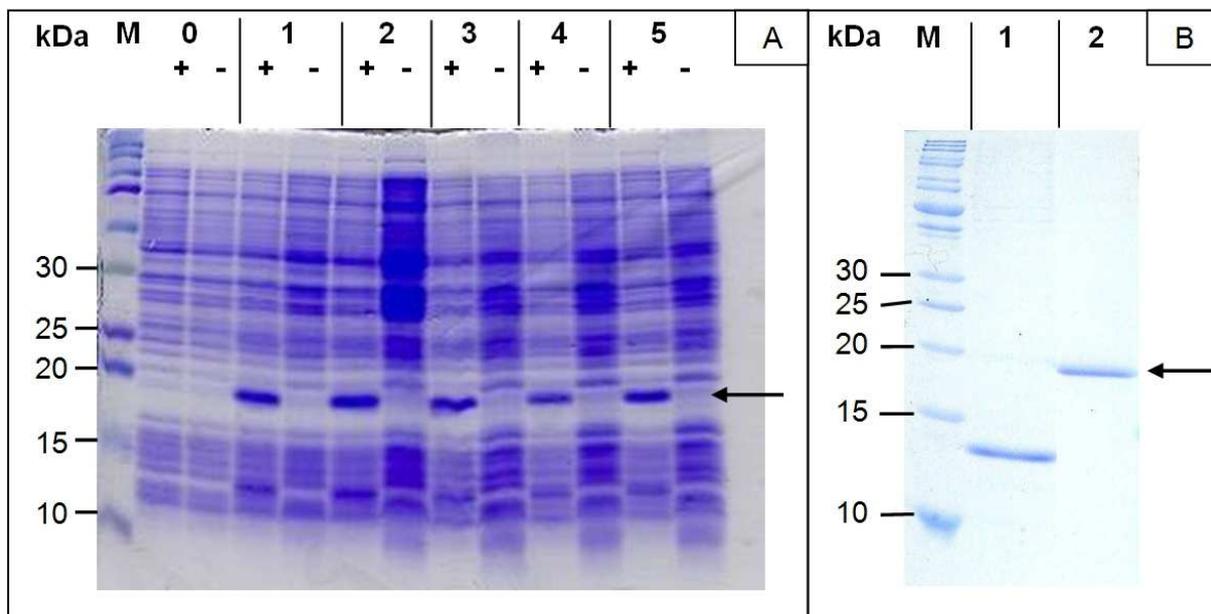


Abb. 3-23: Synthese des rekombinanten Endolysins Ply100 in *E. coli* BL21 (*pet200::ply100*). (A): M = Marker, Spalten 0 - 5 = Proben mit IPTG induzierten (+) und nicht induzierten (-) Kulturen zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 5 Std. (B): Ply100 nach Aufreinigung des Proteins (schwarzer Pfeil) mit Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie. M = Marker, Spalte 1 = Waschfraktion der Ni-NTA-Affinitäts-Chromatographie. Spalte 2 = Ply100 nach Elution und Umpufferung.

3.9.2.3 Lysis-Eigenschaften von Ply100 / Bakterielle Sensitivität

Die Versuche zur Untersuchung der lytischen Aktivität von Ply100 wurden, wie bereits für das Enzym PlyE067 (s. 3.9.1.3) beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurden 500 ng Ply100 mit Zellsuspensionen verschiedener Spezies von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* und lyophilisierten *M. lysodeikticus* im Lysisassay eingesetzt. Eine lytische Wirkung durch Ply100 auf die Peptidoglykanschicht Gram-negativer Erreger konnte in diesen Versuchsansätzen somit weder anhand von *Yersinien* noch *M. lysodeikticus* gezeigt werden. Es konnte keine signifikante Verringerung der OD₆₀₀ gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Eine lytische Wirkung durch Ply100 auf die Peptidoglykanschicht der *Yersinien* und *M. lysodeikticus* konnte mit diesen Versuchsansätzen nicht gezeigt werden.

Auch hier wurden die Gram-negativen *Yersinia*-Stämme zur Entfernung der äußeren Membran mit Chloroform behandelt. Danach konnte nach Zugabe des Endolysins zu den erzeugten Sphäroblasten eine Abnahme der OD₆₀₀ beobachtet werden. Alle acht im

Lysisassay eingesetzten *Yersinien*, (4 *Y. enterocolitica*- und 4 *Y. pseudotuberculosis*-Stämme) wurden durch Ply100 lysiert. Allerdings zeigten die Stämme eine unterschiedlich starke Sensitivität gegenüber dem Enzym. Die Ausgangs-OD₆₀₀ des Versuches konnte nach 22 min bei *Y. enterocolitica* ATCC 9610 um bis zu 64% verringert werden und wies damit die stärkste Sensitivität gegenüber Ply100 auf (s. Abb. 3-24). Die geringste Sensitivität zeigte sich bei *Y. pseudotuberculosis* DSM8992 mit einer Verringerung der OD₆₀₀ um ca. 20%. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die lytische Aktivität durch das Endolysin nicht nur auf die Gattung *Yersinia* begrenzt ist. Die ebenfalls Chloroform-behandelten *E. coli* DH5 α Zellen waren im gleichen Versuchsansatz ebenfalls von der enzymatischen Lyse betroffen (Daten nicht gezeigt).

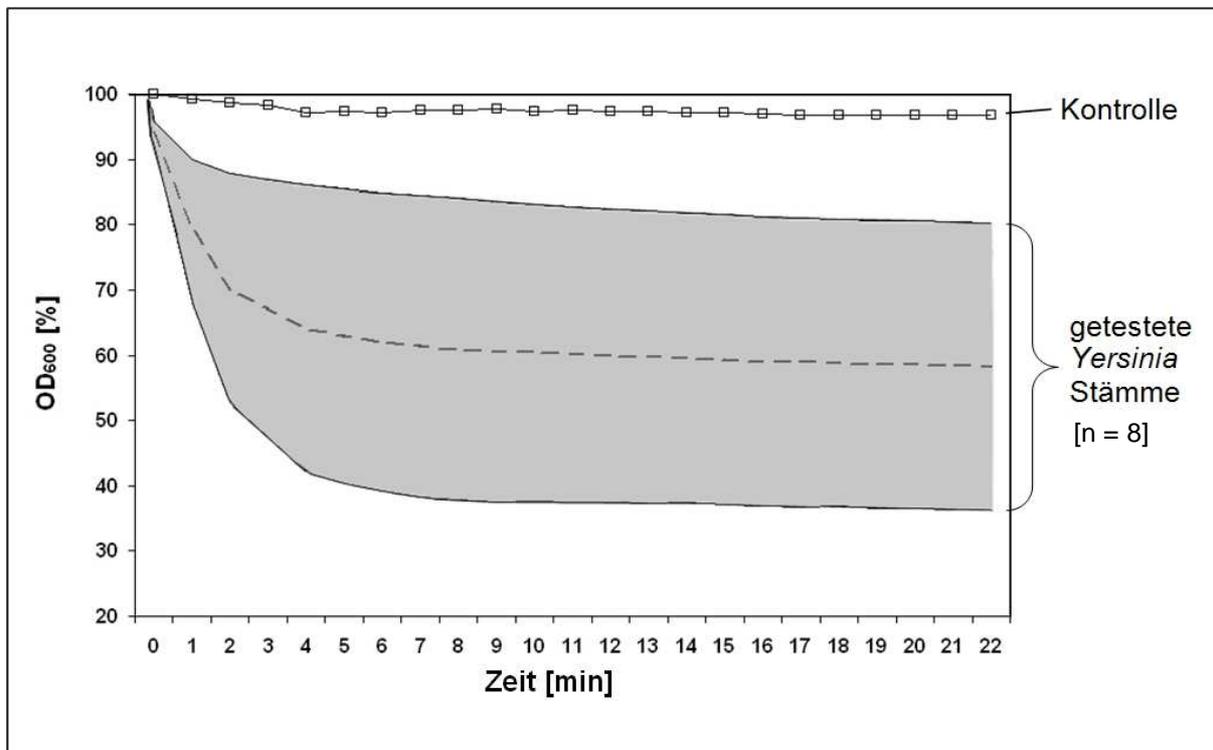


Abb. 3-24: Zusammenfassung der *Yersinia*-Lysisassays mit aufgereinigtem Ply100. Dargestellt ist die Reduktion der (OD₆₀₀) gegen die Zeit nach Zugabe von 500 ng des Enzyms zu 8 *Yersinia*-Sphäroblastensuspensionen. Der Kontroll-Assay, *Yersinia*-Sphäroblastensuspensionen nach Zugabe von Puffer ist mit offenen Quadraten gekennzeichnet, die durchschnittliche Zellyse durch die gestrichelte Linie und die Abweichungen davon durch den grau-schraffierten Bereich. Pro Stamm erfolgten zwei Wiederholungen mit jeweils Doppelbestimmungen.

3.9.2.4 pH-Wert- und Konzentrationsabhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Ply100

Zur biochemischen Charakterisierung der Endolysinaktivität von Ply100 wurde der Referenzstamm *Y. enterocolitica* ATCC 9610 verwendet, da bei diesem in vorherigen Versuchen die

deutlichste Lyse zu erkennen war. Es sollten pH-Wert- und Konzentrations-Abhängigkeit getestet werden.

Die Versuche zur Testung der pH-Wert-Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms wurden in gleicher Weise durchgeführt wie die unter 3.9.1.4 beschrieben. Sowohl der pH-Wert des Puffers, in dem das Enzym Ply100 gelöst war, als auch der pH-Wert des Puffers, in dem die Chloroform-behandelten Yersinien aufgenommen waren, wurde zwischen pH-Wert = 4 und pH-Wert = 8 variiert.

Durch die Ergebnisse des Tests konnte die pH-Wert Abhängigkeit der lytischen Aktivität von Ply100 deutlich gemacht werden. Die stärkste Lyse wurde bei einem pH-Wert von 8 beobachtet. Die Reduktion der OD_{600} belief sich auf 59,4% (s. Abb. 3-25). Bei einem pH-Wert von 7 konnte noch eine lytische Reduktion von 51,3% festgestellt werden. Bei einem pH-Wert von 6 lag die Reduktion mit 49,1% nur knapp darunter. Wie auch schon bei PlyE067 zu beobachten war, gab es bei einem pH-Wert von 5 einen größeren Aktivitätsverlust, so dass hier nur noch eine Reduktion der OD_{600} von 28,6% gemessen werden konnte. Bei einem pH-Wert von 4 konnte nur noch eine geringe lytische Aktivität gezeigt werden. Die Reduktion lag bei 8,4%.

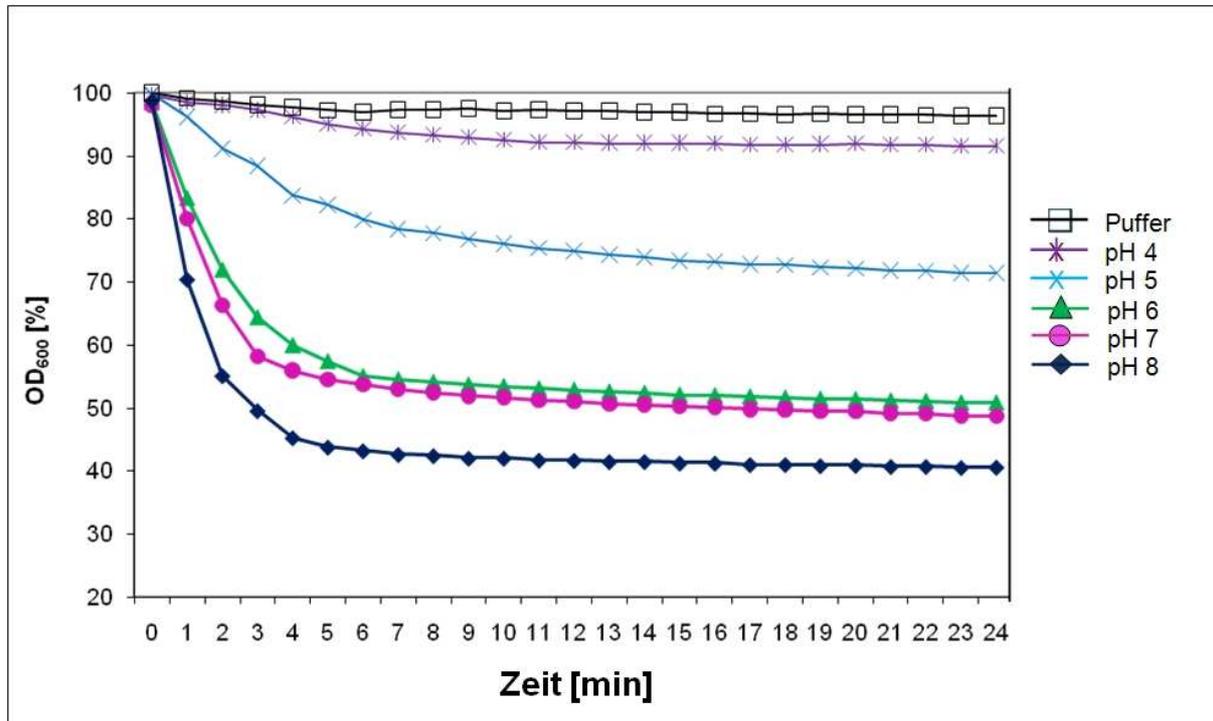


Abb. 3-25: Lytische Aktivität von Ply100 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Aktivität von Ply100 gegen *Y. enterocolitica* ATCC 9610 Sphäroblastensuspension ist dargestellt durch die Reduktion der OD_{600} bei unterschiedlichem pH-Wert.

