

**Zur Vielfalt allgemein transduzierender
Bakteriophagen in bakteriellen Gemeinschaften
sowie innerhalb der Spezies
Salmonella enterica serov. *typhimurium***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Michaela Sander
aus Donauwörth
Januar 2002

Für Evelyn

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Sander M. und Schmieger H.

Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats.

Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67: 1490 - 1493.

Die Dissertation wurde der Fakultät am 16.01.2002 zur Beurteilung eingereicht.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Einleitung	2
1. Horizontaler Gentransfer bei Prokaryonten.....	2
1.1. Die Entdeckung des horizontalen Gentransfers	3
1.2. Mechanismen des horizontalen Gentransfers	3
1.2.1. Gentransfer durch Transformation	4
1.2.2. Gentransfer durch Konjugation	5
1.2.3. Übertragung genetischer Information durch Bakteriophagen	5
1.2.3.1. Spezielle Transduktion	6
1.2.3.2. Generelle Transduktion	7
1.3. Natürliche Barrieren des horizontalen Gentransfers	8
1.3.1. Verfügbarkeit der DNA	8
1.3.2. Aufnahme von Fremd-DNA in Bakterien	9
1.3.3. Etablierung von Fremd-DNA in Bakterien	11
1.3.4. Expression und Selektion heterologer DNA in Bakterien.....	12
1.4. Horizontaler Gentransfer in der Umwelt.....	12
1.4.1. Aquatische und terrestrische Ökosysteme.....	13
1.4.2. Rhizosphäre Ökosysteme	15
1.4.3. Phylloplane Ökosysteme	16
1.4.4. Xenobiotisch kontaminierte Ökosysteme.....	17
1.4.5. Tierische Ökosysteme	17
2. Das Problem des Nachweises generell transduzierender Bakteriophagen in natürlichen Habitaten	18
3. Zielsetzung der Arbeit	22
Material und Methoden.....	24
1. Material.....	24
1.1. Bakterienstämme	24
1.2. Bakteriophagen.....	25
1.3. Vektoren	25
1.4. In dieser Arbeit entstandene und verwendete Plasmide	25
1.4.1. Plasmide mit aus Phagenpartikeln isolierter 16S rDNA im Vektor pCR2.1.....	25
1.4.2. Plasmide mit inserierten Phagen-DNA-Fragmenten	28
1.5. Oligonukleotide	30
1.6. Enzyme	30
1.7. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	31

1.8. Medien und Lösungen	31
1.8.1. Medien	31
1.8.2. Antibiotika	32
1.8.3. Puffer und Lösungen	32
2. Methoden	34
2.1. Methoden zur indikatorunabhängigen Identifizierung generell transduzierender Bakteriophagen in natürlichen Habitaten	34
2.1.1. Entnahme und Aufbereitung von Umweltproben	34
2.1.2. Herstellung und Aufbereitung eines Heuaufgusses	35
2.1.3. Konzentrierung der Phagenpartikel aus Umweltproben	35
2.1.4. Konzentrierung von Phagenpartikeln durch Ultrazentrifugation	35
2.1.5. Konzentrierung von Phagenpartikeln über HighQ-Säulen	35
2.1.6. Enzymatischer Abbau nicht in Phagenpartikel enkapsulierter DNA	36
2.1.7. Isolierung von in Phagenpartikeln verpackter DNA	36
2.1.8. PCR-Amplifikation	36
2.1.8.1. PCR-Amplifikation des Kontrollplasmids pHpac	36
2.1.8.2. PCR-Amplifikation der 16S rDNA	37
2.1.9. Klonierung und Transformation von PCR-Produkten	38
2.1.10. Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA	38
2.1.11. Sequenzierung	38
2.1.12. Chimärentest und Zuordnung anonymer 16S rDNA-Sequenzen	38
2.2. Weitere angewendete Methoden	39
2.2.1. Phagenvermehrung	39
2.2.2. Flüssiglysate	39
2.2.3. Plattenlysate	39
2.2.4. Titerbestimmung von Phagenlysaten	40
2.2.5. Konzentrierung von Phagenlysaten durch Ultrazentrifugation	40
2.2.6. Reinigung und Konzentrierung von Phagenpartikeln durch CsCl- Dichtegradientenzentrifugation	40
2.2.7. Isolierung von Nukleinsäuren	40
2.2.7.1. Isolierung von Phagen-DNA	40
2.2.8. Isolierung von Plasmid-DNA	41
2.2.8.1. Plasmid-DNA-Präparation nach Birnboim und Doly (1979)	41
2.2.8.2. Plasmid-DNA-Präparation über Ionenaustauschersäulen	41
2.2.9. Isolierung bakterieller chromosomaler DNA nach Pospiech und Neumann (1995)	42
2.2.10. Transduktion	42
2.2.10.1. Transduktion chromosomaler Markergene	42
2.2.10.2. Transduktion plasmidkodierter Markergene	43
2.2.11. Transformation von Bakterienzellen	43

2.2.12. DNA-Gelelektrophorese.....	43
2.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
2.3.1. DNA-Hybridisierung.....	44
2.3.1.1. Southern-Transfer.....	44
2.3.1.2. Dot Blot.....	44
2.3.1.3. Herstellung von DNA-Sonden und Hybridisierung.....	44
Ergebnisse	45
1. Ein indikatorunabhängiges Nachweissystem zur Detektion generell transduzierender Bakteriophagen in der Natur	45
1.1. Das Konzept des indikatorunabhängigen Nachweissystems.....	45
1.2. Das Problem der freien DNA	46
1.3. Die Etablierung der Methode mit dem generell transduzierenden <i>Salmonella</i> -Phagen P22	47
1.4. Anwendung der Methode zur Untersuchung von Umweltproben.....	55
1.4.1. Extraktion von in Phagenköpfen verpackter DNA aus Umweltproben und Amplifizierung der 16S rDNA	55
1.4.2. Sequenzierung klonierter 16S rDNA und Ausschluß chimärer Sequenzen	57
1.4.3. Wirte generell transduzierender Bakteriophagen	58
1.4.4. Spektrum identifizierter Sequenztypen	61
1.5. Der Sonderfall Moor.....	63
1.6. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse	65
2. Charakterisierung der <i>Salmonella</i> -Phagen 7D, PS79 und A12.....	67
2.1. Verwandtschaft der Phagen mit anderen prominenten Bakteriophagen und untereinander	67
2.2. Plaquemorphologie.....	69
2.3. Untersuchungen zur Kinetik der Phagenvermehrung.....	70
2.4. Taxonomische Einordnung.....	75
2.5. Untersuchung der Phagen bezüglich ihrer Fähigkeit zur generellen Transduktion.....	76
2.5.1. Transduktion chromosomaler Markergene.....	76
2.5.2. Transduktion von Plasmiden	78
2.6. Das Wirtsspektrum	79
2.7. Schutzmechanismen lysogener Zellen	80
2.8. Molekulargenetische Charakterisierung.....	84
2.8.1. Molekulargenetische Charakterisierung des Phagen 7D.....	84
2.8.1.1. Restriktionskartierung und Bestimmung der Genomgröße.....	84
2.8.1.2. Untersuchungen zum Status des Prophagen in 7D-lysogenen Zellen	87
2.8.1.3. Untersuchung zum Mechanismus der Zirkularisierung der Phagen-DNA.....	90
2.8.2. Molekulargenetische Charakterisierung des Phagen PS79	93

2.8.2.1. Restriktionskartierung und Bestimmung der Genomgröße	93
2.8.2.2. Untersuchungen zum Status des Prophagen in lysogenen Zellen	95
2.8.3. Molekulargenetische Charakterisierung des Phagen A12	97
2.8.3.1. Restriktionskartierung und Bestimmung der Genomgröße	97
2.9. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse	99
Diskussion	100
1. Die Rolle der Transduktion beim horizontalen Gentransfer	100
2. Der indikatorunabhängige Nachweis generell transduzierender Bakteriophagen.....	103
2.1. Das Prinzip	103
2.2. Was macht rRNA-Gene so speziell?	104
2.3. Der methodische Ansatz.....	105
2.4. Bewertung der identifizierten Wirte transduzierender Bakteriophagen.....	107
2.5. Bewertung der Sequenzdaten	107
2.6. Die Grenzen des Systems und Möglichkeiten der Weiterentwicklung	111
3. Die Charakterisierung der <i>Salmonella</i> -Phagen 7D, PS79 und A12	113
3.1. Transduktion.....	114
3.2. Virustaxonomie	116
3.3. Immunität und Schutz lysogener Zellen.....	117
3.4. Molekulargenetische Charakterisierung.....	118
4. Abschließende Betrachtung über phagenbedingte Gentransduktion in der Natur	120
Zusammenfassung.....	123
Anhang	125
Literatur.....	129
Danksagung.....	150
Lebenslauf.....	151

Abkürzungen

Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
λ	Lambda
M	molar
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
min	Minute(n)
mM	millimolar
NaAc	Natriumacetat
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge x (nm)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	plaque forming unit
ρ	Dichte
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
Str	Streptomycin
Str ^R	Streptomycinresistenz
Tris	Trishydromethylaminomethan
U	Einheit
URB	unterrepräsentierte Bande
VF	Verdünnungsflüssigkeit
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Einleitung

1. Horizontaler Gentransfer bei Prokaryonten

Seit etwa 3,5 Milliarden Jahren besiedeln Bakterien die Erde, und ihre derzeitige Diversität ist beeindruckend. Prokaryonten sind überall dort zu finden, wo physikalische und chemische Bedingungen prinzipiell die Existenz von Leben erlauben, angefangen von Habitaten mit idealen Bedingungen bis hin zu extremen ökologischen Nischen bezüglich chemischer Zusammensetzung, pH-Wert, Temperatur und Druck. Viele Spezies leben als Symbionten oder Parasiten und haben sich an das Leben in enger Gemeinschaft mit anderen Organismen angepaßt. Angesichts der Tatsache, daß sich Prokaryonten von Art zu Art in ihrer Genomgröße lediglich um etwas mehr als den Faktor zehn unterscheiden, zeigen diese einzelligen Organismen unglaubliche Variationen bezüglich ihrer metabolischen Fähigkeiten, zellulären Strukturen und Lebensarten. Selbst innerhalb einer taxonomischen Gruppe, die in ihrer Gesamtheit viele Gemeinsamkeiten aufweist, was wiederum als Hinweis auf einen gemeinsamen Vorläufer gewertet werden kann, verfügt jede Spezies über physiologische Eigenschaften, die charakteristisch für das Überleben in ihrer ökologischen Nische sind.

Für die Anpassung an verschiedene Lebensräume und die daraus resultierenden Unterschiede zwischen bakteriellen Spezies sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Punktmutationen, intragenische Rekombination und mobile genetische Elemente, die zur Modifikation, Inaktivierung oder Veränderung der Regulation existierender Gene führen, haben Anteil an der Divergenz und der Evolution von Organismen. Für die Eroberung neuer Habitate scheint die Ansammlung solcher genetischer Veränderungen allein jedoch nicht ausreichend. Genomanalysen haben gezeigt, daß *Escherichia coli* seit seiner getrennten Entwicklung von *Salmonella enterica* vor etwa 100 Millionen Jahren ca. 1600 Kilobasen neuer Gene angesammelt hat (Lawrence und Ochman, 1998). Ein solcher Zuwachs an neuer genetischer Information ist zwar durchaus quantitativ mit der Akkumulation genetischer Variationen vereinbar, qualitativ jedoch sind die erworbenen Sequenzen allein durch diesen Mechanismus nicht erklärbar (Lawrence und Ochman, 1997). Der Austausch von Nukleotiden durch Mutation oder Umordnung innerhalb eines Genoms führt auf längere Sicht zu Veränderungen des Phänotyps, jedoch nicht zum plötzlichen Erwerb grundlegend neuer Eigenschaften. Statt dessen gibt es eindeutige Anzeichen dafür, daß horizontaler Gentransfer - die Übertagung von genetischem Material zwischen Organismen, die nicht in einer Generationenfolge stehen - eine entscheidende Rolle in der Evolution bakterieller Genome spielt.

Unter der Annahme, daß bakterielle Differenzierung und Spezialisierung von der erfolgreichen Besiedelung ökologischer Nischen abhängt, stellt ein Gewinn neuer, durch horizontalen Transfer erworbener Gene zusammen mit der Veränderung der genetischen

Information durch Mutation und Selektion einen hocheffektiven Mechanismus zur Adaptation an neue Umweltbedingungen dar.

1.1. Die Entdeckung des horizontalen Gentransfers

Bereits 1928 lieferte Fred Griffith den ersten Beweis für den Transfer von genetischem Material durch die Übertragung der Virulenz von *smooth-* auf *rough-*Stämme von *Streptococcus pneumoniae*, zu einer Zeit, zu der die Natur des von ihm postulierten "transformierenden Prinzips" noch gänzlich unbekannt war (Griffith, 1928). Erst 16 Jahre später brachten weiterführende Versuche von O. T. Avery, C. M. MacLeod und M. McCarthy die Erkenntnis, daß "eine Nukleinsäure vom Desoxyribosetyp die fundamentale Einheit des transformierenden Prinzips von *Pneumococcus* Typ III ist" (Avery et al., 1944). J. Lederberg und E. L. Tatum gelang es 1946 erstmals, die Übertragung genetischer Information zwischen Bakterienzellen zu zeigen, indem sie durch Kokultivierung zweier auxotropher *E. coli*-Stämme das Auftreten prototropher Bakterien nachwiesen (Lederberg und Tatum, 1946). 1952 schließlich entdeckten N. D. Zinder und J. Lederberg beim Versuch, die bei *E. coli* gewonnenen Erkenntnisse auf *Salmonella typhimurium* zu übertragen, durch Zufall ein DNase-resistentes filtrierbares Agens, das die Fähigkeit besitzt, genetische Information zwischen Bakterienzellen zu transferieren, den Bakteriophagen P22 (Zinder und Lederberg, 1952).

Die enorme Bedeutung des lateralen Gentransfers wurde erstmals in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts realisiert, als multiple Antibiotikaresistenzen als ein weltweit zunehmendes Problem erkannt wurden. Die Geschwindigkeit, mit der bestimmte Bakterien Resistenzen gegen dasselbe Spektrum verschiedener Antibiotika entwickelten, zeigte deutlich, daß diese Eigenschaften zwischen taxonomischen Gruppen weitergegeben wurden und nicht in jeder Linie *de novo* entstanden waren (Davies, 1996). Seit ihrer Entdeckung haben diese DNA-Transfermechanismen, bekannt als Transformation, Konjugation und Transduktion, entscheidenden Beitrag bei der Aufklärung der molekularen Abläufe der Vererbung geleistet und dienen heute als grundlegende Werkzeuge der Gentechnik.

1.2. Mechanismen des horizontalen Gentransfers

Obwohl unser momentanes Wissen über die Diversität der Prokaryonten und deren Interaktionen bei weitem nicht vollständig ist, gelang es, grundlegende Fragestellungen bezüglich des horizontalen Transfers von genetischem Material in Laborversuchen wie in verschiedenen natürlichen Systemen aufzuklären. Erfolgreicher horizontaler Gentransfer zwischen Prokaryonten in der Natur ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Die Fähigkeit einer Bakterienzelle, DNA zu übertragen bzw. aufzunehmen, Fakto-

ren, die den Wirtsbereich des Transfers regulieren, die Verfügbarkeit sowie die Beschaffenheit transferierter DNA und nicht zuletzt der Selektionsdruck, der auf eine Rezipientenzelle wirkt, haben Einfluß auf die Transfereffizienz.

Drei Mechanismen der Genübertragung bei Bakterien sind beschrieben: Transformation, Konjugation und Transduktion. Aussagen über die Häufigkeit, mit der die horizontale Übertragung von genetischem Material in der Natur stattfindet, und darüber, welchen Anteil jeder einzelne Transfermechanismus dabei am gesamten Genaustausch hat, sind jedoch momentan nur eingeschränkt möglich. Eines der Haupthindernisse stellt die Tatsache dar, daß derzeit in den meisten Ökosystemen wahrscheinlich ein Anteil von weniger als einem Prozent der vorkommenden Bakterien mit den verfügbaren Techniken kultivierbar sind (Amann et al., 1995) und sich somit der Untersuchung mit etablierten Methoden entziehen.

1.2.1. Gentransfer durch Transformation

Transformation bezeichnet die aktive Aufnahme nackter DNA durch kompetente Empfängerzellen und die stabile Integration ihrer genetischen Information. Die Fähigkeit, DNA aus der Umwelt aufzunehmen, konnte bereits für mehr als 40 Bakterienspezies nachgewiesen werden (Lorenz und Wackernagel, 1994; Paget und Simonet, 1994; Williams et al., 1996; Palmen und Hellingwerf, 1997). Da bisher jedoch nur wenig über die Voraussetzungen für eine natürliche Kompetenzentwicklung bei Bakterien bekannt ist, stellt diese Zahl sicherlich nur eine Zwischenbilanz dar. So konnte zum Beispiel für die Spezies *E. coli*, bei der natürliche Kompetenzentwicklung lange Zeit nicht nachzuweisen war, natürliche Transformierbarkeit in Quellwasser gezeigt werden (Baur et al., 1996). Weitere Hinweise darauf, daß Kompetenz in der Natur weitaus mehr verbreitet ist als bisher angenommen, lieferten Untersuchungen sogenannter Mosaikgene augenblicklich als nichttransformierbar eingestufte Bakterien, die durch Rekombination mit der DNA verwandter Spezies entstanden sind (Matic et al., 1996).