Um die lytische Aktivität von Ply100 festzustellen, wurden Verdünnungen des Enzyms in Tris-HCl (50mM, pH7) angesetzt und in den Lysisassays eingesetzt.

Es konnte festgestellt werden, dass die lytische Wirkung bis zu einer Verringerung der Ply100-Konzentration auf 180 ng in 300µl *Y. enterocolitica* ATCC 9610-Sphäroblastensuspension noch immer ausreichend war, um nach 23 min Testzeitraum die gleiche Reduktion der OD₆₀₀ zu bewirken wie die 10-fache Menge (s. Abb. 3-26). Allerdings ist in Abb. 3-26 auch zu erkennen, dass die Reduktion, im Gegensatz zu höheren Konzentrationen, nicht so steil, sondern eher linear verläuft. Bei der nächsten Verdünnungsstufe von 120 ng und auch bei 90 ng war im Vergleich zur Negativkontrolle bereits keine Reduktion mehr zu erkennen.

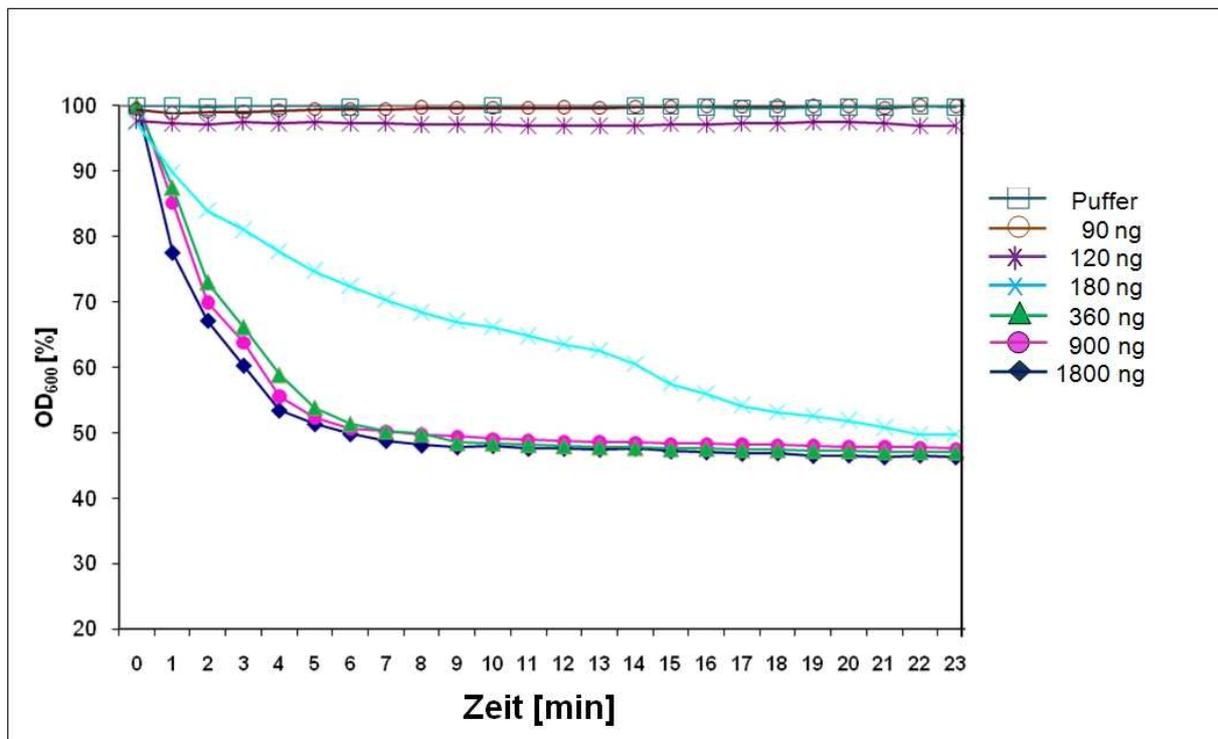


Abb. 3-26: Lytische Aktivität von Ply100 in Abhängigkeit von der Konzentration. Dargestellt ist die Reduktion der optischen Dichten (OD₆₀₀) gegen die Zeit nach Zugabe des Enzyms Ply100 zu *Yersinia*-Sphäroblastensuspensionen in unterschiedlichen Konzentrationen

3.9.2.5 Hitzestabilität von Ply100

Zur Bestimmung der Hitzestabilität von Ply100 wurde das Enzym auf 99°C für 10, 60 und 120 min erhitzt. Als Untersuchungsstamm wurde *Y. enterocolitica* ATCC 9610 eingesetzt. Das Enzym Ply100 erwies sich als extrem hitzestabil. Das hitzeunbehandelte Enzym Ply100 wies in diesem Versuch eine Reduktion der OD₆₀₀ von 51,7% auf (s. Abb. 3-27). Im Vergleich dazu hatte Ply100 nach einer 120 minütigen Hitzebehandlung bei 99°C noch immer eine Aktivität, ausreichend für eine Reduktion der Ausgangs OD₆₀₀ um 50,1%.

Unterschiedlich ist allerdings die anfängliche lytische Effektivität, die bei dem hitzebehandelten Enzym in den ersten 10 Minuten des Tests schwächer ausfällt (s. Abb. 3-27). Eine ebenfalls in den ersten Minuten des Testversuchs etwas schwächere Aktivität ließ sich bei einer 60 minütigen Hitzebehandlung von Ply100 nachweisen. Die Reduktion am Ende des Versuches lag aber noch bei 48,9%. Die 10 minütige Hitzebehandlung zeigte in diesem Versuch einen vergleichbaren Verlauf der Reduktion der OD_{600} wie das unbehandelte Enzym. Die Reduktion der OD_{600} lag geringfügig höher bei 54,1%.

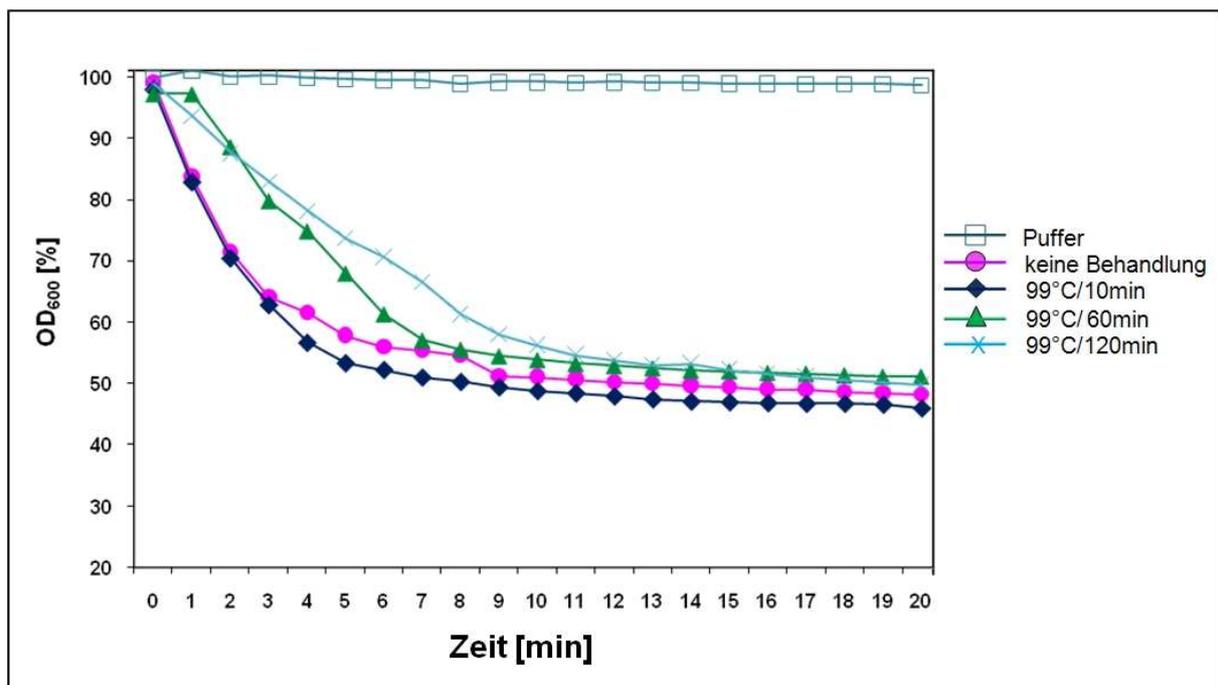


Abb. 3-27: Lytische Aktivität von Ply100 nach Hitzebehandlung. Dargestellt ist die Reduktion der optischen Dichten (OD_{600}) gegen die Zeit nach Zugabe des bei 99°C, für bis zu 120 min hitzebehandelten Enzyms Ply100 zu *Yersinia*-Sphäroblastensuspensionen.

4. Diskussion

4.1 Isolierung und Charakterisierung der Burkholderia-Phagen

Ziel dieser Arbeit war es, temperente Bakteriophagen aus den vorhandenen *Burkholderia*-Stämmen zur Charakterisierung zu isolieren. Insgesamt konnten sechs temperente Phagen aus zwölf *B. pseudomallei*- und zehn *B. thailandensis*-Stämmen isoliert werden. Hierbei stammten die zwei Phagen phiBp10 und phiBp12 aus den untersuchten *B. pseudomallei*-Stämmen und die vier Phagen phiE058, phiE067, phiE131 und phiE202 aus den untersuchten *B. thailandensis*-Stämmen. Die Induktion der Phagen aus Burkholderien erfolgte durch Zugabe des Zytostatikums Mitomycin C zu Flüssigkulturen der bakteriellen Erreger. Die toxische Wirkung des Mytomycin C konnte anhand des Aufklarens der jeweiligen induzierten Kultur und somit der Reduktion der optischen Dichte beobachtet werden. Wenn die Verminderung der optischen Dichte auf die Freisetzung von Phagen zurückzuführen war, war die Reduktion besonders stark und anhaltend über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden. Dies war der Fall bei den *B. thailandensis* Kulturen E058, E067, E131 und E202 sowie den *B. pseudomallei* Kulturen Bp10 und Bp12. Die Konzentrations-Untergrenze von Mitomycin C, die zu einer Phagen Induktion führte, lag in etwa bei 1 µg/ml Kultur.

In den Arbeiten von Woods et al. [179] und DeShazer [49] wurde eine Phagen Induktion durch eine UV-Bestrahlung erreicht, die hier keinen Erfolg zeigte. Woods et al. und DeShazer verwendeten dazu eine tragbare UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 254 nm. Die Flüssigkulturen, die zuvor unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen wurden, wurden den Strahlungen bei einem Abstand von 25 cm für 20 Sekunden ausgesetzt [179]. Die Parameter des beschriebenen Versuches wurden in den Experimenten dieser Arbeit soweit möglich eingehalten. Allerdings wurde nicht überprüft, welche Laufzeit die verwendete UV-Lampe bis dato hatte, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass die nötige UV-Strahlungsintensität aufgebracht werden konnte. Die Aufwärmphase der UV-Lampe wurde auf eine Zeit von 5 Minuten begrenzt, die eventuell nicht ausreichend war. Der Misserfolg der Phageninduktion mit UV-Bestrahlung könnte auf diese beiden Parameter zurückzuführen sein. Es muss angemerkt werden, dass diese Parameter im Nachhinein nicht variiert wurden, da sich parallel zur UV-Bestrahlung mit der Mitomycin C-Induktion gute Erfolge erzielen ließen, die daraufhin in den folgenden Versuchen zur Anwendung kam.

Auch die Behandlung mit dem Antibiotikum Norfloxacin führte nicht zur Freisetzung von Phagen aus den Burkholderien. Sowohl Mitomycin C und Norfloxacin als auch die UV-Bestrahlung (254 nm) haben eine bakterizide Wirkung auf Mikroorganismen durch eine

Schädigung der DNA. Die Wirkung erfolgt über eine direkte Wirkung durch Interkalierung zwischen den DNA Strängen (Mitomycin C), durch Dimerbildung von Pyrimidinbasen (UV- Bestrahlung) oder durch eine indirekte Wirkung auf die DNA in Folge einer Hemmung der DNA-Topoisomerase (Norfloxacin) [137]. Wahrscheinlich konnte nur Mitomycin C eine ausreichende Schädigung der Zelle bewirken, die zur Auslösung der SOS-Antwort der Zelle führte. Diese bewirkt unter anderem die Freisetzung von temperenten Phagen, die dann vom Prophagenstatus in den lytischen Vermehrungszyklus wechseln [34].

Die Isolierung intakter Bakteriophagen, besonders aus den *B. pseudomallei*-Stämmen, erwies sich als schwierig. Die Vermehrung der *B. pseudomallei*-Phagen erfolgte in *B. mallei*-Kulturen als Wirtstamm. Die produzierten sterilfiltrierten Phagenlysate wurden durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und danach durch CsCl.-Dichtegradientenzentrifugation nochmals aufgereinigt. Obwohl auch intakte Phagen nach der Konzentrierung durch Ultrazentrifugation elektronenmikroskopisch nachzuweisen waren, konnten nach weiterer Aufreinigung durch den CsCl-Gradienten lediglich Phagenpartikel, Kopf oder Schwanz, elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Ein Grund hierfür könnte die Instabilität der isolierten Phagen unter den gegebenen Bedingungen sein. Die Aufreinigung der Phagenlysate bis zum Schritt der Ultrazentrifugation erfolgte im L3-Labor. Die sterilfiltrierten Phagenlysate mussten dann über einen Zeitraum von sieben Tagen auf Sterilität geprüft werden. In dieser Zeit wurden die Phagenlysate bei 4°C in LB-Medium gelagert. Erst dann erfolgte das Ausschleusen der Lysate aus dem L3-Labor, die Weiterverarbeitung durch Ultrazentrifugation und die Aufnahme in dem für Phagen geeigneten SM-Puffer. Möglicherweise war die Zeitspanne von sieben Tagen zu lang und die Instabilität der Phagen führte dazu, dass sie ohne die optimalen Bedingungen im SM-Puffer zerfielen. SM-Puffer ist ein speziell für Phagen entwickelter Puffer. Er enthält u.a. Magnesium- und Kalzium-Ionen die durch eine Komplexbildung zwischen Phagen und Metall-Ionen zur Stabilität der Phagen beitragen [7]. Die im SM-Puffer enthaltene Gelatine sorgt durch eine Absättigung der Gas-Flüssigkeits-Grenzflächen zusätzlich für eine Stabilisierung der Phagen, da so verhindert wird, dass die Strukturproteine der Phagen durch einen Kontakt mit Luft ihre Löslichkeit in Wasser verlieren und daraufhin denaturieren [8].

Aus den untersuchten *Burkholderia*-Stämmen konnten sechs temperente Phagen isoliert werden: phiBp10, phiBp12, phiE058, phiE067, phiE131 und phiE202. Durch MLST der Wirtstämme und durch Analyse der Phagen in Hinblick auf ihre Wirtsspektren durch

Restriktionsanalysen und DNA-Hybridisierungsversuche konnte festgestellt werden, dass es sich bei den Phagen phiE058 und phiE131 bzw. phiBp10 und phiBp12 um jeweils identische Phagen handelt.

Alle identifizierten Phagen konnten aufgrund ihrer Morphologie, die sich bei einer Gesamtgröße von ca. 170-200 nm durch ein ikosaedrisches Kapsid und einen dicken, sehr strukturierten und kontraktionsfähigen Schwanz auszeichnet, innerhalb der Ordnung der *Caudovirales* in die Familie der *Myoviridae* eingruppiert werden. Morphologisch ähneln die isolierten Phagen damit beispielsweise sehr stark dem prominenten Phagen P2 [151] und den bereits bekannten Phagen Bcep1, Bcep43, BcepB1A, und Bcep781 des *B. cepacia* Komplexes [152]. Die charakterisierten Phagen phi1026b aus *B. pseudomallei* und phiE125 aus *B. thailandensis* hingegen gehören zur Familie der *Siphoviridae* und weisen strukturelle Proteinomologien zu Lambda auf [49;179]. Phagen der Familie *Siphoviridae* weisen einen dünneren, nicht kontraktilen Schwanz auf, haben aber eine ähnliche Kopfstruktur wie Phagen der Familie *Myoviridae*. Weitere Veröffentlichungen, in denen die Produktion von Phagen durch *B. thailandensis* behandelt wird, sind abgesehen von Woods. et al. [179], die den Phagen phiE125 beschrieben haben, nicht bekannt.

Es handelt sich bei denen in dieser Arbeit isolierten Phagen um die ersten temperenten Phagen der Familie *Myoviridae*, die aus der apathogenen Spezies *B. thailandensis* isoliert und charakterisiert wurden. Als Vertreter dieser Familie konnten bisher neben dem Phagen phiK96243 aus *B. pseudomallei* [76] nur die virulenten Myophagen des *B. cepacia*-Komplexes [152] charakterisiert werden. Datenbankanalysen zeigen aber, dass P2-ähnliche Phagen in der Gattung *Burkholderia* keine Seltenheit darstellen. Durch abgeleitete Aminosäuresequenzen der identifizierten ORFs im Genom von phiK96243 konnten mit Hilfe der Datenbank und der Blast-Funktion von NCBI, Cluster mit ähnlichen Genen in vielen sequenzierten *Burkholderia*-Genomen detektiert werden [Summer et al. Unpublished]. Dies deutet darauf hin, dass kryptische, P2-ähnliche Prophagen nichts Ungewöhnliches in der Gattung *Burkholderia* sind.

Interessanterweise konnte durch die Hybridisierungsversuche zwischen den isolierten Phagen und phi1026b deutlich gemacht werden, dass der *B. thailandensis*-Phage phiE202 mit den *B. pseudomallei*-Phagen phiBp10 und phi1026b phylogenetisch nah verwandt ist. Hingegen zeigte phiE202 mit den Phagen phiE058/phiE131 und phiE067, welche aus derselben Spezies

(*B. thailandensis*) isoliert wurden, keine phylogenetische Verwandtschaft. Dies deutet auf einen horizontalen Gentransfer zwischen *B. thailandensis* und *B. pseudomallei* hin.

Betrachtet man die beschriebenen Erkenntnisse der Datenbankanalysen und die bereits veröffentlichten Daten von *Burkholderia*-Phagen, so wird deutlich, dass eine große Anzahl von kryptischen Prophagen in der Gattung *Burkholderia* vorliegt, die es zu erforschen gilt. Phagen sind nicht nur in Bezug auf ihre Nutzung in der Diagnostik ein wichtiges Instrument, sondern auch für die jeweiligen Wirte selbst. Sie spielen bei vielen bakteriellen Krankheitserregern beim Erwerb virulenter Eigenschaften durch horizontalen Gentransfer der dafür kodierenden Gene eine entscheidende Rolle [26;31]. Allerdings konnte bisher kein Zusammenhang zwischen einem Pathogenitätsfaktor aus *Burkholderia* mit einem Gen aus einem bakteriophagen-vermittelten Gentransfer erbracht werden. Aus den genannten Gründen macht eine weitergehende Erforschung der Phagen Sinn und sollte über diese Arbeit hinaus erfolgen.

4.2 Eigenschaften und Organisation des phiE067 Genoms

Der Phage phiE067 ist der erste Phage der Familie *Myoviridae*, der aus *B. thailandensis* isoliert und neben phiE125 [179] der zweite Phage überhaupt aus dieser Bakterienspezies, der auf molekularer Ebene charakterisiert wurde und dessen komplette Genomsequenz bekannt ist. Viele der in den Datenbanken vorzufindenden *Burkholderia*-Phageng Genome stammen von Stämmen des *B. cepacia*-Komplexes (Bcep1, Bcep43, Bcep781, BcepF1, BcepC6B, BcepB1A, Bcep22, BcepGomr and BcepNazgul) [152], EJ Summer *et al.*, unpublished].

Der Myophage phiE067 hat eine Genanordnung, so wie sie bei lambdoiden Phagen beschrieben ist. Dem Gencluster kodierend für Strukturproteine folgt ein Gencluster, deren Produkte an der Integration und Lysogenisierung beteiligt sind und ein weiteres Gencluster, welche die Gene beinhaltet, deren Produkte eine Funktion bei der Replikation erfüllen. Diese konservierte Genanordnung ist auch bei dem Siphophagen Lambda (GI:215104) und den aus *Burkholderia*-stammenden Siphophagen phiE125 (GI:17484022), phi1026b (GI:38505382), BcepGomr (GI:145321088) und Bcep176 (GI:76885811) vorzufinden. Die Myophagen Bcep781 und Bcep1 des *B. cepacia*-Komplexes, die dem Phagen phiE067 morphologisch entsprechen, weisen hingegen abweichende Genanordnungen auf.

Hinsichtlich der Polypeptidsequenzen von phiE067 erlaubten gerade 19 der 69 potentiellen Polypeptide eine funktionelle Zuordnung. Bei 36 ORFs konnten Homologien zu bekannten Proteinen oder Genprodukten unbekannter Funktion gefunden werden, 21 sind homolog zu

hypothetischen Proteinen und bei 12 Polypeptidsequenzen waren gar keine signifikanten Übereinstimmungen zu erkennen. Die häufigsten Homologien konnten zu Proteinen von Phagen des *B. cepacia*-Komplexes gefunden werden, insbesondere zu dem Myophagen Bcep781 [152]. Hierbei konnten vor allem Homologien im Bereich der Strukturproteine zu Bcep781 festgestellt werden. In der entsprechenden Region sind 7 der 20 identifizierten ORFs, welche für Strukturproteine kodieren, homolog. Bei einigen weiteren ORFs dieser Region handelt es sich um Homologien zu hypothetischen Genprodukten des Phagen Bcep781 und Bcep1, von denen vermutet wird, dass es sich ebenfalls um Strukturproteine handelt [152]. Wegen der Genclusteranordnung in fast allen Phagen (z. B. Lambda oder phiE125) kann auch bei dem Phagen phiE067 angenommen werden, dass es sich um strukturelle Proteine handelt.

Gene für tRNAs, die viele Phagen besitzen, konnten im Genom von phiE067 nicht gefunden werden. Für die Anwesenheit von tRNAs in den Genomen von Phagen gibt es unterschiedliche Theorien. Eine Vermutung ist, dass hauptsächlich solche Gene für tRNAs im Genom der Phagen vorliegen, welche in den Phagen weit verbreitet sind, im Wirt jedoch nicht vorkommen. Dies würde dem Phagen durch eine effektivere Translation, eine kürzere Latenzzeit und eine steigende Reproduktionsrate einen Vorteil gegenüber Konkurrenten verschaffen [16]. Des Weiteren ist bekannt, dass statistisch gesehen mehr Gene für tRNAs in virulenten als in temperenten Phagen Genomen vorliegen [16]. Da für den temperenten Phage phiE067 der Nachweis von Genen für tRNAs nicht erbracht werden konnte, ist davon auszugehen, dass phiE067 ausschließlich die tRNAs der Wirtszellen zur Reproduktion nutzt.

Potentielle Proteine des Phagen phiE067, die an der Lysogenie-Kontrolle und Replikation beteiligt sind, wie z. B. Repressorproteine, die Integrase, Transkriptionsfaktoren und -regulatoren, weisen Homologien zu Phagen unterschiedlicher *Burkholderia*-Spezies auf, z. B. *B. pseudomallei*, *B. multivorans* und *B. vietnamiensis*, aber auch zu Sequenzen von Phagen stammend aus Gattungen wie *Salmonella*. Proteine, die für die Wirtslise verantwortlich sind, haben die stärksten Homologien zu Phagen der Spezies *B. pseudomallei*.

Die genannten Homologien, die in besonderem Maße auf *B. cepacia* zutreffen, deuten darauf hin, dass zwischen *B. thailandensis* und *B. cepacia* horizontaler Gentransfer stattgefunden haben könnte. Bakteriophagen können auch Träger von Virulenzfaktoren sein wie im Falle des Shiga-like Toxins in dem Phagen H-19B [80]. Hierbei kann es durch Integration des Phagen in einen neuen Wirt auch zur Übertragung von Virulenzfaktoren kommen. Dieser Vorgang, Transduktion genannt, ist eine Möglichkeit der Verbreitung und dem Erwerb von Virulenzfaktoren in neue Wirte. Bisher ist zwar keine Veröffentlichung bekannt, die belegen

konnte, dass ein Virulenzfaktor von *Burkholderia* mit einem Phagenelement assoziiert ist, im Genom des Phagen phiE067 werden durch die ORFs 22 und 23 allerdings potentielle Virulenzfaktoren kodiert. ORF22 kodiert für eine Lipase der G-D-S-L Familie. Die dazu gehörenden Phospholipasen sind in der Lage, die Lyse der eukaryotischen Wirtszellmembranen, wie z. B. der Phagosommembran, zu fördern, was eine Verbreitung des Erregers im Wirt ermöglicht und die bakterielle Zytotoxizität erhöht [138]. ORF23 im Genom von phiE067 kodiert für eine Acetyltransferase, welche ebenfalls einen putativen Virulenzfaktor darstellt. Die Acetyltransferase des *Shigella*-Phagen Sf6 z. B. modifiziert das vorhandene Lipopolysaccharid-O (LPS-O)-Antigen so, dass es zur Umwandlung des Serotyps führt [10]. Diese Modifikation wiederum ist ein wichtiger Virulenzfaktor, da so die Erkennung und Bindung durch einen bestimmten Antikörper verhindert wird. Unterstützt wird die Annahme, dass es sich bei den ORFs 22 und 23 um Virulenzfaktor-kodierende Phagengene handelt, durch die Tatsache, dass diese in temperenten Phagen häufig in einem eigenständigen Gencluster, auch „moron“ genannt, angeordnet sind [31;84]. „Morons“ werden im Vergleich zu den umliegenden Phagengenen meist in entgegengesetzter Orientierung transkribiert [17]. Beides kann für die ORFs 22 und 23 im Genom von phiE067 beschrieben werden.

Weiterhin konnte im Phagengenom von phiE067 ein Gen kodierend für die große Untereinheit der Terminase (*terL*) mit dem ORF48 identifiziert werden. Das Gen für die kleine Untereinheit (*terS*) konnte allerdings nicht eindeutig identifiziert werden, was daran liegen kann, dass diese Gene weniger stark konserviert sind. Typisch für das Gen *terS* wäre eine deutlich geringere Größe und eine Lokalisation direkt stromaufwärts von ORF48. Demnach könnte es sich bei ORF49, stromaufwärts von ORF48 gelegen, um das Gen *terS* handeln, welches für die kleine Terminase Untereinheit kodiert. Für ORF49 konnten allerdings keine signifikanten Homologien gefunden werden. TerL und TerS katalysieren den Verpackungsmechanismus der Phagen-DNA, wobei TerL die ATPase- und die DNA-Restriktionsaktivität bereitstellt und TerS die Sequenzerkennung übernimmt [152].