Studien zur Transformation unter laborexperimentellen Bedingungen mit langen exponentiellen Wachstumsphasen, unlimitierter Nährstoffzufuhr und selektiver klonaler Vermehrung erlaubten die Klärung grundlegender Fragestellungen über die Mechanismen der Aufnahme freier DNA und deren Schicksal in der Rezipientenzelle (Lorenz und Wackernagel, 1994). Rückschlüsse auf Ausmaß und Bedeutung der Transformation in der Natur lassen diese Untersuchungen jedoch nur eingeschränkt zu. Neuere Studien befassen sich daher in weit größerem Umfang mit der Aufklärung der Rolle der Transformation unter natürlichen oder naturnahen Bedingungen, um diese Wissenslücke zu schließen.

1.2.2. Gentransfer durch Konjugation

Konjugation, die Übertragung von genetischem Material durch direkten Zell-Zell-Kontakt, ist wohl derzeit der am besten untersuchte Mechanismus des horizontalen Gentransfers. Konjugation findet häufig zwischen Bakterien statt, und Gene, die dabei übertragen werden, liegen in vielen Fällen auf selbstübertragenden Plasmiden, die mit Transfer- und Mobilisierungsgenen ausgestattet sind.

Nichtselbstübertragende Plasmide, die einen Replikationsstartpunkt für den Transfer (*oriT*) tragen, können durch konjugative Plasmide mobilisiert werden. Plasmide, die weder Gene für den Transfer noch für die Mobilisierung besitzen, fusionieren mit selbstübertragenden Vektoren und können nach dem Transfer ihre Selbständigkeit durch die Auflösung des Fusionsproduktes in der Rezipientenzelle zurückerlangen. Eine spezielle Form dieser Kointegratbildung stellt z. B. die Integration des F-Plasmids in das Genom von *E. coli* unter Bildung sogenannter *Hfr*-Stämme dar (*high frequency of recombination*), die die Fähigkeit besitzen, chromosomale Gene auf eine Rezipientenzelle zu übertragen.

Konjugative Transposons, eine weitere Gruppe selbstübertragender DNA, ermöglichen ebenfalls die Mobilisierung von Plasmiden und die Bildung von Kointegraten (Salyers et al., 1995). Eine Besonderheit dieser lateral übertragbaren Elemente stellt die Tatsache dar, daß ihre Transferrate in Anwesenheit von Agentien (wie zum Beispiel Antibiotika), die eine positive Selektion ihrer Wirtszellen bewirken, erhöht wird. Viele Plasmide und konjugative Transposons besitzen ein sehr weites Wirtsspektrum. So gehören etwa zum Wirtsbereich nichtkonjugativer mobilisierbarer Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe IncQ nahezu alle bekannten Gram-negativen und eine Reihe von Gram-positiven Bakterien, wie *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Synechococcus* und *Mycobacterien* (Davison et al., 1990). Transposons der Tn916-Familie besitzen die Fähigkeit, in über 50 Bakterienspezies aus 24 verschiedenen Genera zu replizieren (Clewell et al., 1995; Salyers und Shoemaker, 1996). Sogenannte *Shuttle*-Plasmide können z. B. von *E. coli* auf Hefe (Heinemann et al., 1989) oder von *Agrobacterium* auf Hefe und Pflanzen (Bundock und Hooykaas, 1996) übertragen werden. Retrotransfer, die Rückübertragung eines Plasmids von der Rezipientenzelle auf die ursprüngliche Donorzelle durch Konjugation, wobei zusätzlich DNA des Rezipienten übertragen wird, scheint ebenfalls am Genaustausch in der Natur beteiligt zu sein (Ronchel et al., 2000).

1.2.3. Übertragung genetischer Information durch Bakteriophagen

Transduktion bezeichnet den virusvermittelten Transfer von nichtviraler genetischer Information von einer Donor- auf eine Rezipientenzelle. DNA der Wirtszelle wird dabei in eine Hülle aus Virusproteinen verpackt und *via* Infektion in die Rezipientenzelle

transferiert. Transduktion wird traditionell in zwei Klassen eingeteilt, die sich grundlegend in der Bildung transduzierender Partikel unterscheidet.

1.2.3.1. Spezielle Transduktion

Die Bezeichnung "spezielle Transduktion" hat ihren Ursprung in der Eigenheit des Coliphagen Lambda, des ersten untersuchten Vertreters der speziellen Transduzierer, nur eine begrenzte Auswahl von Wirtsgenen zu übertragen (Morse, 1954; Morse et al., 1956). Der Phage Lambda gehört zur großen Familie der temperenten lambdoiden Bakteriophagen, die sich durch eine gemeinsame Chromosomenorganisation und die Möglichkeit des genetischen Austauschs zwischen ihren Mitgliedern auszeichnet (Highton et al., 1990; Baker et al., 1991).

Der Großteil dessen, was wir heute über spezielle Transduktion wissen, stammt aus Untersuchungen von Lambda. Das derzeitige Verständnis der speziellen Transduktion basiert auf Campbells Modell der Lambda-Lysogenie (Campbell, 1962). Demnach ist die Aufnahme von Wirtsgenen in das Genom des Virus das Resultat zweier aufeinanderfolgender Rekombinationsereignisse. Bei der lysogenen Vermehrung eines temperenten Phagen erfolgt die Integration der zirkularisierten viralen DNA durch Rekombination zwischen den Anheftungsregionen (*attachment sites*) des Phagen (*attP*) und des Bakterienchromosoms (*attB*). Bei der für diesen Schritt notwendigen Rekombinase (Integrase) handelt es sich um ein phagenkodiertes sequenzspezifisches Protein. Diese Integrase ist zudem, im Fall der lytischen Vermehrung, für die Exzision des Prophagen notwendig, wobei die beiden *attachment sites attP* und *attB* wiederhergestellt werden. Als Substrat für die Verpackung dient üblicherweise ein aus mehreren Kopien des Phagen-genoms bestehendes oligomeres DNA-Molekül (Konkatemer), das über den Mechanismus der "*rolling-circle*"-Replikation synthetisiert wird (Furth und Wickner, 1983). Ein Phagen-genom, das von zwei *cos sites (cohesive end site)* eingerahmt ist, wird von dem konkatemeren DNA-Molekül abgeschnitten und mit Hilfe einer Batterie von Proteinen, die teils von Lambda, teils von der Wirtszelle codiert werden, in Viruspartikel verpackt. Da beim Schneiden des Konkatemers versetzte Schnitte innerhalb der *cos site* gesetzt werden, ist das verpackte DNA-Molekül linear mit kurzen komplementären einzelsträngigen Enden (Hershey und Burgi, 1965). Nach der Injektion der Phagen-DNA in eine Wirtszelle erfolgt der Ringschluß des Phagen-genoms über komplementäre Basenpaarung, und Einzelstrangbrüche werden durch die DNA-Ligase geschlossen (Gallert, 1967). Das zirkularisierte Phagen-DNA-Molekül kann nun in das Genom der infizierten Zelle integrieren.

Bei der Bildung von speziell transduzierenden Partikeln wird dagegen ein Segment des Prophagen zusammen mit einem an die *attB site* angrenzenden Segment der Wirts-DNA ausgeschnitten (abnorme Exzision) und repliziert. Unter der Voraussetzung, daß ein

durch abnorme Exzision entstandenes DNA-Molekül eine *cos site* besitzt und in seiner Größe in etwa einer Lambda-Verpackungseinheit von ca. 36 bis 51 Kilobasen (Weil et al., 1972; Sternberg et al., 1979) entspricht, können Kopien dieses Moleküls in Viruspartikel verpackt und durch Infektion in die nächste Wirtszelle transferiert werden (Feiss und Backer, 1983). Da Lambda immer zwischen den *E. coli*-Genen *bio* und *gal* integriert und die Größe des verpackten DNA-Moleküls limitiert ist, kann der Phage auch nur diese Gene transduzieren. Gehen bei der falschen Exzision des Phagengenoms essentielle Gene verloren, können deren Genprodukte im Falle einer lytischen Vermehrung bei gleichzeitiger Infektion mit einem Wildtyp-Phagen, der auch als Helferphage bezeichnet wird, zur Verfügung gestellt werden. Auch *cis*-aktive Sequenzen, wie der Replikationsstartpunkt oder die *attachment site*, können durch Rekombination des Prophagen mit einem Helferphagen ersetzt werden (Weisberg, 1996).

1.2.3.2. Generelle Transduktion

Generelle Transduktion wurde erstmals beim *Salmonella*-Phagen P22 (Zinder und Lederberg, 1952), einem Verwandten von Lambda, und später beim Coliphagen P1 (Lennox, 1955) beschrieben. Im Gegensatz zu speziell transduzierenden Partikeln, die ein Hybridmolekül aus viraler und Wirts-DNA tragen, enthalten generell transduzierende Partikel DNA, die ausschließlich von ihrer Wirtszelle stammt. Die Bezeichnung "generelle Transduktion" leitet sich aus der Tatsache ab, daß über diesen Mechanismus prinzipiell jeder beliebige Abschnitt des Wirtsgenoms ebenso wie Plasmide der Wirtszelle verpackt und transferiert werden können.

Die Ursache für den Unterschied der durch spezielle oder generelle Transduktion übertragenen DNA liegt in der Natur der Mechanismen, die die Vertreter der beiden Phagengruppen für die Verpackung ihrer Genome benutzen. Das Substrat hierfür ist, wie bei den meisten Doppelstrang-DNA-Phagen, ein konkatemeres DNA-Molekül. Während jedoch bei speziellen Transduzierern wie Lambda die Länge eines Genoms durch die Sequenz der *cos sites* begrenzt wird, erfolgt die Verpackung der Phagen-DNA bei generell transduzierenden Phagen über den sogenannten *headful* -Verpackungsmechanismus (Steisinger et al., 1967). Der sequentiell in einer Richtung fortschreitende Verpackungszyklus eines Konkatemers beginnt mit dem Schnitt einer spezifischen Sequenz, der sogenannten *pac site*. Die Menge an verpackter DNA wird dabei ausschließlich durch die Kapazität des Viruskapsids begrenzt. Da ein Kapsid für gewöhnlich eine DNA-Menge aufnehmen kann, die etwas größer ist als die eines Genoms, weisen die verpackten Sequenzen eine terminale Redundanz von einigen Prozent auf. Nachdem der erste DNA-Abschnitt vom Konkatemer abgetrennt wurde, beginnt die nächste Verpackungseinheit an dem von einer Terminase produzierten Ende und führt damit zur zirkulären Permutation der Phagengenome innerhalb einer Population. Allgemein trans-

duzierende Partikel entstehen immer dann, wenn bei der lytischen Vermehrung eines Phagen anstelle der viralen DNA das Genom der Wirtszelle in die Phagenköpfe eingeschleust wird. Für den *Salmonella*-Phagen P22 wurde die Existenz von bis zu zehn Sequenzen auf dem Wirtschromosom nachgewiesen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur *pac site* von P22 als Startpunkte der DNA-Verpackung dienen können (Schmieger, 1982; Vogel und Schmieger, 1986). Andere Bakterienviren, wie der *E. coli*-Phage P1, zeigen dagegen keine ausgesprochene Präferenz für bestimmte Sequenzen des Wirtsgenoms (Hanks et al., 1988). Da nach der Initiation der Verpackung keine weitere Überprüfung der Sequenz erfolgt, kommt es in diesem Fall zur sequentiellen Verpackung der DNA der Wirtszelle. Nach der Freisetzung der Phagenpartikel kann die transduzierende DNA in die nächste Wirtszelle injiziert werden. Ihr Schicksal unterscheidet sich jedoch wesentlich von dem der durch spezielle Transduktion übertragenen Sequenzen. Da sie keine *attachment site* besitzt, muß die so transferierte DNA durch Rekombination in das Genom der Wirtszelle eingebaut werden. Andernfalls geht sie durch Degradation verloren oder wird, als nichtreplizierbares DNA-Fragment, bei der Vermehrung der Rezipientenzelle durch Zellteilung ausverdünt (abortive Transduktion) (Stocker, 1956). Studien an P1 und P22 haben gezeigt, daß nur ein Anteil von ein bis zwei Prozent der transduzierten Sequenzen stabil in die Rezipienten-DNA integriert wird (Masters, 1996).

1.3. Natürliche Barrieren des horizontalen Gentransfers

Eine Reihe von Barrieren, die den Austausch von genetischem Material zwischen entfernt verwandten Bakterien in der Natur einschränken, sind bekannt. Dabei scheinen Faktoren, die den Transfer und die Etablierung fremder DNA behindern, besonders effizient zu sein (Heinemann, 1991). Zusätzlich spielen die Verfügbarkeit der DNA, die Kompetenz der Bakterienzellen, die Möglichkeit der Expression aufgenommener Gene und nicht zuletzt die Selektion eine entscheidende Rolle.

1.3.1. Verfügbarkeit der DNA

Transformation kann in der Natur nur dann stattfinden, wenn die dafür notwendigen Voraussetzungen, freie DNA und kompetente Bakterienzellen, zur selben Zeit und am selben Ort gegeben sind. Informationen über das Schicksal der freigesetzten DNA sind momentan nahezu ausschließlich auf terrestrische Ökosysteme begrenzt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß Fragmente chromosomaler bakterieller DNA im Boden mehrere Wochen überdauern (Recorbet et al., 1993, England et al., 1997). Diese physikalische Stabilität kann jedoch nicht mit der biologischen Verfügbarkeit von DNA gleichgesetzt werden. Wie Mikrokosmos-Experimente gezeigt haben, bleibt iso-

lierte DNA im Boden lediglich für einige Stunden *via* Transformation übertragbar (Nielsen et al., 1997a). Versuche mit Gesamtzellysaten zeigten, daß die Anwesenheit von Zellresten die Halbwertszeit nackter DNA im Boden wesentlich erhöht (Nielsen et al., 2000a). Überreste lysierter Zellen scheinen einen gewissen Schutz freigesetzter Sequenzen vor enzymatischer Hydrolyse und irreversiblen Interaktionen mit verschiedenen Bodenbestandteilen zu bieten. Mineralischen Oberflächen kommt eine besondere Bedeutung beim Gentransfer extrazellulärer DNA im natürlichen Milieu zu. Mineraladsorbierte DNA vermag aufgrund ihrer Resistenz gegen DNasen zu überdauern und steht gleichzeitig für eine wirksame Aufnahme in Bakterienzellen zur Verfügung (Lorenz und Wackernagel, 1994). Eine ebenfalls nicht zu unterschätzende Rolle spielt zudem die natürliche mikrobielle Zusammensetzung eines Habitats. Wie von Nielsen und Kollegen (2000b) gezeigt werden konnte, bleibt die Transformationsaktivität von Zellysaten in sterilen Böden über einen Zeitraum von drei Tagen erhalten, während sie in nichtsterilen Böden bereits nach vier Stunden nicht mehr nachweisbar ist. Vergleichbare Resultate lieferten Transformationsstudien in Wassersäulen und Sedimentmikrokosmen mit marinen *Vibrio*-Stämmen (Paul et al., 1991a).

1.3.2. Aufnahme von Fremd-DNA in Bakterien

Für die erfolgreiche Aufnahme fremder DNA in Bakterienzellen werden drei Faktoren als maßgeblich angesehen: die Abhängigkeit des lateralen Gentransfers von (1) der bakteriellen Kompetenz zur aktiven Aufnahme freier DNA durch Transformation, (2) der aktiven Übertragung genetischen Materials, bei Konjugation und Transduktion, und (3) der Degradation aufgenommener DNA durch Restriktionsendonukleasen im Zytoplasma der Rezipientenzelle.

Die Aufnahme nackter DNA durch Transformation ist ein durch genetische und umweltbedingte Faktoren gesteuerter Prozeß. Sie bedarf einer physiologisch regulierten Kompetenz, die im Normalfall transient ist (Solomon und Grossman, 1996). Eine Ausnahme von dieser Regel stellen z.B. Bakterien der Gattung *Neisseria gonorrhoeae* dar, deren Kompetenz konstitutiv ist (Sparling, 1966). Kompetenz ist bei verschiedenen Gram-positiven Bakterien durch Polypeptide geringer Masse (Kompetenzfaktoren) oder bakterielle Pheromone induzierbar (Smith et al., 1981; Havarstein et al., 1995, Wirth et al., 1996), während sie bei Gram-negativen endogen reguliert, häufig in der späten exponentiellen oder frühen stationären Wachstumsphase auftritt (Lorenz und Wackernagel, 1994; Paget und Simonet, 1994). Kompetenz konnte bisher nur bei einem Teil der daraufhin untersuchten Bakterien unter natürlichen Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden (Rochelle et al., 1988; Nielsen, et al., 1997b), und das Wissen über die Regulation der Kompetenz durch Umweltfaktoren ist augenblicklich noch gering (Veal et al., 1992; Frischer et al., 1996).

Konjugativer Transfer ist abhängig vom Zusammentreffen physiologisch aktiver Donor- und Rezipientenzellen und wird daher durch eine hohe Dichte exponentiell wachsender Zellen begünstigt. Die molekularen Mechanismen des plasmidvermittelten Zell-Zell-Kontakts und der Übertragung von DNA wurden ausführlich unter Laborbedingungen untersucht (Frost et al., 1994; Dunny et al., 1995). Die derzeitigen Erkenntnisse über die Auswirkungen biotischer und abiotischer Umweltfaktoren auf die Regulation dieses Transfermechanismus sind dagegen gering.

Bakteriophagen injizieren das in ihnen enthaltene Erbgut nach irreversibler Anheftung an die Wirtszelle, die eine Interaktion wirtsspezifischer Oberflächenstrukturen mit dem Rezeptorsystem des Phagen zur Voraussetzung hat. In Phagenköpfe verpackte DNA ist geschützt vor verschiedenen DNA-schädigenden Einflüssen chemischer, physikalischer und biologischer Natur, wie Säuren, ionisierender Strahlung und Nukleasen. Im Gegensatz zu Bakterienzellen sind Phagen unempfindlich gegenüber einer Reihe von Umweltfaktoren mit bakteriostatischer oder bakterizider Wirkung, wie Antibiotika, extremen pH-Werten und Temperaturen sowie organischen Lösungsmitteln und osmotischem Schock. Bakterienviren überdauern daher häufig lange Zeiträume unter ungünstigen Bedingungen, ohne ihre Infektiosität einzubüßen.