Der ORF19 wurde als Phagenlysin-kodierendes Gen identifiziert und dessen Funktion experimentell nachgewiesen. Entsprechend den bioinformatischen Analysen handelt es sich bei dem Protein, im Weiteren als PlyE067 bezeichnet, wahrscheinlich um eine N-Acetyl- β -D-Muramidase. Die N-terminale Domäne von PlyE067 beherbergt die katalytische Aktivität. Mit wenigen Ausnahmen ist diese Funktion bei Lysinen von Phagen, welche Gram-positive Wirte infizieren, ebenfalls in der N-terminalen Domäne lokalisiert [50;58]. Generelle

Aussagen über den modularen Aufbau von Lysinen von Phagen Gram-negativer Wirte können aufgrund mangelnder Forschungsergebnisse bisher nicht gemacht werden.

Wie einleitend beschrieben, besteht der Lysisapparat vieler Phagen aus einem Lysin und einem Holin, welches dem hydrolysierenden Enzym den Weg zu seinem Substrat, dem Peptidoglykan, durch Bildung von Läsionen in der inneren Zellmembran ebnet. Mit Hilfe von Homologievergleichen der Blast-Funktion von NCBI konnte kein Gen, kodierend für ein Holin, gefunden werden. Allerdings liegt das wahrscheinlich an der Verschiedenartigkeit der Holinsequenzen bisher sequenzierter Phagen [166]. Holine gehören mit über 100 verschiedenen putativen Holinsequenzen, die über 30 orthologen Gruppen zugeordnet werden können, zu einer der facettenreichsten funktionellen Gruppe [166]. In vielen Fällen ist das Holin-kodierende Gen im Genom von Phagen in unmittelbarer Nähe, oft in direkter Nachbarschaft zum Endolysin lokalisiert [166]. Aus diesem Grund wurden die umliegenden ORFs des ORF19 von phiE067 einer biochemischen Analyse unterzogen. Die Analyse der putativen Proteinstruktur von dem vom ORF20 kodierten Protein Gp20 deutete auf eine Funktion als Holin hin. Zwei identifizierte Transmembrandomänen, die hohe Hydrophobizität des Proteins und die Lokalisation des ORF20 im phiE067 Genom direkt stromaufwärts von ORF19 lassen vermuten, dass es sich bei Gp20 tatsächlich um das Holin des Phagen phiE067 handelt. Somit besteht der Lysisapparat des Phagen phiE067 aus mindestens einem Lysin und einem Holin.

Die Analyse der Phagenendstrukturen wurde vorgenommen, um festzustellen, welcher Verpackungsmechanismus des Phagengenoms bei dem Phagen phiE067 zur Anwendung kommt. Zunächst wurde, basierend auf der Annotierung der Firma GATC-Biotech, eine terminale Redundanz vermutet, die sich nach wiederholten molekulargenetischen Untersuchungen der entsprechenden DNA-Region als falsch herausstellte. Nach Erhitzung der in Fragmente geschnittenen phiE067-DNA gab es begründete Hinweise, dass sogenannte „cos-sites“ als Phagenendstrukturen identifiziert werden könnten. Durch das Erhitzen würden die Wasserstoffbrückenbindungen der „cos-sites“ aufgehoben werden und das Fragment, welches die „cos-sites“ beinhaltet, zerfiel in zwei kleinere Fragmente. In einem der dargestellten Fragmente wurden die „cos-sites“ vermutet. Durch eine DNA-Sequenzierung dieser Regionen sollte, begründet durch einen Abbruch der resultierenden Sequenz, die genaue Lokalisation definiert werden. Zum Abbruch der Sequenzen kam es allerdings nicht, so dass diese Annahme nicht bestätigt werden konnte. Weiterhin wurde die Genomregion im Bereich des ORF 48, der für die große Untereinheit der Terminase kodiert, auf „cos-sites“

überprüft. Bei den *Burkholderia*-Phagen phiE125 und phi1026b, welche eine stark ähnliche Genanordnung besitzen, sind die „cos sites“ dort lokalisiert [49;179]. Es konnte jedoch in keiner der vermuteten Regionen die „cos-sites“ identifiziert werden, so dass die exakte Lokalisation dieser im Phagengenom von phiE067 unbekannt bleibt.

4.3 phiE067 und phiBp10 als diagnostische Werkzeuge

Die Auswertungen der Wirtsspektren aller isolierten Phagen ergaben, dass diese auf die Gattung *Burkholderia* beschränkt sind. Allerdings war kein Wirtsspektrum der isolierten Phagen auf eine einzelne *Burkholderia*-Spezies beschränkt, was eine direkte speziesspezifische, diagnostische Nutzung eines einzelnen Phagen ermöglicht hätte. Stattdessen konnte bei dem Phagen phiE067 aus *B. thailandensis* eine hohe Affinität gegenüber der eigenen Wirtsspezies festgestellt werden, welche zusätzlich auf *B. pseudomallei* ausgeweitet war. Somit zeigte der Phage phiE067 keine lytische Aktivität gegenüber *B. mallei*. Schlussfolgernd kann der Phage phiE067 zur Identifizierung von *B. thailandensis*- und *B. pseudomallei*-Spezies herangezogen werden. Unter Zuhilfenahme eines der *B. mallei*-spezifischen Phagen phiE125 [179] oder phi1026b [49] könnte somit bereits eine Differenzierung von *B. mallei* und *B. pseudomallei* erfolgen.

Der Phage phiBp10 aus *B. pseudomallei* zeigte ein auf die pathogenen Spezies *B. pseudomallei* und *B. mallei* beschränktes Wirtsspektrum. Alle 12 getesteten *B. mallei* Stämme wurden durch den Phagen lysiert, allerdings konnte der Phage die Spezies *B. pseudomallei* nur eingeschränkt lysieren. Bei lediglich 5 der 12 getesteten Stämme konnten im Spotttest Plaques beobachtet werden. Hierbei könnten die heterogenen LPS-Strukturen von *B. pseudomallei* eine Rolle spielen. Mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese, Silberfärbung und Immunoblotanalyse konnten drei verschiedene LPS Serotypen identifiziert werden: Typ A und Typ B, die ein unterschiedliches Proteinmuster im Gel zeigen und ein Typ, der als „rough“ bezeichnet wird und kein Proteinmuster zeigt [13]. Das LPS eines Bakteriums dient einem Phagen, wie einleitend erwähnt, unter anderem als Rezeptor und nimmt damit eine entscheidende Position bei der spezifischen Lyse durch Phagen ein. Mit dem Phagen phiBp10 wäre mit Einschränkungen eine Differenzierung der pathogenen von den apathogenen *Burkholderien* möglich. Weiterhin ermöglicht die Kombination der Phagen phiBp10 und phiE067 die Identifizierung von *B. pseudomallei*, *B. mallei* oder der apathogenen Spezies *B. thailandensis*.

Die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Wirtsspektren der neu isolierten Phagen phiE067 und phiBp10 zeigt deutlich, dass diese für diagnostische Zwecke geeignet

sind und damit im Phagen-Assays von Nutzen sind. Wegen der problematischen Differenzierung von *B. mallei*, *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* vor allem in der klassischen Bakteriologie, aber auch mittels Nukleinsäure- und Antikörper-basierender Methoden, sollte in der Praxis eine Kombination unterschiedlicher Methoden zum Einsatz kommen, um eine eindeutige Identifizierung der Erreger zu gewährleisten. Hierzu gehören z. B. auf DNA-Ebene beruhende Assays wie Real-time PCR [156;157] und MLST, phänotypische Bestimmungen (Kolonie-Morphologie, Beweglichkeit und Kohlenhydrat-Verwertung), immunologische- und enzymatische Assays und auch die Empfindlichkeit gegenüber Phagen. Die Notwendigkeit, weiterhin an diagnostischen Methoden zur Differenzierung von *B. mallei*, *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* zu arbeiten, ist durch die Annahme, dass die Erreger *B. mallei* und *B. pseudomallei* als mögliche biologische Waffen eingesetzt werden könnten [35;112;119;130] und es auch Hinweise darauf gibt, dass *B. mallei* bereits als solche genutzt wurde [113;130], eindeutig gegeben. Hinzu kommt die unterschiedliche Antibiotikatherapie, die bei Infektion mit diesen Erregern erforderlich ist.

4.4 Wirkung der Phagen- Endolysine PlyE067 und Ply100 auf Gram-negative Bakterien und ihre Anwendungsmöglichkeiten

In den Genomen der Phagen phiE067 und PY100 [140] konnten mit Hilfe der Datenbanken von NCBI ORFs entdeckt werden, die für putative Phagen-Endolysine kodieren. Nach Klonierungen und Überexpression der jeweiligen Gene in *E. coli* BL21 konnten die putativen Endolysine PlyE067 *Burkholderia*-Phagen phiE067 und Ply100 des *Yersinia*-Phagen PY100 in ausreichend reiner Form isoliert werden. Der Nachweis der lytischen Aktivität der Lysine konnte weder gegen die getesteten unbehandelten Gram-negativen Erreger, noch gegen das Gram-positive Bakterium *M. lysodeikticus*, welches in Lysozymassays als Positivkontrolle zum Einsatz kommt, festgestellt werden.

Daraufhin wurden Kulturen verschiedener *Burkholderia*-Spezies und dem *E. coli*-Stamm DH5 α so behandelt, dass diese als Sphäroblasten zum Nachweis der lytischen Aktivität von PlyE067 eingesetzt werden konnten. Bei Sphäroblasten ist die äußere Membran Gram-negativer Erreger kaum noch vorhanden, so dass dem Lysin der Weg zur Peptidoglykanschicht geebnet ist. Hiermit sollte weiterhin der Beweis erbracht werden, dass es sich bei dem isolierten Protein um das Lysin handelte. Bei einem Phagenvermehrungszyklus verschafft das vom selben Operon kodierte Holin durch eine Porenbildung in der inneren Zellmembran dem Lysin die Zugänglichkeit zum Peptidoglykan der Zelle. Nach Einsatz der Späroblasten konnte eindeutig eine lytische Aktivität gegenüber

Burkholderia-Sphäroblasten von PlyE067 nachgewiesen werden. Diese war nicht spezifisch gegen Stämme der Spezies *B. thailandensis* oder *B. pseudomallei* gerichtet, sondern auch *B. vietnamensis* wurde lysiert. Der *E. coli*-Stamm DH5 α dagegen wurde nicht lysiert. Da keine weiteren Stämme getestet wurden, kann nur vermutet werden, dass die lytische Aktivität des Enzyms spezifisch gegen die Gattung *Burkholderia* gerichtet ist. Optimale enzymatische Bedingungen lagen bei einem pH-Wert von 7 vor, und die Mindestkonzentration für eine maximale Lyse lag bei 3 μ g/ml. Nach einer Hitzebehandlung von mindestens 10 min bei 99°C war praktisch keine lytische Aktivität mehr zu erkennen.

Das Endolysin Ply100 zeigte eine lytische Aktivität gegenüber *Yersinia*-Sphäroblasten. Unterschiedliche Stämme der Spezies *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* wurden dabei in den Mikrotiterplatten-Tests lysiert. Auch *E. coli* DH5 α war von der lytischen Aktivität betroffen, was zeigt, dass die katalytische Aktivität des Enzyms nicht spezifisch gegen Yersinien gerichtet ist. Die optimalen enzymatischen Bedingungen lagen bei einem pH Wert von 8, und bis zu einer Konzentration von 0,6 μ g/ml konnte eine maximale Aktivität beobachtet werden. Sehr auffällig war die extreme Hitzestabilität des Enzyms. Selbst nach einer 120 minütigen Behandlung bei 99°C wurde die Aktivität des Enzyms kaum verringert. Die extreme Hitzestabilität des Enzyms Ply100 könnte eventuell darauf zurückgeführt werden, dass bei diesem Protein nach einer Erhitzung die Rückfaltung in die native Form ungewöhnlich schnell erfolgt oder die geordnete Raumstruktur durch starke Bindungen gar nicht erst aufgehoben wird, die Voraussetzung für eine korrekte Funktion ist. Cystein-Reste, die durch eine Ausbildung von Disulfidbrücken mit benachbarten Cystein-Resten die Tertiärstruktur eines Proteins erheblich stabilisieren, sind in der Aminosäuresequenz von Ply100 allerdings nicht vorhanden. Für andere Endolysine konnte, wie z. B. gp36c des *Pseudomonas* Phagen phiKMV, bereits eine ähnliche Hitzestabilität nachgewiesen werden [96]. Der Biochemiker Dieter Perl vom Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in Berlin konnte zeigen, dass die stark erhöhte Stabilität eines bakteriellen Kälteschockproteins auf lediglich zwei Austausch geladener Aminosäuren an der Proteinoberfläche zurückgeführt werden kann [123]. Viele hitzeresistente Proteine stammen aus thermophilen Mikroorganismen, deren optimale Wachstumstemperaturen zum Teil weit über 50°C liegen. Die Eigenschaft von Ply100 stellt eine möglicherweise sehr nützliche Eigenschaft für die Lebensmittelindustrie dar, da Yersinien u.a. durch kontaminierte tierische Lebensmittel (Milchprodukte, rohes Fleisch) übertragen werden und ein solches Enzym nicht durch hohe

Temperaturen bei Fermentations-, Pasteurierungs- und Konservierungsprozessen inaktiviert werden würde [86;116].