Generell geht man davon aus, daß Fremd-DNA, die in das Zytoplasma einer Bakterienzelle eindringt, schnell von Restriktionsendonukleasen abgebaut wird. Dieser Infektionsschutz der Zellen ist jedoch bei weitem nicht vollständig, unabhängig davon, über welchen Mechanismus genetische Information in eine Rezipientenzelle eingeschleust wird. Infektiöse DNA, die das gleiche Modifikationsmuster aufweist wie die DNA der Rezipientenzelle, wird von vornherein nicht als fremd identifiziert und daher nicht enzymatisch abgebaut. DNA, die durch Transformation übertragen wird, ist einzelsträngig und entgeht deshalb ebenfalls dem Abbau durch die meisten Restriktionssysteme (Lorenz und Wackernagel, 1994). Konjugative Plasmide sind häufig durch Mutation und Selektion resistent gegen Restriktionsendonukleasen vom Typ I (Guiney, 1984) oder tragen mitunter sogenannte *ard*-Gene (*alleviation of restriction of DNA*), die für Antirestriktionsproteine kodieren (Belogurov et al., 1985). Einen ebenfalls effektiven Mechanismus stellt die Aufnahme großer DNA-Mengen durch verlängerte Paarung dar, die eine Absättigung in der Zelle vorhandener Restriktionsenzyme zur Folge hat (Matic et al., 1995). Viele Bakteriophagen haben spezifische Mechanismen entwickelt, um dem Restriktionssystem ihrer Wirtszelle zu entgehen. Die Eliminierung oder Maskierung von Restriktionsschnittstellen sowie die Inaktivierung oder Modulation der wirtseigenen Restriktions-Modifikations-Maschinerie schützen Phagen-DNA vor dem Abbau (King und Murray, 1994). Doch selbst bei hoher Aktivität der Restriktionsendonukleasen bleiben statistisch nach Restriktion durch Enzyme mit einer Erkennungssequenz, die lediglich vier Basenpaare umfaßt, noch DNA-Fragmente von ca. 250 Basenpaaren, bei mehr Basenpaare umfassenden Restriktionsstellen entsprechend

größere Fragmente erhalten, die in das Genom der Rezipientenzelle aufgenommen werden können.

1.3.3. Etablierung von Fremd-DNA in Bakterien

Voraussetzung für den stabilen Erhalt heterologer DNA in einer Rezipientenzelle ist deren Replizierbarkeit. Plasmide, die durch Konjugation übertragen werden, besitzen einen eigenen Replikationsstartpunkt und daher die Fähigkeit, autonom in der Zelle zu replizieren. Andere transferierte DNA-Sequenzen dagegen können nur dann stabil in einer Zelle etabliert werden, wenn sie in ein Replikon der Wirtszelle integrieren. Die erfolgreiche Initiation der Integration in das Genom der Wirtszelle ist dabei maßgeblich von der Sequenzhomologie der aufgenommenen DNA und der DNA des Rezipienten abhängig. Die minimale Länge einer Homologiesequenz, die eine Rekombination einleiten kann, ist speziesabhängig und umfaßt etwa bei *E. coli* ca. 20 Basenpaare (Shen und Huang, 1986). Nach der Initiation unterliegt die weitere Überprüfung des Strangaustauschs dem Fehlpaarungs-Reparatur-System der Wirtszelle. Wie Studien gezeigt haben, bewirkt eine Inaktivierung dieses Systems durch Mutation einzelner *mut*-Gene (Gene des Fehlpaarungs-Reparatur-Systems) eine Erhöhung der Rekombinationsrate zwischen *E. coli* und *S. typhimurium* um das Hundert- bis Tausendfache (Rayssiguier et al., 1989). Von Bedeutung erscheint vor diesem Hintergrund die Tatsache, daß es sich bei ca. 0,1 - 1% aller Zellen in natürlich vorkommenden Populationen von *E. coli* um *mut*-Mutanten handelt (Matic et al., 1995). Solche Subpopulationen in natürlichen Bakteriengemeinschaften können, bedingt durch ihre erhöhte Bereitschaft zur illegitimen Rekombination, das Ausgangsmaterial für die Entstehung neuer Spezies darstellen. Des weiteren gibt es Hinweise darauf, daß Bakterien unter ungünstigen Lebensbedingungen, wie zum Beispiel in der späten stationären Wachstumsphase, die Expression der *mut*-Gene verringern, was ebenfalls die Erhöhung der Einbaurate transferierter Fremd-DNA zur Folge hat (Feng et al., 1996; Harris et al., 1999).

Während die Komponenten des Fehlpaarungs-Reparatur-Systems als potentielle Inhibitoren der interspezifischen Rekombination agieren, arbeitet das SOS-System als induzierbarer positiver Regulator. Eine starke SOS-Induktion, die unter anderem bei der Konjugation zwischen *E. coli* und *S. typhimurium* beobachtet wurde, stimuliert die Rekombination in der Rezipientenzelle durch hohe Konzentrationen an RecA- und RuvAB-Proteinen. Auch unter diesen Umständen kann ein Strangaustausch über mehrere Basenfehlpaarungen sowie größere Insertionen oder Deletionen hinweg stattfinden (DasGupta und Radding, 1982; Bianchi und Radding, 1983).

1.3.4. Expression und Selektion heterologer DNA in Bakterien

Die tatsächlich in natürlichen Bakterienpopulationen beobachtbare Rekombinationsfrequenz ist letztendlich das Resultat des auf die Wirtszelle wirkenden Selektionsdrucks. Voraussetzung für die Selektion ist die Expression der Fremdgene in der Wirtszelle, die ihrerseits der funktionellen Assoziation dieser Gene mit regulatorischen Sequenzen bedarf. Im Gegensatz zu plasmidkodierten Genen, die als funktionelle Einheit von Strukturgenen und Kontrollelementen übertragen werden, ist die Expression fremder Gene, die in das Genom der Wirtszelle integrieren, vom Ort ihres Einbaus abhängig. Nur wenn diese Gene ein in der Rezipientenzelle funktionsfähiges Operon bilden oder so integriert werden, daß sie Teil einer endogenen regulatorischen Einheit werden, führt der Transfer von Strukturgenen auch zur Bildung neuer Genprodukte. Eine weitere Möglichkeit bietet die Wiederherstellung endogener Sequenzen, die durch Mutation oder Deletion ihre Funktion verloren haben, durch Rekombination mit transferierten Sequenzen. Zudem kann die Aufnahme fremder DNA auch Auswirkungen auf die Expression wirtseigener Gene haben. Dies ist zum Beispiel dann der Fall, wenn kodierende Sequenzen durch ein Integrationsereignis unterbrochen oder einer anderen Kontrolle unterstellt werden. Rekombinationsereignisse, die zu einer Schädigung des Rezipienten führen, gehen in der Population verloren und schmälern somit die beobachtete Transferfrequenz. Für die Selektion neutrale Ereignisse bleiben entweder erhalten oder gehen durch genetische Drift verloren (Nelson et al., 1991; Nelson und Selander, 1992; Boyd et al., 1994). Haben die rekombinanten Bakterien jedoch einen Selektionsvorteil, bleiben sie der Population in vollem Umfang erhalten. Selbst wenn der tatsächliche Anteil der erfolgreichen stabilen Übertragung von genetischem Material zwischen verschiedenen Spezies gering ist, kann dies durch positive Selektion einzelner transgener Organismen zu weitreichenden Veränderungen in der Zusammensetzung einer Population führen. Die Wahrscheinlichkeit einer Veränderung des Genpools ist dabei größer, wenn diese Organismen neue Habitate besiedeln oder mit einem Wechsel der Umweltbedingungen konfrontiert werden.

1.4. Horizontaler Gentransfer in der Umwelt

Für die Untersuchung des lateralen Gentransfers stehen heute eine Reihe verschiedenster Methoden zur Verfügung. Lange Zeit beruhten die meisten von ihnen auf der Suche nach spezifischen genetischen Markern oder Phänotypen, wie zum Beispiel Genen für Antibiotika- oder Schwermetallresistenzen oder für den Abbau seltener Kohlenstoffquellen. Eine solch selektive Betrachtung führte zweifellos zu einer starken Unterschätzung der in der Natur stattfindenden Transferereignisse. Zudem wurden die untersuchten Gene häufig von selbstübertragenden Plasmiden oder konjugativen Transposons

kodiert, was eine einseitige Betrachtungsweise bezüglich des Anteils der verschiedenen Mechanismen an der Genübertragung zur Folge hatte. Vielversprechend erscheint vor diesem Hintergrund der Einsatz neuer Methoden, wie der Transfer von GFP-Markergenen (grün fluoreszierendes Protein), sowie von Methoden, die auf der Untersuchung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) basieren. Wie verschiedene Studien gezeigt haben, ermöglichen diese Anwendungen unter anderem den Nachweis von Genaustauschereignissen zwischen Mikroorganismen ohne Kultivierung der Rezipienten (Strätz et al., 1996; Christensen et al., 1998; Dahlberg et al., 1998), was vor dem Hintergrund, daß wahrscheinlich ein Anteil von über 99 Prozent aller in der Natur vorkommenden Bakterien mit den heute gängigen Methoden nicht kultivierbar sind (Amann et al., 1995), von entscheidender Bedeutung ist. Da Untersuchungen in der Natur technisch aufwendig sind, werden Studien zum lateralen Gentransfer häufig in Form von Mikrokosmosexperimenten durchgeführt, wobei versucht wird, natürliche Ökosysteme z.B. bezüglich Temperatur, pH-Wert, Feuchtigkeit, Kohlenstoff-, Nitrat- und Phosphatgehalt zu simulieren. Trotz aller Anstrengungen bleiben künstliche Mikrokosmen nur eine Annäherung an die natürlichen Gegebenheiten. Gerade im Bezug auf Gentransferexperimente konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Transferfrequenz bei der Betrachtung natürlicher mikrobieller Lebensgemeinschaften im Vergleich zu isolierten Untersuchungen einzelner Bakterienspezies festgestellt werden (Top, et al., 1990; Stotzky et al., 1991; Licht et al., 1999).

Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen soll der nächste Abschnitt einen kurzen Einblick in den momentanen Wissensstand bezüglich des lateralen Transfers von genetischem Material in der Natur geben.

1.4.1. Aquatische und terrestrische Ökosysteme

Wasser und Boden sind zum überwiegenden Teil charakteristischerweise oligotroph, so daß Bakterien dieser Habitats fast ständig unter Nährstoffmangelbedingungen leben (van Veen et al., 1997). Weitreichende Studien bezüglich der Faktoren, die die Transformation beeinflussen, wurden von Nielsen und Kollegen (1997a; 1997b) in Böden mit unterschiedlicher Beschaffenheit an *Acinetobacter calcoaceticus* durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Kompetenz von Bakterien bei deren Überführung in nährstoffarme Böden rapide abnimmt, wohingegen die Fähigkeit von Zellen, DNA aufzunehmen, durch eine Zuführung von Nährstoffen verlängert bzw. wieder induziert werden kann. Ebenso führt eine Erhöhung der Phosphatkonzentration zu einer Steigerung der Transformationsfrequenz. Einfluß auf den Gentransfer hat zudem die Beschaffenheit und die Zusammensetzung des Bodens. Untersuchungen hinsichtlich der Feuchtigkeit von Böden zeigten, daß bei einem Feuchtigkeitsgehalt von 35% die höchsten Transformationsraten erzielt werden konnten.

In aquatischen Systemen scheint besonders die starke Verdünnung freier DNA ein Transferhindernis darzustellen. Transformation wird hier durch die Bildung von Biofilmen begünstigt, wobei die räumliche Nähe von Donor- und Rezipientenzellen die Aufnahme von DNA, die aktiv oder bei der Lyse von Zellen freigesetzt wird, erleichtert (Baur et al., 1996; Williams et al., 1996). Transformation konnte zudem in nichtsterilen marinen Wassersäulen (Paul et al., 1991) und marinen Sedimenten (Stewart und Sinigalliano, 1991) nachgewiesen werden.

Ein erhöhtes Nährstoffangebot wirkt sich ebenfalls positiv auf die Effizienz der Genübertragung durch Konjugation aus. So führte zum Beispiel die Düngung eines Feldes zu einer mindestens zehnfachen Erhöhung der Konjugationsrate bei *Pseudomonas putida* (Götz und Smalla, 1997). Ebenso wurde in Abwassersammelbecken von Kläranlagen mit hohem Gehalt an leicht assimilierbarem Kohlenstoff ein im Vergleich zu natürlichen aquatischen Systemen erhöhter Transfer von Antibiotikaresistenz-Plasmiden sowie dem das Tetracyclin-Resistenzgen tragenden konjugativen Transposon Tn916 festgestellt (Marcinek et al., 1998). Während *E. coli* im Meerwasser, das einen extrem niedrigen Gehalt an assimilierbarem Kohlenstoff aufweist, nur unter Zugabe von Luria-Bertani-Medium zur Konjugation fähig ist (Sørensen et al., 1993), sind marine *Vibrio*-Stämme selbst nach längeren Hungerperioden in der Lage, untereinander Plasmide zu übertragen (Goodman et al., 1993). Ein weiterer Nachweis dafür, daß ein Transfer von Plasmiden auch ohne Zuführung von Nährstoffen stattfindet, konnte von Dahlberg und Kollegen (1998) durch den Einsatz eines bei marinen Bakterien häufig vorkommenden Plasmids, das mit der DNA-Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins markiert wurde, erbracht werden. Der Einfluß der Umgebungstemperatur auf die Transferfrequenz eines Quecksilber-Resistenzplasmids bei *Pseudomonas aeruginosa* auf Flußsteinen wurde von Bale und Kollegen (1987/1988) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Frequenz der Gentransfers bei Erhöhung der Wassertemperatur mit dekadischem Logarithmus ansteigt. Gentransfer durch Konjugation in marinen Sedimenten wurde in Mikrokosmosexperimenten durch die Übertragung eines Plasmids von dem fischpathogenen Bakterium *Aeromonas salmonicida* auf verschiedene für dieses Habitat typische Bakterien nachgewiesen (Sandaa und Enger, 1994).

Frühe Arbeiten von Zeph und Kollegen (1988) belegen eindeutig die Übertragung von genetischem Material zwischen *E. coli*-Zellen *via* Transduktion durch den Phagen P1 in sterilen und nichtsterilen Böden. Phagenvermittelter Transfer von chromosomalen und plasmidkodierten Markern in Frischwasserbiotopen bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde in zahlreichen Studien der Gruppe um Miller (Saye et al., 1990; Ripp et al., 1994) nachgewiesen. Die Übertragung eines Plasmids mit weitem Wirtsbereich durch einen marinen Phagen auf verschiedene marine Bakterien wurde jüngst von Jiang und Paul (1998) gezeigt. Mit Hilfe eines auf diesen Untersuchungen basierenden mathematischen Mo-

dells ermittelten sie eine Zahl von ca. $1,3 \times 10^{14}$ Transduktionsereignissen in der Mündung der Tampa Bay pro Jahr.

1.4.2. Rhizosphäre Ökosysteme

Die symbiotische Stickstofffixierung in Wurzelknöllchen, deren Bildung durch Bakterien der Gattung *Rhizobium* bei Leguminosen und durch *Actinomyceten* bei einigen Vertretern der Nicht-Leguminosen (Erle, Sanddorn, Ölweide, u. a.) induziert wird, hat großen Anteil an der globalen Fixierung von Stickstoff. Jährlich werden durch diesen Prozeß ca. 50 Millionen Tonnen Stickstoff für das Pflanzenwachstum verfügbar gemacht, wodurch Knöllchenbakterien besonders für die Landwirtschaft von enormer Bedeutung sind. Dieser Umstand hat sicherlich dazu beigetragen, daß die Rhizosphäre ein heute in vieler Hinsicht gut untersuchtes System darstellt, welches auch weitreichende Studien über den horizontalen Gentransfer bei *Rhizobien* mit einschließt.

Bei *Rhizobium leguminosarum* liegen alle Gene, die bei der Symbiose, der Stickstofffixierung und der Wirtsspezifität eine Rolle spielen, auf einem selbstübertragenden Plasmid (Sym-Plasmid). Erste Hinweise für die Übertragbarkeit dieses Sym-Plasmids lieferten Kinkle und Kollegen (1991) durch die Entdeckung des Plasmidtransfers von *Sinirhizobium fredii* auf *R. leguminosarum*. Wie Louvrier und Kollegen (1996) zeigen konnten, sind identische Sym-Plasmide einerseits in natürlichen Populationen von *R. leguminosarum* mit unterschiedlichen chromosomalen Genotypen assoziiert, andererseits tragen Stämme mit demselben chromosomalen Genotyp verschiedene Sym-Plasmide, was für einen Austausch von Plasmiden innerhalb dieses Bakterienstammes spricht. Andere Bakterienarten wie *Maesorhizobium loti* tragen auf ihrem Chromosom sogenannte Symbiose-Inseln. Diese Inseln können auf andere, nicht symbiotische Rhizobien übertragen werden, wodurch diese die Fähigkeit zur Induktion von Wurzelknöllchen und zur wirtsspezifischen Symbiose erhalten (Sullivan et al., 1995). Molekulargenetische Untersuchungen dieser Symbiose-Inseln haben gezeigt, daß diese durch sequenzspezifische Rekombination in das Phenyl-tRNA-Gen der Wirtszelle integrieren und zudem das Gen für eine Integrase vom Typ des Coliphagen P4 tragen (Sullivan und Ronson, 1998). Durch welchen Mechanismus die Übertragung dieser Sequenzen erfolgt, konnte bisher jedoch nicht geklärt werden.