Die Ergebnisse der Studie an den Endolysinen PlyE067 und Ply100 bestätigten die bisherigen publizierten Erkenntnisse, dass die Lyse Gram-negativer Erreger bei exogener Anwendung bisher nicht gezeigt werden konnte [58;102]. Sowohl PlyE067 als auch Ply100 wiesen den unbehandelten Erregern gegenüber keine lytische Aktivität auf. Der Grund hierfür ist die äußere Membran Gram-negativer Bakterien, die eine Barriere für Makromoleküle wie PlyE067 und Ply100 darstellt. Bei Gram-positiven Erregern sind die Saccharide der Zellwand und dem Peptidoglykan nach exogener Zugabe von Endolysinen dagegen direkt zugänglich. Gezeigt werden konnte diese Aktivität im Tierversuch, z. B. bei dem pathogenen Erreger *Streptococcus pneumoniae* durch das C₁ Lysin [117] und dem hochpathogenen Erreger *B. anthracis* durch das Lysin PlyG des *B. anthracis*-spezifischen Gamma-Phagen [139]. Die Tatsache, dass im Assay mit dem Gram-positiven Bakterium *M. lysodeikticus* keine lytische Aktivität der isolierten Endolysine PlyE067 und Ply100 nachgewiesen werden konnte, könnte damit erklärt werden, dass Endolysine, die aus Phagen Gram-negativer Wirte stammen, in vielen Fällen eine geringe Affinität zum Peptidoglykan von *M. lysodeikticus* haben. Das Lysozym des Phagen P22 hat beispielsweise eine 20fach stärkere Affinität gegenüber *Salmonella typhimurium* (seinem natürlichen Wirt) als gegenüber *M. lysodeikticus* und das Lysozym des Phagen λ zeigt sogar gar keine Aktivität gegenüber *M. lysodeikticus* [25;125]. Die optimale Aktivität der beiden Enzyme bei einem pH-Wert von 7 (PlyE067) bzw. 8 (Ply100) entspricht den Angaben der wissenschaftlichen Erkenntnisse [132].

Allerdings gibt es Applikationen, die Voraussetzungen schaffen könnten, die Membran-Barriere bei Gram-negativen Erregern zu umgehen. Eine Möglichkeit, Endolysine bei exogener Anwendung zur Lyse Gram-negativer Erreger erfolgreich einzusetzen, könnte durch eine gleichzeitige Permeabilisierung der äußeren Membran erreicht werden. Agenzien, die eine Schwächung der äußeren Membran bewirken, wie z. B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), könnten dabei von Nutzen sein [97]. Bei einer Anwendung solcher Agenzien in Kombination mit Endolysinen könnte eine Penetration der Endolysine durch die äußere Membran und damit eine Hydrolyse der Bindungen der Zellwand ermöglichen. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass EDTA die Aktivität zellwand-degradierender Agenzien, wie z. B. Lysozym (Endolysin) oder Nisin gegen Bakterien erhöht, indem die Lipopolysaccharid-Schicht teilweise zerstört wird [73;164;165]. Viele weitere sogenannte „permeabilizer“, die die äußere Membran auf verschiedenste Art schädigen oder

permeabilisieren, sind bekannt, so z. B. Polymyxin, welches zu den Polypeptidantibiotika gehört [121]. Weiterhin konnte ein synergistischer Effekt bei der Kombination von konventionellen Antibiotika und zellwandabbauenden Enzymen in *in vitro* Tests schon beobachtet werden [51]. Auch eine Kombination mit Bakteriocinen ist denkbar. Phagenschwanz-ähnliche Bacteriocine beispielsweise sind hochmolekulare Partikel, die von einigen Gram-negativen Erregern produziert werden [28;44]. Strauch et al. konnten zeigen, dass ein Phagenschwanz-ähnliches Bacteriocin (Enterocolicitin), das aus dem Überstand einer *Yersinia*-Kultur isoliert wurde, bei Kontakt mit sensitiven Zellen zur Lyse der Zelle durch eine Bildung von Poren in der Zellwand führte [148]. Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, Endolysine zu identifizieren, die in der Lage sind, in die Zellmembran zu penetrieren, um dann an der Peptidoglykanschicht ihre hydrolytische Wirkung zu entfalten. Beispielsweise könnte dies durch eine Translokation erfolgen, die durch eine im Endolysin vorhandene Signalpeptidsequenz vermittelt wird. Um fündig zu werden, müsste die Suche nach solchen Enzymen allerdings in größerem Maßstab erfolgen. Dazu ist in einem im Jahre 2006 erschienenen Artikel des Journals „Nature Biotechnology“ [59] von Dr. V.A. Fischetti, einem der bekanntesten Forscher bezüglich Phagentherapie und Phagenlysine, die Aussage zu lesen, dass die Existenz von Lysinen, die in der Lage sind, Gram-negative Erreger zu lysieren, sehr wahrscheinlich ist. Auch aufgrund der vermuteten Anzahl von Phagen auf der Erde, die auf 10^{31} geschätzt wird, ist das Potential, ein solches Lysin zu finden, enorm. Auf einem Kongress an der Humboldt Universität zu Berlin im Jahre 2008 bestätigte Herr Dr. Fischetti diese Aussage mit dem Statement: „No endolyins against Gram-negative bacteria have been found yet, but its only a matter of time until we will.“

Eine therapeutische Behandlung von Infektionskrankheiten, verursacht durch Gram-negative Erreger, ist nach heutigen Kenntnissen durch den Einsatz von Endolysinen nicht möglich. Trotzdem geben die oben beschriebenen Ansätze Grund zur Annahme, dass eine Therapie auf diesem Wege in naher Zukunft entwickelt werden kann. Das Problem zunehmender multipler Resistenzen von pathogenen Bakterien gegen Antibiotika macht eine Forschung an alternativen Therapiemöglichkeiten ohnehin unabdingbar.

5. Literaturliste

1. Abbink FC, Orendi JM, de Beaufort AJ: Mother-to-child transmission of *Burkholderia pseudomallei*. N Engl J Med 344(15):1171, 2001
2. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E: *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 96(24):14043, 1999
3. Ackermann H.W.: Classification of Bacteriophages. In Calender R.L. (ed): The Bacteriophages. 2005
4. Ackermann HW: Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. Arch Virol 146(5):843, 2001
5. Ackermann HW: Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol 154(4):245, 2003
6. Ackermann HW: 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol 152(2):227, 2007
7. ADAMS M.H.: Stability of viruses in solutions of salts. Bull N Y Acad Med 24(8):544, 1948
8. ADAMS M.H.: Surface inactivation of bacterial viruses and of proteins. J Gen Physiol 31(5):417, 1948
9. Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF: GDSL family of serine esterases/lipases. Prog Lipid Res 43(6):534, 2004
10. Allison GE, Verma NK: Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. Trends Microbiol 8(1):17, 2000
11. Anisimov AP: [*Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Report 1]. Mol Gen Mikrobiol Virusol(3):3, 2002
12. Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB: Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Rev 17(2):434, 2004
13. Anuntagool N, Wuthiekanun V, White NJ, Currie BJ, Sermswan RW, Wongratanacheewin S, Taweekhaisupapong S, Chaiyaroj SC, Sirisinha S: Lipopolysaccharide heterogeneity among *Burkholderia pseudomallei* from different geographic and clinical origins. Am J Trop Med Hyg 74(3):348, 2006
14. Aravind L, Makarova KS, Koonin EV: SURVEY AND SUMMARY: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. Nucleic Acids Res 28(18):3417, 2000
15. Arun S, Neubauer H, Gurel A, Ayyildiz G, Kuscu B, Yesildere T, Meyer H, Hermanns W: Equine glanders in Turkey. Vet Rec 144(10):255, 1999

16. Bailly-Bechet M, Vergassola M, Rocha E: Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. *Genome Res* 17(10):1486, 2007
17. Barondess JJ, Beckwith J: A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature* 346(6287):871, 1990
18. Bauernfeind A, Roller C, Meyer D, Jungwirth R, Schneider I: Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 36(9):2737, 1998
19. Bercovier H. Family I. *Enterobacteriaceae* Genus XIV *Yersinia*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 15, 498-506. 1984.
20. Bercovier HMHHAJMBJFGRSAGaBDJ. Intraand interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. 4, 225-229. *Curr. Microbiol*.
21. Bergan T: Bacteriophage typing and serogrouping of *Pseudomonas aeruginosa* from animals. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 80(3):351, 1972
22. Bernhardt TG, Struck DK, Young R: The lysis protein E of phi X174 is a specific inhibitor of the MraY-catalyzed step in peptidoglycan synthesis. *J Biol Chem* 276(9):6093, 2001
23. Bernhardt TG, Wang IN, Struck DK, Young R: A protein antibiotic in the phage Qbeta virion: diversity in lysis targets. *Science* 292(5525):2326, 2001
24. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR: Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70(1):204, 2002
25. Black LW, Hogness DS: The lysozyme of bacteriophage lambda. I. Purification and molecular weight. *J Biol Chem* 244(8):1968, 1969
26. Boyd EF, Brussow H: Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* 10(11):521, 2002
27. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248, 1976
28. Bradley DE: Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol Rev* 31(4):230, 1967
29. Brett PJ, DeShazer D, Woods DE: *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 1:317, 1998
30. Brubaker RR: Factors promoting acute and chronic diseases caused by *yersiniae*. *Clin Microbiol Rev* 4(3):309, 1991
31. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD: Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(3):560, 2004
32. Brussow H, Hendrix RW: Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108(1):13, 2002

33. Carniel E: Evolution of pathogenic *Yersinia*, some lights in the dark. *Adv Exp Med Biol* 529:3, 2003
34. Casjens S: Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* 49(2):277, 2003
35. Centers for Disease Control and Prevention: Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. *Morb Mortal Wkly Rep* 49(4):1, 2000
36. Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, Looareesuwan S, Pitakwatchara N: Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J Infect Dis* 159(5):890, 1989
37. Chen WM, de Faria SM, Stralioetto R, Pitard RM, Simoes-Araujo JL, Chou JH, Chou YJ, Barrios E, Prescott AR, Elliott GN, Sprent JI, Young JP, James EK: Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimoso-nodulating strains from South America. *Appl Environ Microbiol* 71(11):7461, 2005
38. Copeland Aeal. Complete sequence of Chromosome 2 of *Paracoccus denitrificans* PD1222. *JOURNAL Unpublished*. unpublished. 2009.
39. Currie BJ, Fisher DA, Howard DM, Burrow JN, Lo D, Selva-Nayagam S, Anstey NM, Huffam SE, Snelling PL, Marks PJ, Stephens DP, Lum GD, Jacups SP, Krause VL: Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin Infect Dis* 31(4):981, 2000
40. d'Herelle F, Malone RH, LMI: Studies on Asiatic cholera. *Med Res Mem* 14(1):161, 1918
41. d'Herelle F.: Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R Acad Sci Paris* 165(373):375, 1917
42. d'Herelle F.: The Bacteriophage and Its Behavior. p. 540. In Williams, Wilkins (eds): Baltimore, MD, 1926
43. Dance DAB: Melioidosis. p. 925. In G.C.Cook (ed.) (ed): *Manson's tropical diseases*. 1996
44. Daw MA, Falkiner FR: Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron* 27(6):467, 1996
45. de Ruyter PG, Kuipers OP, Meijer WC, de Vos WM: Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. *Nat Biotechnol* 15(10):976, 1997
46. de Vries J, Harms K, Broer I, Kriete G, Mahn A: The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expression a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil- and phytopathogenic bacteria. *Syst Appl Microbiol* 22:280, 2009
47. Dennis C: The bugs of war. *Nature* 411(6835):232, 2001
48. DeShazer D. WDEaNWC: Direct Submission. Submitted. The Institute for Genomic Research. Direct Submission 2007
49. DeShazer D: Genomic diversity of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates: subtractive hybridization reveals a *Burkholderia mallei*-specific prophage in *B. pseudomallei* 1026b. *J Bacteriol* 186(12):3938, 2004

50. Diaz E, Lopez R, Garcia JL: Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20):8125, 1990
51. Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA: Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 49(3):1225, 2005
52. Doyle MP, Erickson MC: Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult Sci* 85(6):960, 2006
53. Drancourt M, Roux V, Dang LV, Tran-Hung L, Castex D, Chenal-Francois V, Ogata H, Fournier PE, Crubezy E, Raoult D: Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerg Infect Dis* 10(9):1585, 2004
54. EBERLE U. Heiler aus der Jauchgrube. *Bild der Wissenschaft* 4, 20-25. 2002.
55. Elliman JR, Owens L: Sequence analysis of bacteriophage Bups phi 1 of *Burkholderia pseudomallei*. Unpublished 2009
56. Ellis DM, Dean DH: Nucleotide sequence of the cohesive single-stranded ends of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage phi 105. *J Virol* 55(2):513, 1985
57. Feinberg AP, Vogelstein B: "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* 137(1):266, 1984
58. Fischetti VA: Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol* 13(10):491, 2005
59. Fischetti VA, Nelson D, Schuch R: Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nat Biotechnol* 24(12):1508, 2006
60. Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, Durkin AS, Huot H, Shrivastava S, Kothari S, Dodson RJ, Mohamoud Y, Khouri H, Roesch LF, Krogfelt KA, Struve C, Triplett EW, Methe BA: Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet* 4(7):e1000141, 2008
61. Gaeng S, Scherer S, Neve H, Loessner MJ: Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 66(7):2951, 2000
62. Gage KL, Kosoy MY: Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu Rev Entomol* 50:505, 2005
63. Garcia P, Garcia JL, Garcia E, Sanchez-Puelles JM, Lopez R: Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene* 86(1):81, 1990
64. Glass MB, Gee JE, Steigerwalt AG, Cavuoti D, Barton T, Hardy RD, Godoy D, Spratt BG, Clark TA, Wilkins PP: Pneumonia and septicemia caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States. *J Clin Microbiol* 44(12):4601, 2006
65. Godoy D, Randle G, Simpson AJ, Aanensen DM, Pitt TL, Kinoshita R, Spratt BG: Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative

- agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J Clin Microbiol 41(5):2068, 2003
66. Goodridge L, Chen J, Griffiths M: Development and characterization of a fluorescent-bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol 65(4):1397, 1999
 67. Goodridge LD: Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: fact or fiction? Trends Biotechnol 22(8):384, 2004
 68. Grishkina TA, Merinova LK: [Spontaneous phage production in *Pseudomonas pseudomallei* and in a range of hosts of melioidosis phages among representatives in the genus *Pseudomonas*]. Mikrobiol Z 55(4):43, 1993
 69. Gual A, Camacho AG, Alonso JC: Functional analysis of the terminase large subunit, G2P, of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. J Biol Chem 275(45):35311, 2000
 70. Guiyoule A, Grimont F, Itean I, Grimont PA, Lefevre M, Carniel E: Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. J Clin Microbiol 32(3):634, 1994
 71. Hayashi T, Matsumoto H, Ohnishi M, Terawaki Y: Molecular analysis of a cytotoxin-converting phage, phi CTX, of *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the attP-cos-ctx region and integration into the serine tRNA gene. Mol Microbiol 7(5):657, 1993
 72. Heesemann J, Brandis H: Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. p. 315. In Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G (eds): Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag; 2001
 73. Helander IM: Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. Trends in Foods Science & Technology 8(146):150, 1997
 74. Holden MT: Direct Submission. 2007. The Pathogen Sequencing Unit, The Wellcome Trust Sanger Institute, The Wellcome Trust Genome Campus, CB10 1SA, UNITED KINGDOM 2007
 75. Holden MT, Seth-Smith HM, Crossman LC, Sebahia M, Bentley SD, Cerdeno-Tarraga AM, Thomson NR, Bason N, Quail MA, Sharp S, Cherevach I, Churcher C, Goodhead I, Hauser H, Holroyd N, Mungall K, Scott P, Walker D, White B, Rose H, Iversen P, Mil-Homens D, Rocha EP, Fialho AM, Baldwin A, Dowson C, Barrell BG, Govan JR, Vandamme P, Hart CA, Mahenthiralingam E, Parkhill J: The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. J Bacteriol 191(1):261, 2009
 76. Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeno-Tarraga AM, Atkins T, Crossman LC, Pitt T, Churcher C, Mungall K, Bentley SD, Sebahia M, Thomson NR, Bason N, Beacham IR, Brooks K, Brown KA, Brown NF, Challis GL, Cherevach I, Chillingworth T, Cronin A, Crossett B, Davis P, DeShazer D, Feltwell T, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Keith KE, Maddison M, Moule S, Price C, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Simmonds M, Songsivilai S, Stevens K, Tumapa S, Vesaratchavest M, Whitehead S, Yeats C, Barrell BG, Oyston PC, Parkhill J: Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. Proc Natl Acad Sci U S A 101(39):14240, 2004
 77. Howe C, Sampath A, Spotnitz, M.: The *pseudomallei* group: a review. J Infect Dis 124(598):606, 1971

78. Howe C: Glanders. p. 185. In Christian H.A. (ed): The Oxford medicine. Oxford University Press; New York, 1950
79. Howe C, Miller WR: Human glanders: report of six cases. *Ann Intern Med* 26(93):115, 1947
80. Huang A, Friesen J, Brunton JL: Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of Shiga-like toxin 1 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169(9):4308, 1987
81. Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Koerner JF, Layton M, McDade J, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Schoch-Spana M, Tonat K: Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA* 283(17):2281, 2000
82. Jennings WE: Glanders. p. 264. In Hull TG, Charles C. Thomas (eds): Diseases transmitted from animals to man. Springfield, Ill, 1963
83. Jochmann G, Hegeler C: Rotz (Malleus). p. 992. *Lehrbuch der Infektionskrankheiten*. Springer; Berlin, 1924
84. Juhala RJ, Ford ME, Duda RL, Youton A, Hatfull GF, Hendrix RW: Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdaoid bacteriophages. *J Mol Biol* 299(1):27, 2000
85. Kakikawa M, Yokoi KJ, Kimoto H, Nakano M, Kawasaki K, Taketo A, Kodaira K: Molecular analysis of the lysis protein Lys encoded by *Lactobacillus plantarum* phage phig1e. *Gene* 299(1-2):227, 2002
86. Kapperud G: *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int J Food Microbiol* 12(1):53, 1991
87. Kawaoka Y, Mitani T, Otsuki K, Tsubokura M: Isolation and use of eight phages for typing *Yersinia enterocolitica* O3. *J Med Microbiol* 23(4):349, 1987
88. Khosla C, Harbury PB: Modular enzymes. *Nature* 409(6817):247, 2001
89. Kim WS, Salm H, Geider K: Expression of bacteriophage phiEa1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 150(Pt 8):2707, 2004
90. Kodikara CP, Crew HH, Stewart GS: Near on-line detection of enteric bacteria using lux recombinant bacteriophage. *FEMS Microbiol Lett* 67(3):261, 1991
91. Koh TH, Yong Ng LS, Foon Ho JL, Sng LH, Wang GC, Tzer Pin Lin RV: Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 41(4):1809, 2003
92. Koirala J: Plague: disease, management, and recognition of act of terrorism. *Infect Dis Clin North Am* 20(2):273, viii, 2006
93. Kutter E. Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics. . 1-17. 1997.
94. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680, 1970

95. Langley R, Kenna DT, Vandamme P, Ure R, Govan JR: Lysogeny and bacteriophage host range within the *Burkholderia cepacia* complex. J Med Microbiol 52(Pt 6):483, 2003
96. Lavigne R, Briers Y, Hertveldt K, Robben J, Volckaert G: Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme. Cell Mol Life Sci 61(21):2753, 2004
97. Leive L: Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of E. coli. Biochem Biophys Res Commun 21(4):290, 1965
98. Lertpatanasuwan N, Sermsri K, Petkaseam A, Trakulsomboon S, Thamlikitkul V, Suputtamongkol Y: Arabinose-positive *Burkholderia pseudomallei* infection in humans: case report. Clin Infect Dis 28(4):927, 1999
99. Little JW, Mount DW, Yanisch-Perron CR: Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. Proc Natl Acad Sci U S A 78(7):4199, 1981
100. Loeffler JM, Fischetti VA: Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. Antimicrob Agents Chemother 47(1):375, 2003
101. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA: Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. Science 294(5549):2170, 2001
102. Loessner MJ: Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. Curr Opin Microbiol 8(4):480, 2005
103. Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, Scherer S: C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. Mol Microbiol 44(2):335, 2002
104. Loessner MJ, Maier SK, Uebek-Puza H, Wendlinger G, Scherer S: Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. J Bacteriol 179(9):2845, 1997
105. Loessner MJ, Schneider A, Scherer S: A new procedure for efficient recovery of DNA, RNA, and proteins from *Listeria* cells by rapid lysis with a recombinant bacteriophage endolysin. Appl Environ Microbiol 61(3):1150, 1995
106. Loessner MJ, Wendlinger G, Scherer S: Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. Mol Microbiol 16(6):1231, 1995
107. Lucas Seal: Complete sequence of chromosome of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060. Unpublished 2009
108. Lukashin AV, Borodovsky M: GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. Nucleic Acids Res 26(4):1107, 1998
109. Mahdi AA, Sharples GJ, Mandal TN, Lloyd RG: Holliday junction resolvases encoded by homologous *rusA* genes in *Escherichia coli* K-12 and phage 82. J Mol Biol 257(3):561, 1996

110. Manzenink Oleal: Identification of *Pseudomonas mallei* bacteria with the help of *Pseudomonas pseudomallei* bacteriophages (In Russian.). *Microbiologija* 63(537):544, 1994
111. McCormick JB, Sexton DJ, McMurray JG, Carey E, Hayes P, Feldman RA: Human-to-human transmission of *Pseudomonas pseudomallei*. *Ann Intern Med* 83(4):512, 1975
112. McGovern TW, Christopher GW, Eitzen EM: Cutaneous manifestations of biological warfare and related threat agents. *Arch Dermatol* 135(3):311, 1999
113. Mobley JA: Biological warfare in the twentieth century: lessons from the past, challenges for the future. *Mil Med* 160(11):547, 1995
114. Mulligan ME, Hawley DK, Enriken R, McClure WR: *Escherichia coli* promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity. *Nucleic Acids Res* 12(1 Pt 2):789, 1984
115. Nakai T, Park SC: Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res Microbiol* 153(1):13, 2002
116. Nattermann H, Horsch F. Neue Erkenntnisse zur *Yersinia enterocolitica*-Infektion des Schweines. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. Jahrestagung, Schloß Rauschholzhausen , 251-259. 1994.
117. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA: Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A *streptococci* by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):4107, 2001
118. Neubauer H: Zoonosen in Deutschland. *Dt TÄbl* 56 :1342, 2008
119. Neubauer H, Meyer H, Finke EJ: Human glanders. *Revue Internationale des Services de Sante´ des Forces Armé´es* 70(258):265, 1997
120. Neubauer H, Sprague LD, Zacharia R, Tomaso H, Al DS, Wernery R, Wernery U, Scholz HC: Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(5):201, 2005
121. Nikaido H, Vaara M: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49(1):1, 1985
122. Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori KI, Nakai T: Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol* 66(4):1416, 2000
123. Perl D, Mueller U, Heinemann U, Schmid FX: Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol* 7(5):380, 2000
124. Raettig H: Bakteriophagie 1917-1956: Zugleich ein Vorschlag zur Dokumentation wissenschaftlicher Literatur. G. Fischer, Stuttgart, 1958
125. Rao GR, Burma DP: Purification and properties of phage P22-induced lysozyme. *J Biol Chem* 246(21):6474, 1971
126. Read TDeal: Submitted. *Genomics* 2007

127. Redfearn MS, Palleroni NJ, Stanier RY: A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. J Gen Microbiol 43(2):293, 1966
128. Ritchie DA, Thomas CA, Jr., MacHattie LA, Wensink PC: Terminal repetition in non-permuted T3 and T7 bacteriophage DNA molecules. J Mol Biol 23(3):365, 1967
129. Rogul M, Brendle JJ, Haapala DK, Alexander AD: Nucleic acid similarities among *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas multivorans*, and *Actinobacillus mallei*. J Bacteriol 101(3):827, 1970
130. Rosebury T, Kabat EA: Bacterial warfare. A critical analysis of the available agents, their possible military applications, and the means for protection against them. J Immunol 56(7-96) 1947
131. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM: Public health assessment of potential biological terrorism agents. Emerg Infect Dis 8(2):225, 2002
132. Saint-Blancard J, Maurel JP, Constant JF, Berthou J, Jolles P: Influence of pH and ionic strength on the lysis of *Micrococcus luteus* cells by hen lysozyme at low (20 degree C) and high (physiological, 40 degree C) temperature. Biosci Rep 1(2):119, 1981
133. Sambrook J, Fritsch T, Maniatis T: Molecular cloning . A laboratory manual. p. 73. Molecular cloning . A laboratory manual. Laboratory Press; Cold Spring Harbor, 1989
134. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74(12):5463, 1977
135. Sao-Jose C, Parreira R, Vieira G, Santos MA: The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. J Bacteriol 182(20):5823, 2000
136. Schlater LK: Glanders. p. 761. In Robinson NE, Suanders WB (eds): *Current Therapy in Equine Medicine*. St. Louis, MO, 1992
137. Schlegel: Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, 1992
138. Schmiel DH, Miller VL: Bacterial phospholipases and pathogenesis. Microbes Infect 1(13):1103, 1999
139. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA: A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. Nature 418(6900):884, 2002
140. Schwudke D, Ergin A, Michael K, Volkmar S, Appel B, Knabner D, Konietzny A, Strauch E: Broad-host-range *Yersinia* phage PY100: genome sequence, proteome analysis of virions, and DNA packaging strategy. J Bacteriol 190(1):332, 2008
141. Seed KD, Dennis JJ: Isolation and characterization of bacteriophages of the *Burkholderia cepacia* complex. FEMS Microbiol Lett 251(2):273, 2005
142. Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ: Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. Appl Environ Microbiol 72(8):5359, 2006
143. Smith P.B., Cherry W.B.: Identification of *Malleomyces* by specific bacteriophages. J Bacteriol 74(5):668, 1957