Vergleichende Studien mit selbstübertragenden Antibiotika- und Quecksilber-Resistenzplasmiden in nichtsterilen Proben von Erde und Wurzelboden zeigten, daß die Frequenz des Gentransfers in Anwesenheit von Wurzeln deutlich erhöht wird, was wahrscheinlich durch intensiven Zell-Zell-Kontakt bei deren Besiedelung und die, durch Ausscheidungen der Wurzeln, erhöhte metabolische Aktivität der Bakterien hervorgerufen wird (Kinkle et al., 1991).

In einer Serie von Freilandversuchen, bei denen ein genetisch markierter Stamm von *Pseudomonas fluorescens* als Rezipientenstamm auf Zuckerrübenfelder ausgebracht wurde, wurde die Übertragung eines endogenen Quecksilberresistenz-Plasmids, welches in der natürlichen Bakterienpopulation dieses Habitats vorkommt, über einen Zeitraum von zwei Jahren untersucht (Smith et al., 1998). Im Vergleich zu anderen Studien ist in diesem Fall der Nachweis des Plasmidtransfers unabhängig von der Kultivierbarkeit der Donorzellen. Bei der Untersuchung von Wurzel- und Blattproben konnte der Plasmidtransfer auf den Rezipientenstamm nachgewiesen werden. Erhöhte Gentransferraten in verschiedenen rhizosphären Lebensgemeinschaften im Vergleich mit wurzellosen Erdproben wurden auch in anderen Studien belegt (Lilley und Bailey, 1997), was die besondere Bedeutung der Rhizosphäre für den horizontalen Gentransfer unterstreicht.

1.4.3. Phylloplane Ökosysteme

Aufgrund der ständig wechselnden Temperatur, Feuchtigkeit und Strahlung scheinen Blattoberflächen auf den ersten Blick einen eher schwierigen Lebensraum für Bakterien darzustellen. Bisher konnte jedoch bei mindestens zehn Bakterienarten, die die Blattoberfläche besiedeln, die Übertragung von Plasmiden via Konjugation mit hoher Effizienz nachgewiesen werden (Lacy et al., 1984; Lilley et al., 1994; Björklöf et al., 1995; Normander et al., 1998). Dabei scheint die Bildung von Biofilmen auf Blattoberflächen ebenso wie ein hoher Feuchtigkeitsgehalt den Zell-Zell-Kontakt und damit die Konjugation zu erleichtern. In vergleichenden Studien konnte zudem gezeigt werden, daß Konjugation auf der Blattoberfläche um das bis zu Dreißigfache effizienter ist, als Versuche auf Polycarbonatfiltern unter gleichen Bedingungen erwarten ließen. Transkonjuganten scheinen sich um die hydrophilen Verbindungen zwischen den Epidermiszellen und in den Spaltöffnungen zusammenzulagern und Ausscheidungen der Blattoberfläche als Energiequelle zu nutzen. Studien mit dem Bakteriophagen F116 brachten erste Hinweise auf den Gentransfer durch Transduktion bei *Pseudomonas aeruginosa* auf Blattoberflächen. Durch die Simulation von Feldbedingungen, wie geringer Pflanzenabstand, Wind und mechanische Bearbeitung, konnte gezeigt werden, daß Transduktion auch dann stattfindet, wenn lysogene Donorstämme und potentielle Rezipienten auf verschiedenen Pflanzen ausgebracht wurden (Kidambi et al., 1994). Für verschiedene typischerweise auf Blattoberflächen vorkommende Bakterien, wie *Pseudomonas* sp. und *Erwinia* sp., ist die Fähigkeit zur aktiven Aufnahme freier DNA belegt. Direkte Untersuchungen zur Übertragung von genetischem Material durch Transformation auf der Oberfläche von Blättern liegen bisher nicht vor. Es kann jedoch angenommen werden, daß dieser Mechanismus des Gentransfers auch hier von Bedeutung ist.

1.4.4. Xenobiotisch kontaminierte Ökosysteme

Die Forschung in diesem Bereich hat vor allem das Ziel, durch die Ausbringung geeigneter degradativer Bakterienstämme Umweltverschmutzungen schonender und kosteneffizienter zu beseitigen, als dies mit konventionellen Methoden möglich ist. Zu diesem Zweck wurden Bakterienstämme isoliert, die die Fähigkeit besitzen, spezielle Schadstoffe abzubauen. Wie Van der Meer und Kollegen (1992) zeigen konnten, liegen die meisten dieser degradativen Gene auf Plasmiden mit weitem Wirtsbereich.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit dieser Plasmide auf die in einem Biotop natürlich vorkommende Bakterienpopulation bei der Ausbringung spezialisierter Stämme und den daraus resultierenden Folgen für die Umwelt. Studien eines kontaminierten Flusses in Estland haben die Ausbreitung eines Plasmids, das die Gene für den Phenolabbau trägt, vom Donorstamm *Pseudomonas putida* PaW85 auf endogene Bakterienstämme durch horizontalen Gentransfer belegt (Peters et al., 1997). Ursprünglich wurde dieser plasmidtragende Stamm zur Bekämpfung einer schweren industriellen Kontamination des Flußwassers mit Phenol ausgebracht. Sechs Jahre später konnte zwar der ursprüngliche Stamm nicht mehr reisoliert werden, das für den Phenolabbau kodierende Operon wurde jedoch in verschiedenen natürlichen *Pseudomonas*-Stämmen noch 22 Kilometer flußabwärts der betroffenen Stelle gefunden. Obwohl keine Daten über das natürliche Vorkommen dieser Gene im betroffenen Flußbereich vor der Phenolkontamination vorliegen, scheint auf Grund der extremen Seltenheit dieser Gene in natürlichen Habitaten horizontaler Gentransfer und Selektion die Ursache für deren Verbreitung zu sein.

Verschiedene Untersuchungen belegen die Übertragung degradativer Gene auf die natürlichen Bakterienpopulationen in Habitaten, wie Klärschlamm, Grundwasser, Boden (Nußlein et al., 1992; Wyndham et al., 1994; Nakatsu et al., 1995; DiGiovanni et al., 1996; Matheson et al., 1997). Über die Auswirkungen einer Ausbreitung dieser neuen Stämme kann jedoch im Augenblick nur spekuliert werden.

1.4.5. Tierische Ökosysteme

Unzählige Studien der letzten Jahre beschäftigten sich mit der Untersuchung der Rolle des konjugativen Gentransfers bei der Übertragung von Genen zwischen Bakterien, die symbiotisch oder parasitär in höheren Organismen leben. Konjugativer Gentransfer zwischen Prokaryonten konnte im Verdauungstrakt von Insekten (Hoffmann et al., 1996; Watanabe und Sato, 1998), Säugetieren (Gruzza et al., 1993) und Vögeln (Netherwood et al., 1999) nachgewiesen werden. Andere Studien weisen darauf hin, daß es im menschlichen Darm zum Austausch von Antibiotikaresistenz-Genen zwischen verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienspezies kommt (Gruzza et

al., 1994; Nijsten et al., 1995; Scott et al., 1995). Auch Untersuchungen der Plasmidprofile klinischer Isolate legen die Vermutung nahe, daß im Darm des Menschen Gentransfer stattfindet (Bratoeva und John, 1994; Balis et al., 1996). Nahezu identische Sequenzen der auf konjugativen Transposons kodierten *tetQ*-Gene wurden bei *Bacteroides* sp., einem Bewohner der menschlichen Darmflora, der entfernt verwandten Spezies *Prevotella ruminicola*, einem Magen- und Darmbewohner von landwirtschaftlichen Nutztieren, und *Prevotella intermedia*, die aus dem Rachenraum von Menschen isoliert wurden, festgestellt (Nikolich et al., 1994).

Ob der Konjugation bei der Aufklärung der Epidemiologie von arzneimittelresistenten Bakterien besondere Bedeutung zukommt oder ob die Rolle, die dieser Übertragungsmechanismus dabei einnimmt, durch die geringe Anzahl an Studien, die sich mit Transformation und Transduktion befassen, überschätzt wird, ist derzeit unklar. In Anbetracht der Tatsachen stellt sich jedoch auf jeden Fall die Frage nach dem Zusammenhang des Antibiotikaeinsatzes als Wachstumsförderer in der landwirtschaftlichen Tierzucht mit dem zunehmenden Auftreten humanpathogener Bakterien mit multiplen Antibiotikaresistenzen, unabhängig davon, durch welchen der drei Mechanismen der Gentransfer erfolgt. Ebenfalls von Bedeutung für die medizinisch relevante Mikrobiologie ist die Tatsache, daß einige Bakteriophagen für Virulenzfaktoren kodieren, die in lysogenisierten Zellen exprimiert werden (lysogene Konversion). Transduktion scheint für die Ausbreitung des phagenkodierten Entzündungen hervorrufenden Exotoxins C in verschiedenen phylogenetischen Entwicklungslinien von *Streptococcus pyogenes* verantwortlich zu sein (Kapur et al., 1992). Der Bakteriophage CTXphi kodiert für das Cholera toxin von *Vibrio cholerae* (Lazar und Waldor, 1998). Phagen, die für das Shiga-Toxin kodieren, sind in die pathogene Wirkung des *E. coli* O157:H7-Stammes involviert (Schmidt et al., 1999).

2. Das Problem des Nachweises generell transduzierender Bakteriophagen in natürlichen Habitaten

Bedingt durch den Einsatz traditioneller Methoden sind derzeit nur wenige Vertreter generell transduzierender Bakteriophagen bekannt, bei deren Wirten es sich um gut etablierte Laborstämme handelt. Dies hatte unter anderem zur Folge, daß der Anteil der phagenvermittelten Übertragung genetischen Materials am horizontalen Gentransfer in der Natur häufig als zu vernachlässigender Faktor beurteilt und die Bedeutung der Transduktion, verglichen mit den gut untersuchten Mechanismen der Konjugation und Transduktion, als gering eingeschätzt wird. Ein Überblick über die Defizite traditioneller Methoden soll im folgenden die Notwendigkeit eines neuen molekularbiologischen Ansatzes zum Nachweis generell transduzierender Bakteriophagen verdeutlichen.

(1) Der traditionelle Nachweis eines Bakteriophagen durch die Lyse seiner Wirtszelle sowie seine zur weiteren Charakterisierung notwendigen Vermehrung ist abhängig von der Verfügbarkeit eines sensitiven Wirtsstammes (Indikator). Die Infektiosität von Bakterienviren ist in hohem Maße wirtsspezifisch, wobei der Wirtsbereich primär durch definierte molekulare Interaktionen zwischen dem Phagen und der Oberfläche der Wirtszelle determiniert wird. Da derzeit wahrscheinlich weniger als 1% aller Bakterien eines Biotops unter Laborbedingungen kultivierbar sind (Amann et al., 1995), ist jede Untersuchung einer Umweltprobe auf das Vorhandensein von Phagen von vornherein der Selektion durch die Auswahl der zur Verfügung stehenden Indikatorstämme unterworfen. Die Zahl verfügbarer Indikatoren wird zudem dadurch eingeschränkt, daß Bakterienzellen häufig über Mechanismen verfügen, die eine erfolgreiche Phageninfektion verhindern. Eine Veränderung der Phagenrezeptoren auf der Zelloberfläche, hervorgerufen durch Mutation (Lindqvist, 1998), lysogene Konversion (Uetake et al., 1972) oder den Erwerb bestimmter Plasmide (Olsen et al., 1974) können die erfolgreiche Infektion und damit den Nachweis eines bestimmten Phagen verhindern.

Beobachtet wurde auch die Inaktivierung eingedrungener Fremd-DNA durch die Wirkung der Restriktions-Modifikations-Systeme (Meselson et al., 1972) sowie der "Selbstmord" infizierter Zellen (abortive Infektion) bei Stämmen, die Prophagen, colicinogene Plasmide (Fields, 1969) oder den F-Faktor (Condit, 1975) tragen. Zellen, die einen Prophagen tragen, sind generell vor der Infektion mit einem superinfizierenden Phagen geschützt, der in seiner Repressor-Operator-Spezifität dem lysogenen Phagen gleicht (homoimmuner Phage) (Botstein et al., 1975). Wie etwa Untersuchungen von Naturisolaten von *Salmonella* gezeigt haben, sind solche lysogenen Zellen in der Natur weit verbreitet und können mehrere heteroimmune Prophagen tragen (Schicklmaier und Schmieger, 1995). Zudem ist der Erfolg einer Phageninfektion von experimentellen Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und Zusammensetzung verwendeter Wachstumsmedien, organischen oder anorganischen Kofaktoren für die Phagen-Wirts-Interaktion und nicht zuletzt vom Wachstumszustand der Wirtszellen abhängig. All diese Einschränkungen führen dazu, daß selbst unter enormem experimentellen Aufwand lediglich ein Bruchteil der in einer Umweltprobe mutmaßlich vorhandenen Phagen detektiert werden können.

(2) Traditionelle Methoden zum Nachweis der Fähigkeit eines Bakteriophagen, generell zu transduzieren, basieren auf der Selektion stabiler Transduktanten, Rezipientenzellen also, die infolge der Übertragung eines definierten genetischen Markers einen rekombinanten Phänotyp aufweisen (Abbildung 1). Transduktionsstudien erfordern daher zusätzliche Empfänger- und Spenderstämme, die für den zu prüfenden Phagen sensitiv sind und sich in selektierbaren Markern unterscheiden. Der Nachweis, daß ein Phage die Fähigkeit zur allgemeinen Transduktion besitzt, stellt jedoch auch häufig dann ein

Problem dar, wenn, wie etwa im Fall von *Salmonella*, gut charakterisierte Vermehrungsstämme und Mutantensammlungen zur Verfügung stehen. Der Erfolg einer Transduktionsstudie mit chromosomalen Markern ist dabei maßgeblich von den durch die Wahl der Spender- und Empfängerstämme determinierten Markergenen abhängig.

Studien mit dem Phagen P22 zeigten eindeutige Unterschiede in der Transduktionsfrequenz verschiedener chromosomaler Marker auf dem Chromosom von *Salmonella*. Diese Unterschiede resultieren aus dem Abstand der Markergene zu den als Verpackungssignale dienenden *pac*-ähnlichen Sequenzen (Schmieger, 1982). Die Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Gen übertragen wird, ist abhängig von der Anzahl *pac*-ähnlicher Sequenzen und deren Verteilung auf dem Chromosom der Wirtszelle. Zudem wirkt sich die DNA-Menge, die ein Phagenpartikel aufnehmen kann, sowie die Zahl sequentiell aufeinanderfolgender Verpackungsereignisse, die an einer *pac*-ähnlichen Sequenz starten, auf die Übertragungseffizienz aus. Markergene, die auf dem bakteriellen Chromosom weit entfernt von einer *pac*-ähnlichen Sequenz liegen, werden nur selten verpackt, so daß ein Transduktionsereignis nur mit großem experimentellen Aufwand nachweisbar ist und daher unter Umständen unerkannt bleibt. Der überwiegende Anteil generell transduzierter DNA-Stücke, die in eine Wirtszelle injiziert werden, werden nicht in das Chromosom integriert, sondern verbleiben als nichtreplizierende DNA-Fragmente in der Zelle (abortive Transduktion) (Benson und Roth, 1997). Auf diesen Fragmenten liegende Gene können zwar exprimiert werden, werden jedoch aufgrund ihrer Nichtreplizierbarkeit bei der Zellteilung nur an eine Tochterzelle weitergegeben. Die Verteilung der Genprodukte auf beide Tochterzellen ermöglicht zwar auch der "genlosen" Zelle ein vorübergehendes Wachstum auf selektivem Medium, dadurch entstehende Mikrokolonien sind jedoch häufig schwer zu erkennen und entgehen meist dem Nachweis. Vermindert wird die Zahl nachweisbarer Transduktionsereignisse zudem durch Nichtexpression übertragener Markergene sowie die Lyse von Transduktanten durch gleichzeitige oder nachfolgende Infektion mit intakten Phagen des transduzierenden Lysats.

In der Summe führt dies dazu, daß ein Großteil der erfolgten Genübertragungen dem Nachweis entgeht. Es ist daher anzunehmen, daß die tatsächliche Frequenz, mit der ein untersuchter Phage eine bestimmte DNA-Sequenz seiner propagierenden Zelle verpackt und auf eine Rezipientenzelle überträgt, weit über der experimentell ermittelbaren Transduktionsfrequenz für diesen bestimmten Marker liegt. Erfolgreiche Transduktionsexperimente sind damit kein eindeutiger Beweis für die Unfähigkeit eines getesteten Bakteriophagen, generell zu transduzieren. Es liegt auf der Hand, daß die Suche nach generell transduzierenden Bakteriophagen in natürlichen Habitaten unter dem Einsatz traditioneller Methoden praktisch unmöglich ist.

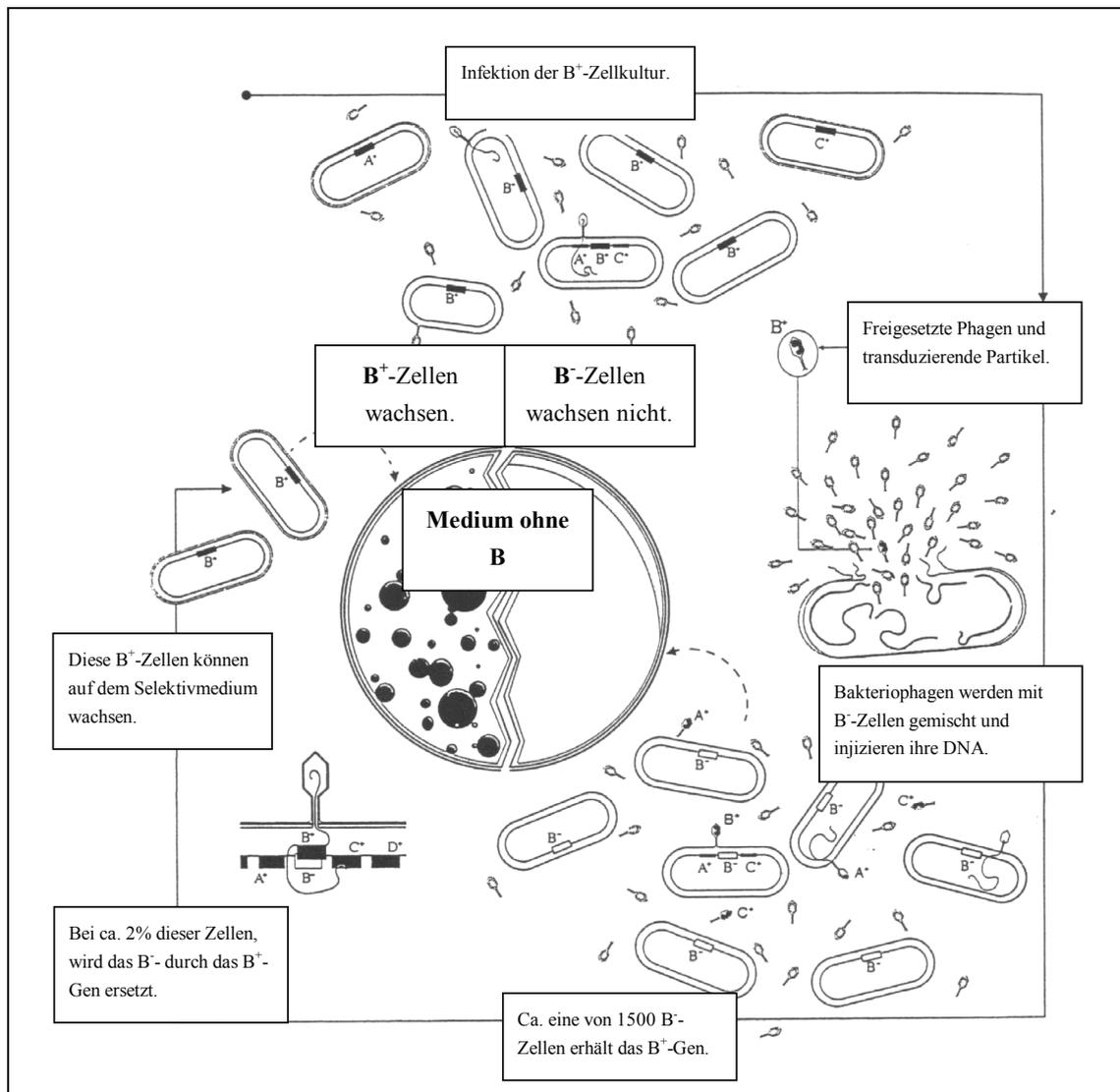


Abb. 1: Überblick über den Nachweis der Transduktion mit traditionellen Methoden.

Dargestellt ist die Herstellung eines Phagenlysats auf einem prototrophen Wirtsstamm und dessen Einsatz zur Transduktion des Markergens B⁺ auf einen B⁻-Rezipienten. Alle Zahlenangaben beziehen sich auf das P1-*E. coli*-System (nach Masters, 1996).

Zur Erweiterung des Wissens über die Verbreitung dieser Gruppe von Bakterienviren in der Natur und den Anteil genereller Transduktion am horizontalen Gentransfer scheint es daher notwendig, Nachweissysteme zu etablieren, die im Gegensatz zu traditionellen Methoden unabhängig von Indikatorstämmen für Nachweis und Vermehrung sowie von Mutantensammlungen für Transduktionsexperimente ist.

3. Zielsetzung der Arbeit

Neben seiner Bedeutung für die Evolution der Prokaryonten hat vor allem die Risikoabschätzung bei der Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen in die Umwelt zu einem gesteigerten Interesse an Mechanismen und Auswirkungen des horizontalen Gentransfers in der Natur geführt. Der bei weitem überwiegende Anteil bisher durchgeführter Studien auf diesem Gebiet konzentrierte sich dabei auf die Übertragung von genetischem Material durch Konjugation und Transformation. Transduktion, der phagenvermittelte Transfer von DNA, wurde dagegen weitgehend vernachlässigt. Einen Hinweis darauf, mit welcher Häufigkeit transduzierende Phagen in natürlichen Bakterienstämmen vorkommen können, lieferten Studien an Naturisolaten des *S. typhimurium*-Komplexes. Von 85 Isolaten setzten 65 (76,5%) 71 verschiedene temperente Phagen frei, und 43 (93,5%) von 46 getesteten Phagen dieser Kollektion besaßen die Fähigkeit generell zu transduzieren (Schicklmaier und Schmieger, 1995). Untersuchungen dieser Art unterliegen jedoch letztlich der Einschränkung, daß der Nachweis freigesetzter Phagen aus lysogenen Bakterienstämmen eines sensitiven Indikatorstammes bedarf und eine Transduktion genetischer Marker nur mit Hilfe mutanter Rezipientenstämme nachweisbar ist. Vor diesem Hintergrund wird offensichtlich, daß ähnliche Studien mit weniger gut etablierten und charakterisierten Bakterienstämmen, als *S. typhimurium* und deren Mutantensammlungen es sind, erfolglos bleiben. Studien zur Aufklärung des Anteils der Transduktion am horizontalen Gentransfer sind zudem von vornherein auf den geringen Anteil an Bakterienspezies beschränkt, die derzeit unter Laborbedingungen kultivierbar sind. Verglichen mit den Kenntnissen, die man heute über Konjugation und Transformation hat, besteht ein erhebliches Wissensdefizit hinsichtlich der phagenvermittelten Genübertragung, obwohl dieser Mechanismus des DNA-Transfers in vieler Hinsicht besonders leistungsfähig erscheint. Phagen sind häufig immun gegen Agenzien mit bakteriostatischer oder bakteriozider Wirkung. Die Verpackung transportierter DNA in Phagenköpfe bietet Schutz vor biologischer Inaktivierung und Abbau durch chemische und biologische Einflüsse. Und jeder Kontakt eines biologisch aktiven Phagenpartikels mit einer potentiellen Wirtszelle führt zur Injektion der transportierten DNA, während konjugativer Gentransfer, ebenso wie die Aufnahme nackter DNA im beträchtlichem Maß vom physiologischen Zustand der beteiligten Zellen abhängig ist.

Vor diesem Hintergrund war es das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, eine molekular-genetische Methode zu etablieren und auf ihre Anwendbarkeit zur Untersuchung von Umweltproben zu überprüfen, die es ermöglicht, transduzierende Phagenpartikel in natürlichen Habitaten ohne die Einschränkungen bisher eingesetzter Methoden durch die notwendige Verfügbarkeit potentieller Wirtszellen und definierter Mutantensammlungen für Phagenvermehrung und Transduktionsexperiment nachzuweisen.

Die Entwicklung der letzten Jahrzehnte auf dem Gebiet der Molekularbiologie eröffnet ungeahnte Einsatzmöglichkeiten dieser Techniken zum Vorteil von Mensch und Natur. Insbesondere die Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen in die Umwelt könnte jedoch ein heute unvorhersehbares Risikopotential darstellen und ist daher Gegenstand kontroverser Debatten über die Sicherheitsbestimmungen in bezug auf den Umgang und Einsatz genmanipulierter Organismen. Die Gefahr der Beeinflussung des ökologischen Gleichgewichts natürlicher mikrobieller Lebensgemeinschaften durch Veränderungen ihrer genetischen Ausstattung auf dem Weg der horizontalen Übertragung rekombinanter DNA könnte eine größere Gefahr für die Integrität eines Ökosystems darstellen als die freigesetzten Organismen selbst. Aufgrund der intensiven Beschäftigung mit Konjugation und Transduktion ist heute sehr viel über deren Bedeutung für den Genaustausch in der Natur, das betroffene Organismenspektrum und die Randbedingungen bekannt. Die erlangten Erkenntnisse fanden Berücksichtigung bei der Konstruktion von Sicherheitsstämmen und -vektoren. An Sicherheitsvektoren wird die Forderung gestellt, daß sie weder selbstübertragbar noch durch andere Plasmide mobilisierbar sind. Das Potential der generellen Transduktion bleibt dabei jedoch unberücksichtigt. Ein Ansatz, die Transduktion von Plasmiden zu unterbinden, könnte darin liegen, die Verpackung von Vektoren in Phagenköpfe zu verhindern. Die Fähigkeit eines generell transduzierenden Phagen, bakterielle DNA zu verpacken, ist eine Folge der fehlerhaften DNA-Erkennung beim Verpackungsvorgang. Unabdingbare Voraussetzung für die Verpackung jeglicher DNA in einen Phagenpartikel ist ein Erkennungssignal für die Terminase, die sogenannte *pac site* (Schmieger, 1984). Es stellt sich daher die Frage, ob alle oder ein Teil der transduzierenden Phagen einer Bakteriengruppe die gleiche Terminase mit identischer *pac site*-Erkennung benutzen. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, durch die Eliminierung *pac*-ähnlicher Sequenzen Sicherheitsvektoren für eine Bakteriengattung oder -spezies zu konstruieren. Durch die Charakterisierung dreier bisher unbekannter *Salmonella*-Phagen, 7D, PS79 und A12, mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu bereits beschriebenen allgemein transduzierenden Bakteriophagen aufgezeigt werden, um weitere Informationen über den Mechanismus der generellen Transduktion zu erhalten. Obwohl sich diese Studien ausschließlich mit der Situation bei *Salmonella* und ihren Phagen beschäftigen, darf angenommen werden, daß die gewonnenen Erkenntnisse als exemplarisch, zumindest auch für die gentechnisch weitaus bedeutendere Spezies *Escherichia coli*, gewertet werden können.

Material und Methoden

1. Material

1.1. Bakterienstämme

Art	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	C	Wildtyp ohne Restriktionssysteme	Bertani et al. (1953)
	JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, hsdR17, relA1, thi, supE44, Δ(lac proAB), F' (traD36, proAB⁺, lac^{pl}, lacZΔM15)</i>	Yanisch-Perron et al. (1985)
	TOP10F'	<i>[lac^{pl} Tn10(Tet^r)] mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>Salmonella enterica serov. typhimurium (Salmonella typhimurium)</i>	DB21	prototropher Wildtyp von LT2, enthält den kryptischen Prophagen Fels1	Laborkollektion
	DB21(P22sie)	Wildtyp, lysogen für P22 (<i>sieA⁺, sieB⁺, ts12.1, ts2.1</i>)	Laborkollektion
	DB21(7D)	Wildtyp, lysogen für 7D	diese Arbeit
	DB21::Tn5	DB21, enthält das Transposon Tn5	diese Arbeit
	DB21::Tn10	DB21, enthält das Transposon Tn10	diese Arbeit
	HisHB22(H1)	<i>hisAB22</i> , lysogen für P22-Wildtyp	Laborkollektion
	TYR8(sie)	<i>trpB8 (sieA⁺, sieB⁺, ts12.1, ts2.1)</i>	Laborkollektion
	LB5000	<i>metA22, metE551, trpD2, leu, ilv452, r_{LT}⁻m_{LT}⁺, r_{SA}⁻m_{SA}⁺, r_{SB}⁻m_{SB}⁺</i>	Bullas et al. (1983)
	LB5000trp ⁺	LB5000, <i>trp⁺</i>	diese Arbeit
	LB5000(PS79)	LB5000, lysogen für PS79	diese Arbeit
	LB5010	<i>metA22, metE551, trpD2, leu, ilv452, r_{LT}⁻m_{LT}⁺, r_{SA}⁻m_{SA}⁺, r_{SB}⁻m_{SB}⁺, galEP1</i>	Bullas et al. (1983)
	TA3092	<i>zeh 608::Tn10</i>	Sanderson und Roth (1983)
	TT8038	<i>zip 1040::Tn5</i>	Sanderson und Roth (1983)

1.2. Bakteriophagen

Bakteriophage	Genotyp	Referenz
7D	Wildtyp	Laborkollektion
A12	Wildtyp	Laborkollektion
ES18	c ⁺	Kuo et al. (1970)
Lambda	Wildtyp	Lwoff (1953)
Mu	Wildtyp	Taylor (1963)
P1	Wildtyp	Bertani (1951)
P22 H5	c2 ⁻ , Klarplaquemutante von P22	Zinder und Lederberg (1952)
PS79	Wildtyp	Laborkollektion

1.3. Vektoren

Vektor	Größe	Selektionsmarker	Referenz
pBR322	4,4 kb	Amp ^R , Tet ^R	Bolivar et al. (1977)
pBR325	6,1 kb	Amp ^R , Tet ^R , Cml ^R	Bolivar et al. (1977)
pCR2.1-TOPO	3,9 kb	Amp ^R	Invitrogen, Groningen, NL
pET32b	5,9 kb	Amp ^R	Novagen
pHapC	4,3 kb	Amp ^R	Laborkollektion
pIC19H	2,7 kb	Amp ^R	Marsh et al. (1984)
pIC19R	2,7 kb	Amp ^R	Marsh et al. (1984)
pIC20H	2,7 kb	Amp ^R	Marsh et al. (1984)
pIC20R	2,7 kb	Amp ^R	Marsh et al. (1984)

1.4. In dieser Arbeit entstandene und verwendete Plasmide

1.4.1. Plasmide mit aus Phagenpartikeln isolierter 16S rDNA im Vektor pCR2.1

Bezeichnung (Accession Nr.)	Größte Homologie zur Datenbanksequenz (Accession Nr.)
pBio I uz K1 (AF324532)	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pBio I uz K2	<i>Aeromonas media</i> (X60410)
pBio I uz K3	<i>Aeromonas media</i> (X60410)
pBio I uz K4	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (L14624)
pBio I uz K5	<i>Aeromonas media</i> (X60410)
pBio I uz K6	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (U34387)
pBio I uz K8	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB013253)
pBio I uz K9	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (L14624)
pBio I uz K30 (AF324530)	<i>Aeromonas veronii</i> Stamm B1 (AF099024)
pBio I uz K32 (AF324537)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (X81663)
pBio I uz K33 (AF324531)	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> (S39232)
pBio I uz K34 (AF324539)	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (U34387)

Bezeichnung (Accession Nr.)	Größte Homologie zur Datenbanksequenz (Accession Nr.)
pBio I uz K38 (AF324538)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (X81663)
pBio I uz K39 (AF324533)	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pBio I uz K40 (AF324534)	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pBio I uz K41 (AF324535)	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pBio I uz K43 (AF324536)	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pBio I s K2	<i>Sphingobacterium multivorum</i> (AB020205)
pBio I s K3	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pBio I s K4	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pBio I s K5	<i>Haemophilus piscium</i> (AJ009860)
pBio I s K9	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB013253)
pBio I s K10	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB013253)
pBio I s K11	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pBio I s K14	<i>Leminorella grimotii</i> (AJ233421)
pBio I s K15	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pBio I s K17	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pBio I s K19	<i>Haemophilus piscium</i> (AJ009860)
pBio I s K20	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB013253)
pBio I s K22	<i>Haemophilus piscium</i> (AJ009860)
pBio I s K23	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ((AJ293463)
pBio I s K24	<i>Haemophilus piscium</i> (AJ009860)
pBio I s K27	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pBio I s K3	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pBio I s K4	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pBio I s K5	<i>Haemophilus piscium</i> (AJ009860)
pBio I s K9	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB013253)
pBio II uz K1	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K2	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K3	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K4	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K5	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K11	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K17	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K24	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K31	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K32	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K33	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K34	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K35	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K37	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K 38	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K 39	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K 45	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K 48	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II uz K 49	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)

Bezeichnung (Accession Nr.)	Größte Homologie zur Datenbanksequenz (Accession Nr.)
pBio II uz K 50	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K1	<i>Dehalospirillum multivorans</i> (X82931)
pBio II s K2	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K3	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K5	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pBio II s K6	<i>Herbaspirillum</i> sp. (AJ012069)
pBio II s K7	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K10	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pBio II s K11	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (X81663)
pBio II s K12	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K14	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K15	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K18	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K19	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K23	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pBio II s K24	<i>Polynucleobacter necessarius</i> (X93019)
pAW 1 K2	<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i> (D84525)
pAW 1 K3	Bakterium der CDC Gruppe IVc-2 str. JHH 1448 (AF067657)
pAW 1 K4	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pAW 1 K7	<i>Herbaspirillum frisingense</i> (AJ238359)
pAW 1 K8	<i>Ralstonia thomassi</i> RAL13 (AJ270256)
pAW 1 K9	<i>Flavobacterium balustionum</i> (M58771)
pAW 1 K10	Gamma Proteobacterium HTB019 (AB010860)
pAW 1 K11	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pAW 1 K15	<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i> (D84525)
pAW 1 K16	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pAW 1 K18	Gamma Proteobacterium HTB019 (AB010860)
pAW 1 K19	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pAW 1 K20	<i>Aeromonas hydrophilia</i> (ATCC 35654) (X74676)
pAW 1 K21	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pAW 1 K23	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 (AF099022)
pAW 1 K24	Gamma Proteobacterium HTB019 (AB010860)
pAW 2 K1	<i>Dehalospirillum multivorans</i> (X82931)
pAW 2 K3	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pAW 2 K4	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pAW 2 K5	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pAW 2 K6	<i>Acinetobacter</i> sp. Hop10 (AF015300)
pAW 2 K8	<i>Acinetobacter</i> sp. Hop10 (AF015300)
pAW 2 K11	<i>Acinetobacter</i> sp. Hop10 (AF015300)
pAW 2 K18	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pAW 2 K21	<i>Campylobacter</i> sp. (L14632)
pAW 2 K23	<i>Acinetobacter</i> sp. Hop10 (AF015300)
pAW 2 K24	<i>Dehalospirillum multivorans</i> (X82931)
pAW 2 K27	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)