144. Smith MD, Angus BJ, Wuthiekanun V, White NJ: Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 65(10):4319, 1997
145. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3):503, 1975
146. Srinivasan A, Kraus CN, DeShazer D, Becker PM, Dick JD, Spacek L, Bartlett JG, Byrne WR, Thomas DL: Glanders in a military research microbiologist. *N Engl J Med* 345(4):256, 2001
147. Stormo GD, Schneider TD, Gold LM: Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 10(9):2971, 1982
148. Strauch E, Kaspar H, Schaudinn C, Dersch P, Madela K, Gewinner C, Hertwig S, Wecke J, Appel B: Characterization of enterocolicin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *Appl Environ Microbiol* 67(12):5634, 2001
149. Studier FW, Moffatt BA: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189(1):113, 1986
150. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW: Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185:60, 1990
151. Summer EJ, Gill JJ, Upton C, Gonzalez CF, Young R: Role of phages in the pathogenesis of *Burkholderia*, or 'Where are the toxin genes in *Burkholderia* phages?'. *Curr Opin Microbiol* 10(4):410, 2007
152. Summer EJ, Gonzalez CF, Bomer M, Carlile T, Embry A, Kucherka AM, Lee J, Mebane L, Morrison WC, Mark L, King MD, LiPuma JJ, Vidaver AK, Young R: Divergence and mosaicism among virulent soil phages of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* 188(1):255, 2006
153. Summer EJ, Gonzalez CF, Carlisle T, Mebane LM, Cass AM, Savva CG, LiPuma J, Young R: *Burkholderia cenocepacia* phage BcepMu and a family of Mu-like phages encoding potential pathogenesis factors. *J Mol Biol* 340(1):49, 2004
154. Summer EJ. Complete genomic sequence of phage BcepNY3, a new member of the *Burkholderia* phage Bcep781 . 2007.
155. Szewczyk B, Skorko R: Lysozyme activity of bacteriophage T4 ghosts. *Biochim Biophys Acta* 662(1):131, 1981
156. Tomaso H, Scholz HC, Al DS, Eickhoff M, Treu TM, Wernery R, Wernery U, Neubauer H: Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting *fliP* for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clin Chem* 52(2):307, 2006
157. Tomaso H, Scholz HC, Al DS, Pitt TL, Treu TM, Neubauer H: Development of 5' nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *Burkholderia mallei*/*Burkholderia pseudomallei* complex. *Diagn Mol Pathol* 13(4):247, 2004
158. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350, 1979

159. Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J: Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 36(9):2557, 1998
160. Trempy JE, Kirby JE, Gottesman S: Alp suppression of Lon: dependence on the slpA gene. *J Bacteriol* 176(7):2061, 1994
161. Tuler TR, Callanan MJ, Klaenhammer TR: Overexpression of peptidases in *Lactococcus* and evaluation of their release from leaky cells. *J Dairy Sci* 85(10):2438, 2002
162. Tyler SD, Strathdee CA, Rozee KR, Johnson WM: Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. *Clin Diagn Lab Immunol* 2(4):448, 1995
163. Vellani TS, Myers RS: Bacteriophage SPP1 Chu is an alkaline exonuclease in the SynExo family of viral two-component recombinases. *J Bacteriol* 185(8):2465, 2003
164. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG: Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol* 94(2):240, 2003
165. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG: Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 55(2):98, 2003
166. Wang IN, Smith DL, Young R: Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol* 54:799, 2000
167. Watson BB, Eveland WC: The application of the phage-fluorescent antiphage staining system in the specific identification of *Listeria monocytogenes*. I. Species specificity and immunofluorescent sensitivity of *Listeria monocytogenes* phage observed in smear preparations. *J Infect Dis* 115(4):363, 1965
168. Weaver LH, Matthews BW: Structure of bacteriophage T4 lysozyme refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 193(1):189, 1987
169. Weigel D: The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain. *Plant Cell* 7(4):388, 1995
170. Wheelis M: First shots fired in biological warfare. *Nature* 395(6699):213, 1998
171. White NJ: Melioidosis. *Lancet* 361(9370):1715, 2003
172. WHO. Health Aspects of Chemical and Biological Weapons: Report of a WHO Group of Consultants. 1970. Geneva, World Health Organization.
173. Wiersinga WJ, de Vos AF, de BR, Wieland CW, Roelofs JJ, Woods DE, van der PT: Inflammation patterns induced by different *Burkholderia* species in mice. *Cell Microbiol* 10(1):81, 2008
174. Wilkinson L: Glanders: medicine and veterinary medicine in common pursuit of a contagious disease. *Med Hist* 25(4):363, 1981

175. Williams KP: Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies. *Nucleic Acids Res* 30(4):866, 2002
176. Williams RJ: Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections with pyocines. *J Med Microbiol* 9(2):153, 1976
177. Withey S, Cartmell E, Avery LM, Stephenson T: Bacteriophages--potential for application in wastewater treatment processes. *Sci Total Environ* 339(1-3):1, 2005
178. Wittig MB, Wohlsein P, Hagen RM, Al DS, Tomaso H, Scholz HC, Nikolaou K, Wernery R, Wernery U, Kinne J, Elschner M, Neubauer H: [Glanders--a comprehensive review]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 113(9):323, 2006
179. Woods DE, Jeddelloh JA, Fritz DL, DeShazer D: *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a temperate bacteriophage specific for *Burkholderia mallei*. *J Bacteriol* 2002 Jul ;184 (14):4003 -17 184(14):4003,
180. Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DA, Walsh AL, Pitt TL, White NJ: Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J Med Microbiol* 45(6):408, 1996
181. Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DA, White NJ: Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89(1):41, 1995
182. Yabuuchi E, Kawamura Y, Ezaki T, Ikedo M, Dejsirilert S, Fujiwara N, Naka T, Kobayashi K: *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. *Microbiol Immunol* 44(4):307, 2000
183. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M: Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36(12):1251, 1992
184. Yersin A: [Bubonic plague in Hong Kong. 1894]. *Rev Med Suisse Romande* 114(5):393, 1994
185. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA: Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* 186(14):4808, 2004
186. Young I, Wang I, Roof WD: Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* 8(3):120, 2000
187. Young R: Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev* 56(3):430, 1992
188. Young R, Blasi U: Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev* 17(1-2):191, 1995
189. Zietz BP, Dunkelberg H: The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. *Int J Hyg Environ Health* 207(2):165, 2004

190. Zimmer M, Vukov N, Scherer S, Loessner MJ: The murein hydrolase of the bacteriophage phi3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Appl Environ Microbiol* 68(11):5311, 2002
191. Zor T, Selinger Z: Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* 236(2):302, 1996

6. Anhang

6.1 Vektorkarten

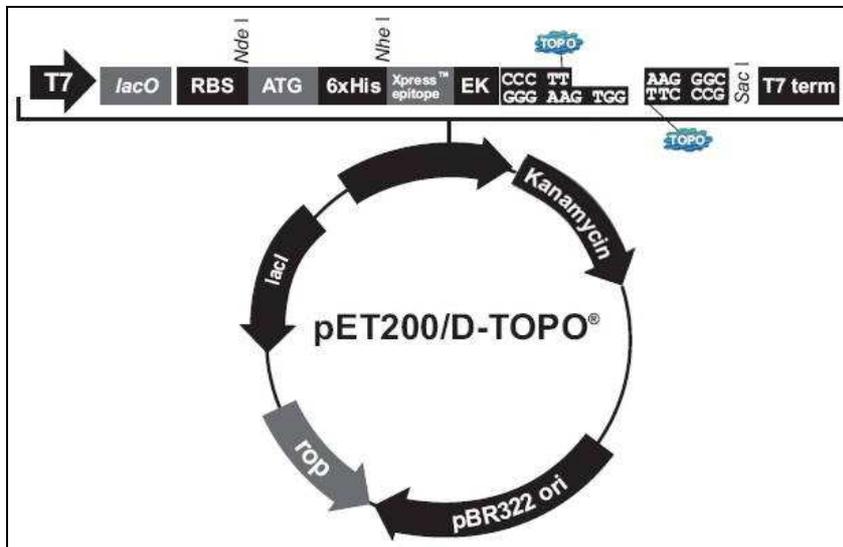


Abb. 6-1: Physikalische Karte des Expressionsvektors pET200/D-TOPO. Zur Expression wurde das Plasmid in den *E. coli*-Stamm BL21 Star™ (DE3) transformiert. *lacO* = lac-Operator, *lacI* = lac-Repressor, RBS = Ribosomenbindestelle, EK = Enterokinase-Erkennungsstelle, *rop* = erleichtert „low-copy“-Replikation in *E. coli*

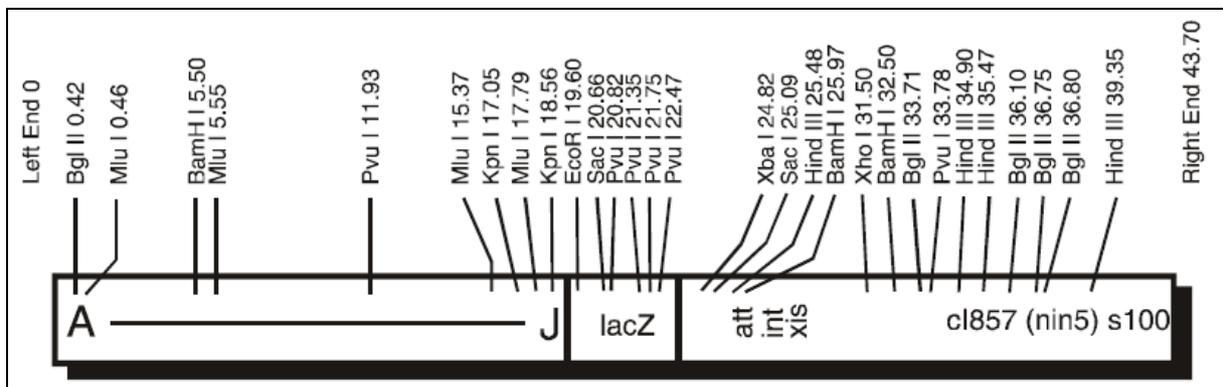


Abb. 6-2: Physikalische Karte des mit *EcoRI* linearisierten λ gt11 Vektors. Der Vektor hat eine Mutation im S-Gen, welches für das λ -Holin kodiert. Auf Grund diesen Defekts ist der Phage λ gt11 nicht befähigt Einzelplaques im Spotttest zu erzeugen. Durch eine Integration des putativen PY100-Holins (kodiert durch ORF49) des PY100 Phagen in die *EcoRI* Schnittstelle des Vektors von λ gt11, und anschließendem „Verpacken“ mit Hilfe des „ λ DNA packaging extracts“ (Stratagene) sollte der erzeugte Phage durch die Komplementation des defekten Holins wieder voll funktionsfähig sein.

6.2 Wirtsspektren der Phagen (detaillierte Tabellen)

Tab. 6-1: Wirtsspektren der isolierten Phagen aus *B. thailandensis*.

Phagenlysat Wirtstamm	phi058	phi067	phi131	phi202
<i>B. pseudomallei</i> (12)	+	+	+	-
	- (Bp2, Bp5)		- (Bp2, Bp5)	
<i>B. mallei</i> (13)	+	-	+	-
	(Bm6, Bm7, Bm10) -		(Bm6, Bm7, Bm10) -	
<i>B. thailandensis</i> (12)	+	+	+	-
	- (E058, E131)	- (E067)	- (E058, E131)	
<i>Burkholderia</i> Spezies: <i>B. ambifaria</i> <i>B. anthina</i> <i>B. cenocepacia</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. delosa</i> <i>B. gladiolo</i> <i>B. multivorans</i> <i>B. pickettii</i> ATCC 49129 <i>B. pyrrocinia</i> <i>B. stabilis</i> CCUG 13348 <i>B. vietnamensis</i> (2)	-	-	-	-
weitere Bakterien Spezies: <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Citrobacter youngae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> P99 <i>E. coli</i> (6) <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3) <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Streptomonas maltophila</i> <i>Yersina enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	-	-

Ein „+“ signalisiert die Plaquebildung im Spotttest, ein „-“ keine Plaquebildung auf den getesteten Wirtsstämmen durch die jeweiligen Kulturüberstände. In Klammern die nicht lysierten Stämme.

Tab. 6-2: Wirtspektren der isolierten Phagen aus *B. pseudomallei*.

Phagenlysate Wirtstamm	phiBp2	phi Bp10	phi Bp12
<i>B. pseudomallei</i> (12)	-	+ - (Bp4,Bp5, Bp6, Bp7, Bp9, Bp10, Bp12)	+ - (Bp4,Bp5, Bp6, Bp7, Bp9, Bp10, Bp12)
<i>B. mallei</i> (12)	-	+	+
<i>B. thailandensis</i> (12)	-	-	-
Burkholderia Spezies: <i>B. ambifaria</i> <i>B. anthina</i> <i>B. cenocepacia</i> <i>B. cepacia</i> <i>B. delosa</i> <i>B. gladiolo</i> <i>B. multivorans</i> <i>B. pickettii</i> ATCC 49129 <i>B. pyrrocinia</i> <i>B. stabilis</i> CCUG 13348 <i>B. vietnamensis</i> (2)	-	-	-
weitere Spezies: <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Citrobacter youngae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> P99 <i>E. coli</i> (6) <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3) <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Streptomonas maltophila</i> <i>Yersina enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	-

Ein „+“ signalisiert die Plaquebildung im Spotttest, ein „-“ keine Plaquebildung auf den getesteten Wirtstämmen durch die jeweiligen Kulturüberstände. In Klammern die nicht lysierten Stämme.

6.3 Bioinformatische Analyse der *phiE067* Genprodukte (alle ORFs)

Tab. 6-3: Offene Leserahmen (ORF), potentielle Funktionen und signifikante Homologien der Aminosäuresequenzen des *phiE067* Phagen-Genoms.

ORF Nr.	Start – Stop	Größe (AS)	Potentielle Funktion	Signifikante Homologien
1	1 – 177	59	-	hypothetical protein Nazgul23 [<i>Burkholderia</i> phage BcepNazgul]
2	174 – 449	92	-	hypothetical protein spyM18_1475 [<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS8232]
3	446 – 613	56	-	hypothetical protein Bcep1808_4507 [<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4]
4	610 – 1929	440	-	Bcep22gp31 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep22]
5	1977 – 2828	284	Transkriptionsregulator	transcriptional regulator, Fis family [<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222]
6	2851 – 3024	58	-	-
7	3021 – 3701	227	Endonuklease	phage-type endonuclease [<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060]
8	3730 – 4323	198	-	hypothetical protein Rpic_2346 [<i>Ralstonia pickettii</i> 12J]
9	4481 – 4825	115	-	gp46 [<i>Burkholderia</i> phage phi1026b]
10	4822 – 6117	432	-	gp38 [Bacteriophage phiE125]
11	6117 – 6500	128	-	-
12	6497 – 6895	133	-	hypothetical protein BpseP_03003568 [<i>Burkholderia pseudomallei</i> Pasteur]
13	6892 – 7140	83	-	protein of unknown function DUF551 [<i>Serratia proteamaculans</i> 568]
14	7170 – 7502	111	-	hypothetical protein Bxe_B1549 [<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400]
15	7514 – 7732	73	Transkriptionsregulator	prophage CP4-57 regulatory protein (AlpA) [<i>Burkholderia pseudomallei</i>]
16	7701 – 8948	416	Integrase	Integrase [<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 13177]
17	9219 – 9401	61	-	hypothetical protein BURPS668_A2333 [<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668]
18	9412 – 9732	107	-	hypothetical protein BURPS668_A2334 [<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668]
19	9729 – 10547	273	Endolysin	Phage-related lysozyme [<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668]
20	10528 – 10821	98	Holin	-

Tab. 6-3 (Fortsetzung): Offene Leserahmen (ORF), potentielle Funktionen und signifikante Homologien der Aminosäuresequenzen des phiE067 Phagen-Genoms.

ORF Nr.	Start – Stop	Größe (AS)	Potentielle Funktion	Signifikante Homologien
21	11372 – 11641	90	-	hypothetical protein Bpse38_36199 [<i>Burkholderia thailandensis</i> MSMB43]
22	11782 – 12381	200	Lipase (GDSL-Familie)	lipolytic protein G-D-S-L family [<i>Burkholderia phymatum</i> STM815]
23	12449 – 13519	357	Acetyltransferase	acetyltransferase [<i>Burkholderia pseudomallei</i> DM98]
24	13656 – 15659	668	Schwanzfiber	tail fiber protein [<i>Burkholderia</i> phage BcepNY3]
25	15694 – 16353	220	-	gp32 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781] <i>Enterobacteria</i> phage T1]
26	16354 – 17535	394	Basalplatte	putative baseplate protein [<i>Pseudomonas</i> phage SN]
27	17601 – 17951	117	-	gp53 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep1]
28	17951 – 18706	252	Basalplatte	phage P2 baseplate assembly protein gpV [<i>E. coli</i> 53638]
29	18696 – 19565	290	-	gp38 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
30	19562 – 19864	101	-	gp50 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
31	19864 – 20481	206	-	gp45 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
32	20540 – 22408	623	Schwanzstruktur Protein („tale tape measure protein“)	Phage-related tail protein [<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H]
33	22411 – 22566	52	-	hypothetical protein Saentericaenterica_23845 [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. SL317]
34	22581 – 23021	147	-	hypothetical protein Sentente_26038 [<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Saintpaul str. SARA29]
35	23023 – 23427	135	-	gp03 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
36	23468 – 24778	437	-	gp04 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
37	24968 – 25513	182	-	BcepNY3gp04 [<i>Burkholderia</i> phage BcepNY3]
38	25521 – 25910	130	-	gp06 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
39	25907 – 26368	154	-	gp07 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep1]
40	26355 – 26777	141	-	gp08 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep1]
41	26777 – 27184	136	-	gp09 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep1]
42	27186 – 28196	337	Großes Kapsid Protein	major capsid protein [<i>Burkholderia</i> phage BcepNY3]
43	28193 – 28669	159	-	gp13 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep781]
44	28682 – 29836	385	-	gp14 [<i>Burkholderia cepacia</i> phage Bcep781]
45	29898 – 30707	270	Phagen Kapsid Protein	head protein [<i>Burkholderia</i> phage BcepNY3]
46	30707 – 32338	544	Kleines Kapsid Protein	minor head protein-like protein [<i>Burkholderia ambifaria</i> phage BcepF1]

Tab. 6-3 (Fortsetzung): Offene Leserahmen (ORF), potentielle Funktionen und signifikante Homologien der Aminosäuresequenzen des phiE067 Phagen-Genoms.

ORF Nr.	Start – Stop	Größe (AS)	Potentielle Funktion	Signifikante Homologien
47	32356 – 32613	86	-	-
48	32989 – 34371	461	Terminase (Große UE)	phage large terminase subunit [<i>Salmonella</i> phage E1]
49	34469 – 34843	122	-	conserved hypothetical phage protein [<i>Salmonella</i> phage E1]
50	34986 – 35315	110	-	p26 [<i>Burkholderia pseudomallei</i> Pasteur 52237]
51	35331 – 35564	78	-	Bcep22gp19 [<i>Burkholderia</i> phage Bcep22]
52	35561 – 36034	158	Transkriptionsfaktor (ERF)	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF protein [<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4]
53	36037 – 36525	163	Rekombinase	endodeoxyribonuclease RusA [<i>Burkholderia phymatum</i> STM815]
54	36519 – 36839	107	-	-
55	36836 – 37018	61	-	-
56	37015 – 37203	63	-	-
57	37200 – 37535	112	-	hypothetical protein BgramDRAFT_4627 [<i>Burkholderia</i> <i>graminis</i> C4D1M]
58	37532 – 37741	70	-	-
59	37738 – 38484	249	-	conserved hypothetical protein [<i>Burkholderia graminis</i> C4D1M]
60	38488 – 39558	357	-	hypothetical protein BDAG_01684 [<i>Burkholderia dolosa</i> AUO158]
61	39555 – 39923	123	-	hypothetical protein EhV330 [<i>Emiliana huxleyi</i> virus 86]
62	40019 – 40102	28	-	-
63	40099 – 40308	70	-	hypothetical protein BURPS668_A2364 [<i>Burkholderia</i> <i>pseudomallei</i> 668]
64	40305 – 40541	79	-	hypothetical protein BpseN_34345 [<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 13177]
65	40538 – 40768	77	-	-
66	40864 – 41625	254	Repressor	putative phage repressor [<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616]
67	42221 – 42430	70	-	-
68	42624 – 43079	152	-	hypothetical protein BdolA_01001842 [<i>Burkholderia</i> <i>dolosa</i> AUO158]
69	43081 – 43212	44	-	-

6.4 DNA- und Aminosäuresequenzen der identifizierten Endolysine

6.4.1 DNA-Sequenz *plyE067*

9729-ATGGCGATGGCGCTCAGTGACCTGTTTCGGCGCGCTCGCGCGGCTGTTTCGGCGTGAACCCGGCGCCGGTTCG
 TCGACGTGCCGACGTCCGCGATCGAGTCGGCGAAAATGGACATCGCGGGTCCGCGGTACCGCTTCCGGCCGCTC
 CTGATACGGGTTTGGCGGTGGGTGGTGCAGAAATCGCGCCGGCTGTACCGCAAACGTTCCATCCGGTACGGATG
 ACGGGGCGTGGCTGGCACTCTGCCGCCGCTGTGCGAGCACTTCGAGAGCTGCTACCTACCGCATATCCGGATC
 CAGCATCGGATCTCGGCAAAGCGCTGCAGGCGCGCGCCTCTGGTACAAGGTGCTCGGCGGCGCGCCATCCCGA
 ACGATCCCCTCTGCGCGCACTGAGCGGCGCACCGTGGACATGCGGGTGGGGCTCGACGGGCCCGGACGTGCGTG
 AGGGCACGGTCTGGACGCAAGCCACGGCCGACGCGCGGACGACGCGAACCTCCGCGCCTCGGCGGCGCTCGTCCG
 ACCAGGCCGCGCGTGTGCCGCTGTGCGCGCAGCAGAAGGCCGCGCTCGTCAGCATCGTGAACAACGTCGGGCCAG
 GCCGCGCGCGGCGCGTGAACGATCCTGGTCCGGACGGCATCATCACGCTCGCCAGCGGGCAGCCGTCGACGCTGT
 TCGGACACCTGAACATCGGCGACATGGCCGGCGCGGCCGATCAGTTTCCGCGTGAACCCGCGCGGGCGGTGTCG
 TGCTGCCGGTCTCGTGCGCCGCGCGCAGCCGAGCGCGATCTTCTCCTACCGGTGCATGGAGCGACGCATGA-
 10547

6.4.2 Aminosäuresequenz *PlyE067*

MAMALSDLFGALARLFGVNPAPVVDVPTSAIESAKMDIAGSAVPLPAAPDTGLAVGGAEIAPAVPQNVPSGTTDDG
 AWLALCRPLSQHFESCYLTAYPDPAASDLGKALQARGLWYKVLGGAPIPNDPALRALSGAPWTCGWGSTGPDVREG
 TVWTQATADARHDANLRASAALVDQAARVPLSPQQAALVSI VNNVGPGRARRVNDPGRDGIITLASGQPSTLLR
 HLNIGDMAGAADQFPawnRAGGVVLPGLVRRRAAERDLFLTGAWSDA

6.4.3 Allignment Aminosäuresequenz

PlyE067	1	MAMALSDLFGALARLFGVNPAPVVDVPTSAIESAKMDIAGSAVPLPAAPD	
Bp. 668 Lysozym	1		:.....:..... mgsdgaargmnvvdvtssstktdd
PlyE067	51	TGLAVGGAEIAPAVPQNVPSGTTDDGAWLALCRPLSQHFESCYLTAYPDPA	
Bp. 668 Lysozym	26	taaadtsamggaaavknv-sdaddaw-a-c--r-s-h-scy-tay-d-a:
PlyE067	101	SDLGKALQARGLWYKVLGGAPIPNDPALRALSGAPWTCGWGSTGPDVREG	. . : . . :
Bp. 668 Lysozym	65	-s-gk-a-arg-wyk-v-gg-a-sd-a-ra-sga-wtcgwstg-dvr-g	
PlyE067	151	TVWTQATADARHDANLRASAALVDQAARVPLSPQQAALVSI VNNVGPGR	. . : . . : ..
Bp. 668 Lysozym	100	tvwt-atadarhdan-ra-aaa-d-aa-r-v-s-akaamts-vnnvgagr	
PlyE067	201	ARRVNDPGRDGIITLASGQPSTLLRHLNIGDMAGAADQFPawnRAGGVVLPGLVRRRAAERDLFLTGAWSDA :
Bp. 668 Lysozym	140	arragd-grdg--t-as-g-s-t-rh-n-gd-ag-aa-d-awnragg-vv	
PlyE067	251	PGLVRRRAAERDLFLTGAWSDA :
Bp. 668 Lysozym	175	-g-vrrr-aa-r-d-tghwsas	
Länge (AS):	272		
Identität:	121/272 (44.5%)		
Similarität:	131/272 (48.2%)		
Lücken:	82/272 (30.1%)		

Abb. 6-3: Allignment der Aminosäuresequenz von *PlyE067* und einem „Phage-related lysozyme“ [ref|YP_001063329.1] von *B. pseudomallei* 668], das bei NCBI die höchste Homologie aufweist.

7. Danksagung

Bei Frau Dr. Daniela Jacob bedanke ich mich herzlich für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit, die nützlichen fachlichen Diskussionen und das ausführliche Korrekturlesen der schriftlichen Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. Roland Grunow danke ich sehr für die Möglichkeit, die Doktorarbeit unter seiner Leitung anzufertigen, die Verlängerung der Finanzierung, die Übernahme des Erstgutachtens und für die hilfreichen fachlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel bin ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sehr dankbar.

Für die Überlassung des interessanten Themas bin ich Herrn Prof. Dr. Bernd Appel, der inzwischen am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) tätig ist, sehr dankbar.

Herrn Dr. Michael Laue vom RKI, Berlin danke ich für die vielen exzellenten elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die dafür aufgebrauchte Zeit.

Dr. Tyrone Pitt von der „Health Protection Agency“ (HPA) in London und Prof. Dr. Donald Woods von der „University of Calgary“ bin ich für die Bereitstellung vieler bakterieller Stämme, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglichten, sehr dankbar.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Stefan Hertwig und Jens Hammerl vom BfR, die mit ihrer Phagen-Expertise eine immense fachliche Unterstützung waren und dadurch auch immer mal wieder für Motivationsschübe gesorgt haben. Die angenehm lustige Atmosphäre am BfR bereitete mir immer sehr gute Laune. Außerdem danke ich Dr. Eckhard Strauch, ebenfalls vom BfR, für die Bereitstellung des Phagen PY100 und die damit verbundene Möglichkeit zur Mitarbeit an der Veröffentlichung.

Ganz besonders danke ich Iris Klein und Beate Meister für die Zusammen- und Mitarbeit bei praktischen Tätigkeiten, die maßgeblich dazu beigetragen haben, die Arbeit zu komplettieren.

Dem gesamten Personal des ZBS2 danke ich für eine unglaublich tolle Zeit, in der ich mich mit all meinen charakterlichen Eigenschaften absolut uneingeschränkt einbringen konnte. So ließ sich auch durch einen „Moonwalk“ quer durchs Labor niemand aus der Ruhe bringen. Die vielen Unterhaltungen fachlicher als auch privater Natur, sowohl auf der Arbeit als auch im Zuge privater Feiern, waren stets eine große Bereicherung.

Unendlich dankbar bin ich meiner Familie, die mich Zeit meines Lebens in jeglicher Hinsicht unterstützt und mich hierhin gebracht hat. Außerdem bin ich sehr glücklich darüber, eine so tolle Frau an meiner Seite zu haben. Danke, dass ich für dich da sein darf und du es auch für mich bist!

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Berlin, den 16.06.2009

Sven Volkmar