Bezeichnung (Accession Nr.)	Größte Homologie zur Datenbanksequenz (Accession Nr.)
pAW 2 K29	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pAW 2 K36	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pAW 2 K47	<i>Dehalospirillum multivorans</i> (X82931)
pHeu K1	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pHeu K2	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pHeu K3	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)
pHeu K4	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pHeu K11	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)
pHeu K15	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)
pHeu K17	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pHeu K18	<i>Pseudomonas synxantha</i> (AF267911)
pHeu K19	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)
pHeu K21	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pHeu K25	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pHeu K30	<i>Pseudomonas synxantha</i> (AF267911)
pHeu K32	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06 (AB056120)
pMoor K2	nicht kultiviertes Bakterium BOL-130 (AF172896)
pMoor K6	nicht kultiviertes Bakterium BOL-130 (AF172896)
pMoor K12	nicht identifiziertes Bakterium B7-1 (AB015577)
pMoor K17	nicht kultiviertes grünes Nicht-Schwefelbakterium (AB015558)
pMoor K20	nicht kultiviertes grünes Nicht-Schwefelbakterium (AB031632)
pMoor K22	nicht kultiviertes Bakterium BOL-130 (AF172896)
pMoor K24	nicht identifiziertes Pansenbakterium RF8 (AF001741)
pMoor K30	nicht identifiziertes Pansenbakterium RF39 (AF001770)

1.4.2. Plasmide mit inserierten Phagen-DNA-Fragmenten

Klonierte DNA-Fragmente des Phagen 7D		
Bezeichnung	Insertgröße	Insert
p32 _{EI}	8600 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p11 _{EI}	8000 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p18 _{EI}	3800 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p20 _{EI}	3800 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p57 _{EI}	3500 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p79 _{EI}	3200 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
pF _{EI}	2700 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p17 _{EI}	2600 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p1 _{EI}	1350 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p31 _{EI}	1300 bp	<i>EcoRI</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRI</i>
p32 _{EV}	6300 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p28 _{EV}	4900 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p29 _{EV}	4500 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p11 _{EV}	3600 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p41 _{EV}	2500 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>

Bezeichnung	Insertgröße	Insert
p52 _{EV}	2400 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p94 _{EV}	2200 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p8 _{EV}	2100 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p93 _{EV}	2100 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p40 _{EV}	1600 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p10 _{EV}	1400 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p9 _{EV}	1300 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p97 _{EV}	1100 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p4 _{EV}	951 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p77 _{EV}	900 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p90 _{EV}	850 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p45 _{EV}	700 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p27 _{EV}	400 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p13 _{EV}	200 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus 7D in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p7D _{1500att}	1500 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus DB21(7D) in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
Klonierte DNA-Fragmente des Phagen PS79		
Bezeichnung	Insertgröße	Insert
p36 _{EV}	5600 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p15 _{EV}	4500 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p28 _{EV}	4000 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p25 _{EV}	4000 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p10 _{EV}	2600 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p80 _{EV}	2450 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p22 _{EV}	2450 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p33 _{EV}	2200 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p12 _{EV}	1800 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p65 _{EV}	1650 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p64 _{EV}	1500 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p75 _{EV}	1100 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p24 _{EV}	800 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p14 _{EV}	700 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p16 _{EV}	600 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p47 _{EV}	300 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p89 _{EV}	300 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p95 _{EV}	240 bp	<i>EcoRV</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p83 _{NI}	5800 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p43 _{NI}	4700 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p4 _{NI}	4000 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p12 _{NI}	4000 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p29 _{NI}	3200 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p11 _{NI}	2400 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p16 _{NI}	1500 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p15 _{NI}	1100 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>

Bezeichnung	Insertgröße	Insert
p20 _{NI}	950 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p31 _{NI}	550 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p27 _{NI}	500 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
p24 _{NI}	400 bp	<i>NruI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>EcoRV</i>
Klonierte DNA-Fragmente des Phagen A12		
Bezeichnung	Insertgröße	Insert
pC _{SI}	5200 bp	<i>SalI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>SalI</i>
pG1 _{SI}	2500 bp	<i>SalI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>SalI</i>
pG2 _{SI}	2500 bp	<i>SalI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>SalI</i>
pI _{SI}	1300 bp	<i>SalI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>SalI</i>
pJ _{SI}	1120 bp	<i>SalI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>SalI</i>
pK _{SI}	948 bp	<i>SalI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>SalI</i>
pL _{SI}	472 bp	<i>SalI</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>SalI</i>
pD _{HIII}	5500 bp	<i>HindIII</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>HindIII</i>
pG _{HIII}	1700 bp	<i>HindIII</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>HindIII</i>
pH _{HIII}	1300 bp	<i>HindIII</i> -Fragment aus PS79 in pIC19H/ <i>HindIII</i>

1.5. Oligonukleotide

Primer	Nukleotidsequenz (5' - 3')
28F	-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG A-
525F	-AAC TCC GTG CCA GCA GC-
1047R	-CAG CCA TGC AGC ACC-
1492R	-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-
M13 (-20) forward	-GTA AAA CGA CGG CCA GT-
M13 reverse	-CAG GAA ACA GCT ATG AC-

Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert.

1.6. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
DNase I, RNase frei	Boehringer, Mannheim
Exonuklease III	New England Biolabs, Schwalbach
Klenow Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Mung Bean Nuklease	New England Biolabs, Schwalbach
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

1.7. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agar Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Antibiotika	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	New England Biolabs, Schwalbach
Dialyseschläuche VISKING (Molekularausschlußgrenze MG 12000-14000)	Roth, Karlsruhe
DNA Gel Extraction Kit QiaEx	Qiagen, Hilden
DNA-Größenstandard: 1 kb-Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
DNA-Größenstandard: 100 bp-Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Faltenfilter (Ø 185 mm)	Schleicher und Schuell, Dassel
HighQ	Bio-Rad Laboratories, München
Hybond TM -N Nylonmembran	Amersham-Buchler, Braunschweig
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Nonradioactive DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer, Mannheim
Nukleotide	Boehringer, Mannheim
Plasmid Mini Prep Spin Kit	Qiagen, Hilden
Polyallomerröhrchen 25 x 89 mm	Beckman Instruments,
Jet Quick Clean-Up Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Roti Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti Phenol Chloroform	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Dassel
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, NL
Whatmann-Papier 3MM	Schleicher und Schuell, Dassel
X-Gal	Biomol, Hamburg

Nicht aufgeführte Feinchemikalien stammen von den Firmen Merck, Darmstadt, und Roth, Karlsruhe.

1.8. Medien und Lösungen

1.8.1. Medien

Alle Nährmedienzusätze wurden von der Firma Difco, Detroit, USA bezogen.

LB-Medium	Trypton	10 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 Liter

LB-Weichagar enthält zusätzlich 0,75% Agar, LB-Agar enthält zusätzlich 1,5% Agar, LB/IPTG/X-Gal-Agar enthält zusätzlich 0,04 mM IPTG und 20 µg/ml X-Gal.

Material und Methoden

M9-Platten	Agar-Agar	15 g
	H ₂ O	890 ml

Nach dem Autoklavieren werden folgende sterile Lösungen zugesetzt:

10 x M9-Salze	100 ml
Glucose (20%)	10 ml
MgSO ₄ (1M)	1 ml
Thiamin (10 mg/ml)	1 ml

M9-Salze	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	150 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
	NaCl	5 g
	NH ₄ Cl	10 g
	H ₂ O	ad 1 Liter

M9-Weichagar enthält zusätzlich 0,75% Agar, M9-Agar enthält zusätzlich 1,5% Agar.

H₂O-Weichagar	Agar Agar	8 g
	H ₂ O	ad 1 Liter

1.8.2. Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	10 µg/ml	H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml	H ₂ O	50 µg/ml
Streptomycin	20 µg/ml	H ₂ O	25 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml	50% EtOH	15 µg/ml

1.8.3. Puffer und Lösungen

CsCl-Lösung (ρ 1,4 g/cm³)	Cäsiumchlorid	39,38 g
	H ₂ O	60,17 ml
	Brechungsindex η = 1,3721	

CsCl-Lösung (ρ 1,6 g/cm³)	Cäsiumchlorid	51,16 g
	H ₂ O	48,84 ml
	Brechungsindex η = 1,3902	

DNase-Puffer	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
	MgCl ₂	10 mM

Gelauftragspuffer (10x)	Glycerin (87%)	5,8 ml
	EDTA pH 8.0 (0,5M)	2,0 ml
	Bromphenolblau	0,25%
	Xylencyanol	0,25%
	H ₂ O	ad 10 ml

Glycerinlösung	Glycerin	65%
	MgSO ₄	100 mM
	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
Neutralisationspuffer	HCl (1 N)	120 ml
	Tris-HCl pH 7,5 (1M)	125 ml
	NaCl (5M)	100 ml
	H ₂ O	655 ml
SM-Puffer	NaCl	5,8 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
	Tris-HCl pH 7,5 (1M)	50 ml
	Gelatine (2%)	5 ml
	H ₂ O	ad 1 Liter
SSC (20x)	NaCl	175,3 g
	Na-Citrat	88,2 g
	H ₂ O	ad 1 Liter
Der pH-Wert der Lösung wird mit HCl auf 7,0 eingestellt.		
TBE (10x)	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	9,3 g
	H ₂ O	ad 1 Liter
TE	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
TE 10.01	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	0,1 mM
VF	Bacto-Trypton	1 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O	ad 1 Liter

2. Methoden

Soweit nicht angegeben, wurden Standardmethoden (Maniatis et al., 1982) verwendet.

2.1. Methoden zur indikatorunabhängigen Identifizierung generell transduzierender Bakteriophagen in natürlichen Habitaten

2.1.1. Entnahme und Aufbereitung von Umweltproben

Bezeichnung der Probe	Herkunft	Entnahmezeit
Bio I	Kläranlage "Gut Marienhof", München, Belebtschlammbecken der biologischen Abwasserreinigung Stufe 1	Dezember 1998
Bio II	Kläranlage "Gut Marienhof", München, Belebtschlammbecken der biologischen Abwasserreinigung Stufe 2	Dezember 1998
AW 1	Kläranlage des lebensmittelverarbeitenden Betriebs Aldinger GmbH u. Co KG, Pforzheim, Belebtschlammbecken der biologischen Abwasserreinigung Stufe 1	März 1999
AW 2	Kläranlage des lebensmittelverarbeitenden Betriebs Aldinger GmbH u. Co KG, Pforzheim, Belebtschlammbecken der biologischen Abwasserreinigung Stufe 2	März 1999
Moor	Sulfidhaltige Quelle des Sippenauer Moors, 20 km südlich von Regensburg	Februar 2000

Es wurden je 2 Liter Probevolumen entnommen. Die Aufbereitung der Proben erfolgte direkt nach der Entnahme. Grobe Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation entfernt (Sorvall, SS34, 3000 rpm, 30 min).

In der Moor-Probe enthaltene filamentös wachsende Konsortien von Mikroorganismen wurden vor der Zentrifugation durch kräftiges Rühren zerkleinert. Zentrifugationsüberstände wurden mittels Filtration durch bakteriendichte Filter (Schleicher & Schuell, Porengröße 0,45 µm) sterilisiert. Die Keimfreiheit der Proben wurde durch Verteilung von je 3 ml Probevolumen auf LB-Agarplatten und Inkubation bei 15°C und 30°C für 48 Stunden, für Moorproben bei 10°C für 96 Stunden, überprüft. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

2.1.2. Herstellung und Aufbereitung eines Heuaufgusses

300 g Heu wurden mit 2 Liter VF versetzt und für 5 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Heureste wurden mittels Passage durch ein grobes Sieb abgetrennt. Grobe Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation entfernt (Sorvall, SS34, 3000 rpm, 30 min). Der Überstand wurde durch Filtration durch bakteriendichte Filter (Schleicher & Schuell, Porengröße 0,45 µm) sterilisiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Die Keimfreiheit der Probe wurde durch Verteilung von je 3 ml Probevolumen auf LB-Agarplatten und Inkubation bei 15°C und 30°C für 48 Stunden überprüft.

2.1.3. Konzentrierung der Phagenpartikel aus Umweltproben

2.1.4. Konzentrierung von Phagenpartikeln durch Ultrazentrifugation

Phagenpartikel wurden aus je einem Liter gereinigter steriler Umweltprobe angereichert. Dazu wurden sechs sterile Polyallomerröhrchen (Beckman, 25 x 89 mm) befüllt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Röhrchen erneut befüllt. Das Gehänge des Rotors (TST 2838) wurde jeweils vor der ersten Zentrifugation mit 1M NaOH gereinigt, um eine Kontamination der Proben mit Phagen des Laborbetriebs zu verhindern. Die Zentrifugation erfolgte für zwei Stunden bei 22000 rpm (Kontron TGA-50). Das Sediment jedes Zentrifugenröhrchens wurde in 500 µl DNase-Puffer unter Zugabe von 1 µg des linearisierten Kontrollplasmids pHpaC resuspendiert.

2.1.5. Konzentrierung von Phagenpartikeln über HighQ-Säulen

Säulen mit einem Packungsvolumen von 10 ml wurden nach Angaben des Herstellers mit HighQ-Säulenmaterial (BioRad) gefüllt, mit 1M NaOH sterilisiert und mit sterilem Leitungswasser äquilibriert. Ein Liter gereinigter steriler Umweltprobe wurde mit einer Durchflußrate von 3 ml/min aufgetragen. Die Elution gebundener Phagenpartikel erfolgte mit 10 ml NaCl 1M. Nach der Konzentration wurden die Proben dreimal für je eine Stunde gegen DNase-Puffer dialysiert, die Dialysate in 15 ml-Falkon-Röhrchen überführt und mit je 20 µg des linearisierten Kontrollplasmids pHpaC versetzt.

2.1.6. Enzymatischer Abbau nicht in Phagenpartikel enkapsulierter DNA

Die konzentrierten Proben wurden mit DNase- (35 µl/ml Probevolumen), RNase- und Lysozym-Lösung (je 10 µl/ml Probevolumen) versetzt und über Nacht bei 6°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 Vol Chloroform extrahiert und für 30 min bei 3000 rpm (Heraeus Minifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Lysozym-Lösung (10 µl/ml Probevolumen) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren Chloroformbehandlung und anschließender Zentrifugation wurden die Proben ein weiteres Mal mit DNase- (35 µl/ml Probevolumen), RNase- und Lysozym-Lösung (je 10 µl/ml Probevolumen) versetzt und über Nacht bei 6°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Alle Enzym-Lösungen hatten eine Konzentration von 10 mg/ml.

2.1.7. Isolierung von in Phagenpartikeln verpackter DNA

In Phagenpartikel verpackte DNA wurde durch Phenol/Chloroform-Behandlung nach Maniatis et al. (1982) isoliert. Proben gleicher Herkunft und Anreicherung wurden vereinigt und zur Öffnung der Phagenpartikel mit 1 Vol Phenol versetzt, 20 min unter leichtem Schwenken inkubiert und bei 3000 rpm für 30 min (Heraeus Minifuge) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und dreimal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Phenolreste wurde durch Behandlung mit 1 Vol CIA entfernt. DNA wurde unter Zugabe von 0,4 Vol 5M NH₄Ac und 2 Vol Ethanol absolut über Nacht bei -80°C gefällt und durch Zentrifugation (Sigma 2K15, 30 min, 15000 rpm, 4°C) sedimentiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, unter Vakuum im Exikator getrocknet und in 50 µl bidest. H₂O unter leichtem Schwenken bei 6°C über Nacht gelöst.

2.1.8. PCR-Amplifikation

2.1.8.1. PCR-Amplifikation des Kontrollplasmids pHpaC

Zur Amplifikation des Kontrollplasmids pHpaC wurden die Primer M13 (-20) universal und M13 reverse eingesetzt. Die Sequenzen der Primer sind unter 1.5. aufgelistet. Aus Phagenpartikeln extrahierte DNA wurde in fünf Kontroll-PCR-Ansätzen auf Freiheit von amplifizierbaren Resten des Plasmids überprüft. Dazu wurden jeweils 0,1 µl, 0,5 µl, 1 µl, 3 µl und 5 µl der DNA-Präparationen als Template eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde jeweils eine PCR-Reaktion mit 10 ng Plasmid-DNA angesetzt. Für alle PCR-Reaktionen wurde die native *Taq*-Polymerase der Firma MBI Fermentas verwendet.

 PCR-Bedingungen

Anfangsdenaturierung	95°C	5 min	30 Zyklen
Denaturierung	95°C	1 min	
Anlagerung	50°C	1 min	
Extension	72°C	2 min	
Letzte Extension	72°C	7 min	

 PCR-Ansatz

	Template-DNA
1,5 µl	je Primer [10 µM]
1,0 µl	PCR Nukleotid Mix [10 mM je Nucleotid]
0,5 µl	Native- <i>Taq</i> -Polymerase [5 U/µl]
5,0 µl	10 x PCR-Puffer
5,0 µl	MgCl ₂ -Lösung [25 mM]
	bidest. H ₂ O ad 50 µl

PCR-Ansätze zur Kontrolle des Plasmidabbaus wurden in der Speed Vac (Servant) auf 20 µl eingengt und auf einem Agarosegel auf Freiheit von Amplifikationsprodukten überprüft.

2.1.8.2. PCR-Amplifikation der 16S rDNA

Zur Amplifikation der 16S rDNA wurden die Primer 28F und 1492R eingesetzt. Die Sequenzen der Primer sind unter 1.5. aufgelistet. Als Positivkontrolle wurde jeweils eine PCR-Reaktion mit 10 ng P22-DNA, als Negativkontrolle eine PCR-Reaktion mit 100 ng Lambda-DNA angesetzt. Für alle PCR-Reaktionen wurde die native *Taq*-Polymerase der Firma MBI Fermentas verwendet. Zur Isolierung der 16S rDNA wurden je 100 ng aus Umweltproben gewonnener DNA eingesetzt. PCR-Bedingungen und -Ansätze waren identisch mit denen der unter 2.1.8.1. beschriebenen Kontrollamplifikation mit der Ausnahme, daß in diesem Fall 3 µl MgCl₂-Lösung [25 mM] eingesetzt wurden. PCR-Kontrollansätze mit Lambda-DNA wurden in der Speed Vac (Servant) auf 20 µl eingengt und auf einem Agarosegel auf das Fehlen von Amplifikationsprodukten überprüft.

2.1.9. Klonierung und Transformation von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits nach den Angaben des Herstellers in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert und in den *E. coli*-Stamm TOP10F' transformiert. Transformanten wurden auf LB-Platten mit Ampicillin, IPTG und X-gal selektioniert.

2.1.10. Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach der *Boiling*-Methode (Maniatis et al., 1982) präpariert. Zur Sequenzierung ausgewählte Plasmide wurden mit dem Jet Quick Clean-Up Kit der Firma Genomed nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

2.1.11. Sequenzierung

Klonierte 16S rDNA-Sequenzen wurden unter Verwendung des "Dye Terminator Sequencing Kit AmpliTaq FS" und des Sequenzierautomaten ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer) durchgeführt.

Thermocycler-Protokoll		Reaktionsansatz	
Hot Start		Premix	3 µl
96°C	10 s	Plasmid-DNA	1,2 µg
50°C	50 s	Primer	15 pmol
60°C	4 min	bidest. H ₂ O	ad 20 µl
	30 Zyklen		

Zur Sequenzierung wurden die Primer M13 (-20) universal, M13 reverse und 525F eingesetzt. Zur Sequenzierung der 16S rDNA-Sequenzen der Moorprobe wurde zusätzlich Primer 1047R verwendet. Die Sequenzen der Primer sind unter 1.5. aufgelistet.

2.1.12. Chimärentest und Zuordnung anonymer 16S rDNA-Sequenzen

Um die aus den Klonierungen erhaltenen Sequenzen den Wirten transduzierender Bakteriophagen zuzuordnen und auf Chimärenbildung zu überprüfen, wurde das Programm FASTA (Pearson und Lipman, 1988) verwendet. 500 bp große Abschnitte, die die 3'- und 5'-Enden der amplifizierter 16S rDNA-Sequenzen repräsentierten, wurden zur Suche nach homologen Sequenzen eingesetzt. Sequenzen wurden dann als chimär eingestuft, wenn den Teilbereichen eines Klons verschiedene Organismen zugeordnet

wurden. Zur Identifizierung der Wirte transduzierender Phagen wurden nur Sequenzen eingesetzt, die sich in diesem Test als nicht chimär erwiesen hatten. Mit diesen Sequenzen wurde im Anschluß eine weitere Homologiesuche in der Datenbank durchgeführt. Dazu wurden die vollständig sequenzierten 16S rDNA-PCR-Produkte eingesetzt. Die Zuordnung wurde nochmals durch Vergleich mit den Ergebnissen der Teilsequenzen überprüft. Zur Feststellung der prozentualen Sequenzübereinstimmung der Klonsequenzen mit den zugeordneten Sequenzen der Datenbank wurden die Sequenzen aus der EMBL-Datenbank entnommen. Der Sequenzvergleich erfolgte unter Verwendung des Programms McMolly Compare.

2.2. Weitere angewendete Methoden

2.2.1. Phagenvermehrung

Zur Vermehrung von Phage wurden Lysate in großem Maßstab als Flüssiglysate sowie in kleinem Maßstab als Plattenlysate hergestellt.

2.2.2. Flüssiglysate

Lysate mit einem Volumen zwischen 50 und 200 ml wurden in Form von Flüssiglysaten hergestellt. Indikatorzellen einer Übernachtskultur wurden 1 : 100 in LB-Medium inokuliert und aerob bei 37°C inkubiert. Die Infektion der Bakterienkultur erfolgt bei Trübplaquephagen bei einer Zelldichte von ca. 1×10^8 Zellen/ml ($OD_{580} = 0,1$) mit einer m.o.i. von 0,1 – 0,3. Geringe Infektionsmultiplizität soll dabei einer Lysogenisierung der Wirtszellen entgegenwirken. Zur Vermehrung von Klarplaquephagen erfolgte die Infektion der Bakterienkulturen bei einer Zelldichte von ca. 2×10^8 Zellen/ml ($OD_{580} = 0,2$) mit einer m.o.i. von ≥ 5 . Nach der Lyse der Bakterienzellen, bei Trübplaquephagen nach ca. 150 – 180 min, bei Klarplaquephagen nach ca. 90 min wurden noch vorhandene Wirtszellen durch Zugabe von 1/10 Vol Chloroform lysiert und Zellreste durch Zentrifugation (Sorvall Superspeed RC2-B, Rotor SS34, 15 min, 10000 rpm) abgetrennt.

2.2.3. Plattenlysate

Plattenlysate wurden zur Gewinnung kleiner Lysatmengen mit hohen Phagentitern hergestellt. Dazu wurden LB-Platten mit einem Gemisch aus 100 µl Übernachtskultur des Wirtstammes und 100 µl Phagenlysat verschiedener Verdünnungsstufen in 3 ml Weichagar überschichtet und bei 37°C über Nacht bebrütet. Platten geeigneter Verdünnungsstufen, die konfluente Lyse aufwiesen, wurden mit 5 ml LB-Medium unter leichtem Schütteln für 90 min abgeschwemmt. Durch diese Behandlung ist es möglich, einen Großteil der Phagen aus dem Agar freizusetzen. Der Plattenüberstand wurde an-

schließlich abgesaugt. Das Lysat verunreinigende Wirtszellen und Agarreste wurden durch Zentrifugation (Minifuge Haereus, 10 min, 3000 rpm) entfernt.

2.2.4. Titerbestimmung von Phagenlysaten

Zur Bestimmung des Titers eines Phagenlysats wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des Lysats in VF hergestellt. Je 100 µl der Verdünnungen wurden mit 100 µl einer Übernachtskultur des Wirtsstammes in 3 ml Weichagar gemischt. Mit diesem Gemisch wurden LB-Platten überschichtet. Nach dem Erstarren der Weichagardeckschicht wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Phagenplaques wurden ausgezählt und der Phagentiter berechnet.

2.2.5. Konzentrierung von Phagenlysaten durch Ultrazentrifugation

Phagen aus Flüssiglysaten wurden durch Ultrazentrifugation (Kontron TGA-50, Rotor TST 2838, 90 min, 22000 rpm) konzentriert. Phagensedimente aus je 38,5 ml Lysat wurden in 300 µl VF unter Zusatz von je 5 µl DNase- und RNase-Stammlösung (Konzentration = 10 mg/ml) bei 4°C über Nacht unter Schütteln gelöst.

2.2.6. Reinigung und Konzentrierung von Phagenpartikeln durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Phagen aus Flüssiglysaten durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und konzentriert. 5 ml CsCl-Lösung mit einer Dichte von $\rho = 1,6 \text{ g/cm}^3$ wurden in Polyallomerröhrchen (Beckmann Instruments, 25 X 89 mm, 38,5 ml) gefüllt und mit 10 ml CsCl-Lösung mit einer Dichte von $\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$ überschichtet. Auf den Gradienten wurden 23,5 ml Lysat aufgetragen. Nach der Zentrifugation (Kontron TGA-50, Rotor TST 2838, 90 min, 22000 rpm) wurde die phagenenthaltende Schicht, die im Trennbereich der CsCl-Schichten bei einer Dichte von etwa $1,5 \text{ g/cm}^3$ als schimmernde Bande zu erkennen ist, mit einer Kanüle abgesaugt und zur Entfernung des Cäsiumchlorids gegen TE dialysiert.

2.2.7. Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.7.1. Isolierung von Phagen-DNA

Durch Ultrazentrifugation konzentrierte und in VF resuspendierte Phagenlysate wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zum Aufschluß von Phagenpartikeln wurde der Ansatz mit 40 µl Pronase P-Lösung (Konzentration = 10 mg/ml) gemischt, mit 80 µl frischem SDS-Mix versetzt und jeweils für 1 Stunde bei 30°C sowie bei 70°C inkubiert.

Nach Zugabe von 100 µl KaAc 8M (ungepuffert, durch Whatmann-Papier filtriert) und 15 min Inkubation auf Eis wurden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation (Sigma 2K15, 15 min, 15000 rpm, 4°C) abgetrennt. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Überstand mit 1 Vol Phenol/Chloroform versetzt, 20 min geschüttelt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert (Eppendorf 5415, 15 min, 15000 rpm, RT). Die DNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen. Je nach Verunreinigung der Probe wurde die Phenol/Chloroform-Behandlung 3 - 4 mal wiederholt. Phenolreste wurde durch Behandlung mit 1 Vol CIA entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Vol 3M NaAc (ungepuffert) und 1 Vol Isopropanol bei RT gefällt und durch Zentrifugation (Sigma 2K15, 30 min, 15000 rpm, 4°C) sedimentiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE gelöst.

2.2.8. Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.8.1. Plasmid-DNA-Präparation nach Birnboim und Doly (1979)

Bakterien einer 5 ml-Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (Heraeus Minifuge, 10 min, 6000 rpm) sedimentiert und in 300 µl TE resuspendiert. Der Ansatz wurde zur Lyse der Zellen mit 300 µl NaOH (0,3M)/SDS (2%)-Lösung unter leichtem Schwenken gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl KaAc 8M und Inkubation für 20 Minuten auf Eis wurden die denaturierten Proteine abzentrifugiert (Sigma 2K15, 15 min, 15000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol Phenol/Chloroform gemischt. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation (Eppendorf 5415, 15 min, 15000 rpm, RT) wurde die obere wässrige Phase abgenommen. Phenolreste wurden durch Behandlung mit 1 Vol CIA entfernt. Die in der wässrigen Phase gelöste Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (Sigma 2K15, 30 min, 15000 rpm, 4°C) sedimentiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE gelöst.

2.2.8.2. Plasmid-DNA-Präparation über Ionenaustauschersäulen

Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde unter Verwendung des "Plasmid Mini Prep Spin Kit" der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers präpariert und in bidest. H₂O gelöst.

2.2.9. Isolierung bakterieller chromosomaler DNA nach Pospiech und Neumann (1995)

Zellen aus 2 ml Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (Heraeus Minifuge, 10 min, 6000 rpm) und der Niederschlag in 500 µl SET resuspendiert. Der Ansatz wurde zur Lyse der Zellen mit 10 µl Lysozymlösung (2 mg/ml) versetzt, gut gemischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Es wurden 0,1 Vol 10%ige SDS-Lösung und 0,5 mg/ml Proteinase K zugegeben und der Ansatz unter gelegentlichem Schwenken für 2 Stunden bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,3 Vol NaCl 5M und 1 Vol Chloroform wurde die Suspension für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Proteine wurden durch Zentrifugation in der Interphase konzentriert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 Vol Phenol/Chloroform (pH 8,0) gründlich gemischt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt und die DNA-haltige wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die Phenol/Chloroform-Behandlung wurde so oft wiederholt, bis keine proteinhaltige Interphase mehr zu erkennen war. Phenolreste wurden durch die Behandlung mit 1 Vol CIA entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation sedimentiert. Der DNA-Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE gelöst. Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Sigma-Zentrifuge 2K15 für 15 min bei 15000 rpm und 4°C durchgeführt.

2.2.10. Transduktion

2.2.10.1. Transduktion chromosomaler Markergene

Zur Transduktion chromosomaler Markergene wurden die Phagen zunächst auf dem Spenderstamm vermehrt. 100 µl einer frischen Übernachtskultur des Empfängerstammes wurden mit 100 µl des sterilfiltrierten verdünnten Spenderlysats gemischt. Die Verdünnung des Lysats wurde dabei so gewählt, daß die Infektionsmultiplizität kleiner als 10 war, um die Proportionalität zwischen Phagenkonzentration und transduzierten Zellen zu gewährleisten. Das Transduktionsgemisch wurde zur Adsorption der Phagenpartikel bei 37°C inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtete sich dabei nach dem jeweiligen Phagen-Wirtssystem. Zum Test der Transduktion bei Auxotrophiemarkern wurden je 100 µl des Ansatzes auf M9-Platten verteilt und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurde der jeweilige Empfängerstamm auf Wachstum auf Minimalmedium sowie die Sterilität des Phagenlysats auf Vollmedium überprüft. Bei der Transduktion chromosomaler Resistenzmarker wurde der Transduktionsansatz nach der Adsorption mit 400 µl LB-Medium aufgefüllt und zur Expression des Antibiotikaresistenzgens 60 min bei 37°C geschüttelt. 100 µl des Ansatzes wurden auf antibiotikahaltige Vollmedienplatten verteilt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Zur Kontrolle wurde der jeweili-

ge Empfängerstamm auf antibiotikahaltigen Platten sowie die Sterilität des Phagenlysats auf Vollmedienplatten überprüft. Nach der Inkubation der Platten wurden die Transduktanten ausgezählt und das Verhältnis von Transduktanten zu infektiösen Partikeln (T/P-Wert) bestimmt. Da die Empfängerzellen in der stationären Wachstumsphase transduziert wurden, war nicht mit einer nennenswerten Verfälschung der T/P-Werte durch Teilung der Zellen während der Schüttelinkubation zu rechnen.

2.2.10.2. Transduktion plasmidkodierter Markergene

Zur Untersuchung der Plasmidtransduktion wurden Phagen auf dem plasmidhaltigen Spenderstamm vermehrt. Transduktionsansatz und Kontrollen wurden, wie für die Transduktion chromosomaler Resistenzmarker beschrieben, durchgeführt.

2.2.11. Transformation von Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* und *Salmonella* sowie deren Transformation erfolgte nach der Methode von Nishimura et al. (1990).

2.2.12. DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelen (0,5% - 1,0% Agarose) mit 1 x TBE als Laufpuffer bei einer Spannung von 70 - 110 Volt. Zur Anfärbung der DNA wurde der Gellösung sowie dem Laufpuffer Ethidiumbromid (Endkonzentration = 0,4 µg/ml) zugesetzt. Als Molekulargewichtsmarker dienten *EcoRI*-gespaltene P22-DNA sowie die 1 kb und die 100 bp DNA-Leiter (New England Biolabs).

P22/ <i>EcoRI</i>		1 kb DNA-Leiter		100 bp DNA-Leiter	
Fragment	Größe (bp)	Fragment	Größe (bp)	Fragment	Größe (bp)
A	19510	A	10000	A	1517
B	9278	B	8000	B	1200
C	7322	C	6000	C	1000
D	4077	D	5000	D	900
E	2490	E	4000	E	800
F	1181	F	3000	F	700
G	1114	G	2000	G	600
H	830	H	1500	H	517
		I	1000	I	500
		J	500	J	400
				K	300
				L	200
				M	100

Fragmentgrößen der Molekulargewichtsmarker.

2.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des DNA-Gelextraktions-Kits "QiaEx" der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

2.3.1. DNA-Hybridisierung

2.3.1.1. Southern-Transfer

Mit Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA wurde in Agarosegelen (0,8%) elektrophoretisch getrennt. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 15 min bei RT in NaOH 0,5M inkubiert. Anschließend wurde das Gel 20 min bei RT in Neutralisationspuffer neutralisiert und 20 min bei RT in 20 x SSC äquilibriert. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken. Für den DNA-Transfer wurde das Gel luftblasenfrei invers auf 3 mit 20 x SSC-getränkte Lagen Whatman-Papier (3MM) gelegt und die Ränder des Gels mit Parafilm abgedichtet, um Kriechströme des Kapillarstroms zu vermeiden. Auf das Gel wurden - luftblasenfrei und mit 20 x SSC angefeuchtet - eine Nylonmembran sowie 3 Lagen Whatman-Papier aufgelegt.

Der DNA-Transfer erfolgte über Nacht mittels Kapillarstrom der SSC-Lösung, der durch Auflage von saugfähigen Papiertüchern erzeugt wurde. Die transferierte DNA wurde durch UV-Bestrahlung (254 nm, 30 s, 120 mJ) auf der Nylonmembran fixiert.

Für den Transfer bakterieller chromosomaler DNA wurde vor der NaOH-Behandlung eine zusätzliche DNA-Denaturierung mit 0,2%-iger HCl durchgeführt (10 min bei Raumtemperatur).

2.3.1.2. Dot Blot

Ungeschnittene DNA wurde durch 10-minütige Inkubation bei 95°C denaturiert, auf einem Eis/Ethanolgemisch abgekühlt und auf eine Nylonmembran getropft. Die Fixierung der DNA erfolgte durch UV-Bestrahlung (254 nm, 30 s, 120 mJ) der Membran.

2.3.1.3. Herstellung von DNA-Sonden und Hybridisierung

Zur Hybridisierung auf Nylonmembranen fixierter DNA wurden digoxigeninmarkierte DNA-Sonden eingesetzt. Die Herstellung der Sonden sowie der immunologische Nachweis zu den eingesetzten Sonden komplementärer membrangebundener DNA erfolgte unter Verwendung des "Nonradioactive DNA labelling and detection kit" (Boehringer Mannheim) nach den Angaben des Herstellers.

Ergebnisse

1. Ein indikatorunabhängiges Nachweissystem zur Detektion generell transduzierender Bakteriophagen in der Natur

1.1. Das Konzept des indikatorunabhängigen Nachweissystems

Das Lysat eines generell transduzierenden Bakteriophagen beinhaltet zu einem gewissen Prozentsatz allgemein transduzierende Partikel, die in ihrer Gesamtheit das vollständige Genom ihrer Wirtszelle repräsentieren. Aus Phagenköpfen extrahierte DNA stellt somit ein Gemisch aus Phagen-genomen und der Genbank der phagenpropagierenden Zellen in phagen-genomgroßen Bruchstücken dar. Mittels PCR-Amplifikation sollte es daher, unter Verwendung spezifischer Primer, möglich sein, ausgewählte DNA-Abschnitte des Genoms der Wirtszelle zu isolieren. Auf diese Weise isolierte Sequenzen sollten einerseits die Anforderungen an einen bakteriellen phylogenetischen Marker erfüllen, andererseits eindeutig niemals natürlicher Bestandteil eines Phagen-genoms sein. Etwa 40 Gene haben sich als geeignete Werkzeuge für taxonomische Studien erwiesen, darunter Sequenzen, die für DNA-Polymerasen, Elongationsfaktoren und ribosomale Proteine kodieren. Der überwiegende Anteil der Forschung auf diesem Gebiet konzentriert sich aktuell auf Gene, die für ribosomale RNAs (rDNA) kodieren, und hier insbesondere auf die Sequenz der 16S rDNA.

16S rDNA-Sequenzen dienen heute in der Prokaryontentaxonomie als wichtige Marker zur Erstellung hochauflösender Stammbäume sowie zur Identifizierung und Klassifizierung derzeit nicht kultivierbarer Bakterien mittels DNA-Sequenzierung und DNA-Hybridisierungstechniken. Aufgrund ihrer Zusammensetzung aus über alle bakteriellen Spezies hochkonservierten sowie variablen Sequenzabschnitten stellt ihre Primärstruktur ein optimales Werkzeug für die molekulargenetische taxonomische Analyse von Prokaryonten dar. So ermöglichen konservierte Sequenzabschnitte z. B. den speziesunabhängigen Einsatz von Oligonukleotiden als Primer für die Sequenzierung oder PCR-Amplifikation der 16S rDNA. Variable Sequenzabschnitte dienen quasi als "Fingerabdrücke" einer Bakteriengattung oder -art zu deren Identifizierung. Die 16S rRNA ist als Bestandteil der Ribosomen für Bakterienzellen essentiell und damit ubiquitär. Die enorme Zahl von aktuell über 22.000 in Genbanken veröffentlichten 16S rDNA-Sequenzen ermöglicht die schnelle taxonomische Einordnung einer unbekanntem Sequenz. Da 16S rRNA-Gene jedoch niemals natürlicher Bestandteil eines Virusgenoms sind, erschien die Amplifikation und Sequenzierung in Phagenköpfe verpackter 16S rDNA als geeignetes Konzept zum Nachweis allgemein transduzierender Phagenpartikel und

zur retrospektiven Identifizierung der Wirte generell transduzierender Bakteriophagen in natürlichen Habitaten.

1.2. Das Problem der freien DNA

Unabdingbare Voraussetzung für den Einsatz eines solchen Detektionssystems ist der Abbau sämtlicher, außerhalb von Phagenpartikeln vorhandener DNA in einer Umweltprobe vor der Öffnung der Viruspartikel. Nur so ist es möglich, falsch positive Amplifikationsprodukte durch freie bakterielle DNA auszuschließen. Um dies zu gewährleisten, wurden zwei unabhängige Kontrollsysteme etabliert.

1) Zur Kontrolle der Effektivität der Degradation freier DNA vor dem Aufschluß der Phagenpartikel wurden konzentrierten, Phagenpartikel enthaltenden Proben vor dem enzymatischen Abbau freier DNA hohe Konzentrationen eines Kontroll-Plasmids, pHpaC, zugesetzt. Dieses Plasmid mit einem Insert, dessen Größe (1,6 kb) in etwa dem der kodierenden Sequenz der 16S rRNA entspricht, wurde zur Simulation freier bakterieller DNA vor der Zugabe mittels Restriktionsspaltung mit *NdeI* im Vektoranteil linearisiert. Das 1,6 kb-Insert konnte mit den Primern M13(-20) forward und M13 reverse mittels PCR amplifiziert werden. Dadurch war es möglich den enzymatischen Abbau der Kontroll-DNA zu dokumentieren. Durch die Zugabe des Kontroll-Plasmids in Konzentrationen, die weit über der freier DNA in Umweltproben liegen, konnte davon ausgegangen werden, daß bei erfolgreicher Degradation der Plasmid-DNA auch die gesamte, nicht in Phagenköpfe verpackte, bakterielle DNA in einer Probe enzymatisch abgebaut worden war.

2) Alle Schritte der Aufarbeitung einer Phagenpartikel enthaltenden Probe wurden jeweils parallel mit einem Lysat des *E.coli*-Phagen Lambda durchgeführt. Als speziell transduzierender Phage ist Lambda nicht in der Lage 16S rRNA-Gene zu transduzieren. Die Abwesenheit eines PCR-Produktes unter Verwendung 16S rDNA-spezifischer Primer zeigt so einerseits den Abbau freier bakterieller DNA sowie andererseits die Freiheit der Proben von DNA-Kontaminationen bakteriellen Ursprungs durch Agenzien, die nach dem Aufschluß der Phagenpartikel eingesetzt wurden.

1.3. Die Etablierung der Methode mit dem generell transduzierenden *Salmonella*-Phagen P22

Das vorliegende Protokoll des indikatorunabhängigen Nachweises generell transduzierender Bakteriophagen in natürlichen Habitaten stellt einen grundlegenden Teil der vorliegenden Arbeit dar und wird deshalb im folgenden beschrieben. Es wurde mit dem allgemein transduzierenden *Salmonella*-Phagen P22 etabliert und optimiert und setzt sich aus folgenden Einzelschritten zusammen:

1. Vorbehandlung der Lysate und Konzentrierung der Phagenpartikel
2. Degradation freier DNA in konzentrierten Phagenlysaten mit DNase I
3. Extraktion der in Phagenpartikel verpackten DNA
4. PCR-Amplifikation aus Phagenpartikeln freigesetzter bakterieller 16S rDNA-Sequenzen
5. Kontrolle des Abbaus freier DNA mittels PCR
6. Klonierung und Sequenzierung der 16S rDNA-Amplifikationsprodukte
7. Retrospektive Identifizierung der Wirte generell transduzierender Phagen

Die folgende Beschreibung der Einzelschritte bezieht sich auf das standardisierte Protokoll, wobei an einigen Stellen auf besondere Probleme der Etablierung des Systems eingegangen wird. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte ist im Abschnitt Material und Methoden zu finden. Abbildung 4 zeigt die Zusammenfassung des Protokolls für die Präparation und PCR-Amplifikation in Phagenköpfe verpackter DNA.

1. Vorbehandlung der Lysate und Konzentrierung der Phagenpartikel

Lysate des Phagen P22 wurden durch langsame Zentrifugation (3000 rpm, 30 min, Rotor SS34) von groben Verunreinigungen befreit und anschließend sterilfiltriert. Die Keimfreiheit der Proben wurde durch Sterilitätskontrolle auf LB-Agarplatten überprüft. Zur Konzentrierung wurden Phagenpartikel aus 38,5 ml Lysat durch Ultrazentrifugation (22000 rpm, 120 min, Rotor TST2838) sedimentiert und in 500 µl DNase-Puffer resuspendiert.

2. Degradation freier DNA in konzentrierten Phagenlysaten mit DNase I

Die vollständige Degradation aller außerhalb von Phagenpartikeln vorliegender freier DNA stellt den kritischsten Punkt dieses Detektionssystems dar. Nur wenn ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei den später amplifizierten 16S rDNA-Sequenzen um Amplifikationsprodukte freier DNA aus der untersuchten Probe handelt, erlauben die

letztlich isolierten Sequenzen Rückschlüsse auf das Vorkommen generell transduzierender Bakteriophagen in einem Habitat. Zur Überprüfung des vollständigen Abbaus freier DNA dienten die unter Punkt 1.2. beschriebenen Kontrollsysteme.

Eine Behandlung der Phagenkonzentrate mit DNase I, wie in Standardprotokollen zur Präparation von Phagen-DNA beschrieben, erwies sich als unzureichend. Es ist anzunehmen, daß eine Assoziation freier DNA mit Membranbestandteilen lysierter Zellen sowie Spuren des Wachstumsmediums, das zur Herstellung der Phagenlysate verwendet wurde, bzw. in der späteren Anwendung organische und anorganische Bestandteile der konzentrierten Umweltproben die Effizienz der enzymatischen Behandlung herabsetzen. Eine dreistufige DNase I-Behandlung unter Zugabe von Lysozym in DNase-Puffer erwies sich als geeignet, um DNA-Kontaminationen so weit zu reduzieren, daß deren Nachweis mittels der eingesetzten Kontrollamplifikation nicht mehr möglich war. Um einer Kontamination der Proben mit Luftkeimen entgegenzuwirken, wurden die Proben nach der ersten und zweiten DNase-Behandlung mit Chloroform extrahiert. Aufgrund der Sensitivität der Kontrollreaktionen (vgl. Punkt 5.) konnte davon ausgegangen werden, daß in dieser Weise präparierte Phagenkonzentrate frei von kontaminierender DNA waren.

3. Extraktion der in Phagenpartikel verpackten DNA

In Phagenpartikel verpackte DNA wurde durch Behandlung der Proben mit Phenol-Chloroform freigesetzt. Die anschließende Präzipitation der DNA erfolgte, unter Berücksichtigung des späteren Einsatzes als Matrize für die PCR-Amplifikation, mit Ammoniumazetat und Ethanol. Im Rahmen von Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß Proteasen, die in verschiedenen Protokollen zum Aufschluß von Phagenpartikeln eingesetzt werden, Kontaminationen mit bakterieller DNA aufweisen (Daten nicht gezeigt). Auf den Einsatz dieser Enzyme wurde daher verzichtet.

4. PCR-Amplifikation aus Phagenpartikeln freigesetzter bakterieller 16S rDNA-Sequenzen

DNA-Präparationen aus Partikel generell transduzierender Phagen stellen ein Gemisch aus genomischer DNA des Phagen einerseits und einer stark verdünnten Genbank der Wirtszelle andererseits dar. Zur Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA aus diesem Gemisch mittels PCR wurden zwei Primer, 28F und 1492R (Basenpaare 28-49 beziehungsweise 1492-1470, basierend auf der Numerierung der *E. coli* 16S rRNA-Sequenz; Noller, 1984, vgl. Abbildung 2), gewählt, die in den stark konservierten 5'- und 3'-Regionen der 16S rDNA-Sequenzen der meisten Eubacteria binden und die Amplifikation in nahezu voller Länge ermöglichen.

PCR-Amplifikationen der 16S rRNA-Gene von aus P22-Partikeln isolierter DNA zeigten bei der gelelektrophoretischen Überprüfung ein Produkt der erwarteten Größe

des *Salmonella*-16S rDNA-Amplifikationsproduktes von ca. 1500 bp (Abbildung 3, Spur 3).

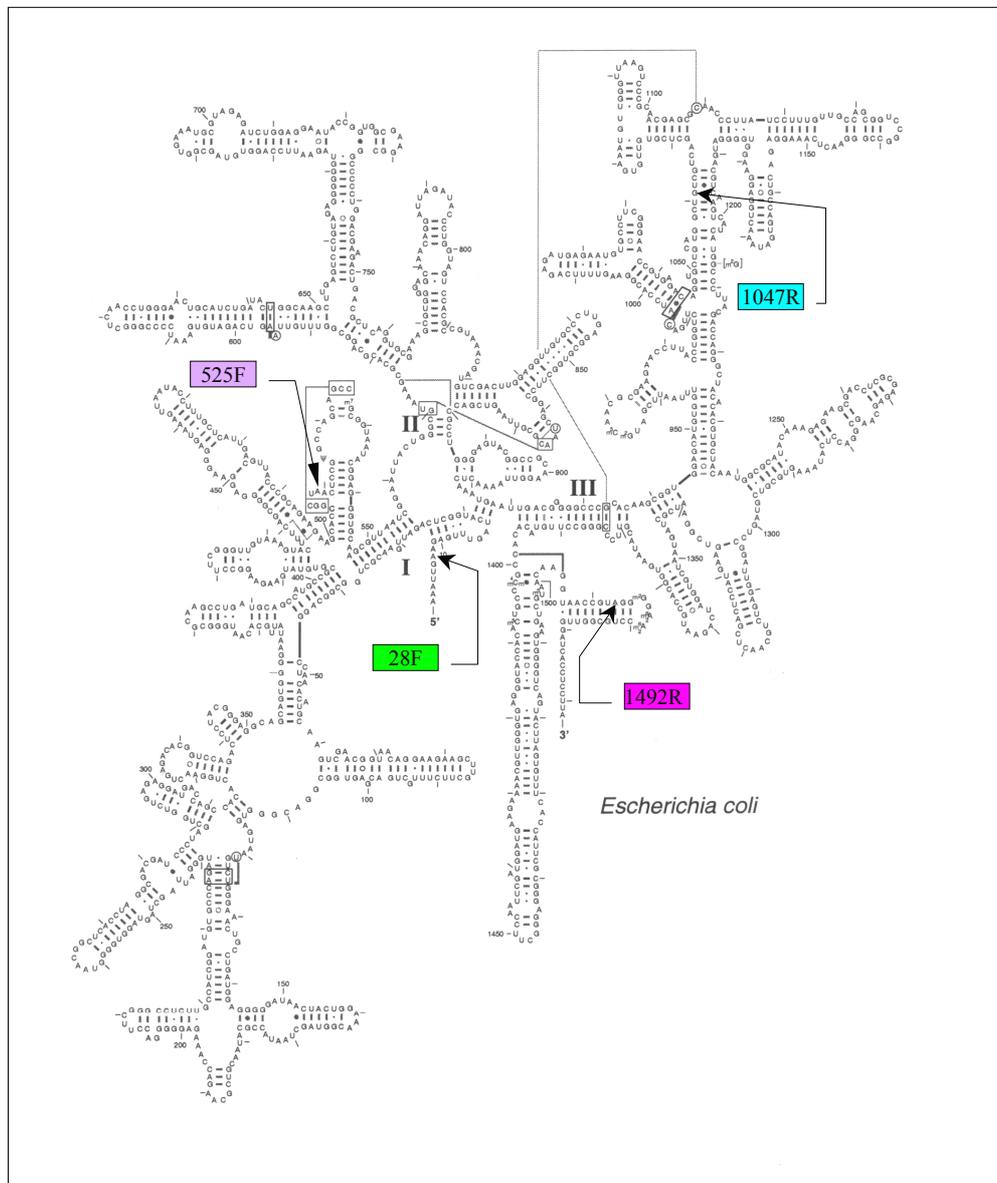


Abb. 2: Sekundärstruktur der *E. coli* 16S rRNA.

Pfeile markieren die erste Bases der Primer (5'-3'-Richtung), die zur Amplifikation der 16S rDNA (28F, 1492R) und zur Sequenzierung klonierter 16S rDNA-Sequenzen (525F, 1047R) eingesetzt wurden. F: forward; R: reverse.

5. Kontrolle des Abbaus freier DNA mittels PCR

Zur Überprüfung des Abbaus freier DNA vor dem Aufschluß der Phagenpartikel wurden zwei unabhängige, auf PCR-Amplifikation basierende Kontrollen etabliert.

1) DNA-Präparationen aus konzentrierten, mit pHpaC versetzten und DNase behandelten Lysaten der Phagen P22 und Lambda wurden als Matrize für die Amplifikation des 1,6kb-Inserts des Plasmids eingesetzt, um den Abbau freier DNA zu dokumentieren. Als PCR-Primer dienten M13 (-20) forward und M13 reverse. Mit pHpaC-DNA als Template wurde die Zusammensetzung (Magnesiumchlorid-, Primer- und Enzymkonzentration) sowie die Primeranlagerungstemperatur der PCR-Reaktion optimiert.

PCR-Reaktionen wurden mittels Gelelektrophorese überprüft und zeigten das erwartete Amplifikationsprodukt von 1,6 kb sowie zwei zusätzliche Produkte von ca. 900 bzw. 200 bp, die offenbar durch unspezifische Bindung der Primer hervorgerufen wurden, wobei die 900 bp-Bande nur bei hohen DNA-Ladungsmengen sichtbar war (Abbildung 3, Spuren 1 und 5). Um die Aussagekraft der Kontrollamplifikation zu bestimmen, wurde die Nachweisgrenze der Reaktion bestimmt. Unter optimierten Bedingungen war es möglich, Amplifikationsprodukte bei Einsatz von 60 Molekülen des Kontrollplasmids in einem PCR-Ansatz reproduzierbar in Agarosegelen nach Anfärbung mit Ethidiumbromid nachzuweisen. Eine Erhöhung der Auflösung durch *Dot Blot*-Hybridisierung der PCR-Reaktionsprodukte mit einer dem Amplifikationsprodukt komplementären digoxigeninmarkierten DNA-Sonde konnte nicht erreicht werden, so daß davon ausgegangen werden muß, daß die Nachweisgrenze im genannten Bereich liegt.

Die Kontrollamplifikation sollte später eingesetzt werden, um nicht abgebaute Plasmide in einem Gemisch mit DNA aus Phagenpartikeln nachzuweisen. Daher wurde die ermittelte Nachweisgrenze in PCR-Reaktionen unter Zusatz von 100 ng P22-DNA überprüft. Ein negativer Einfluß auf die Sensibilität der Nachweisreaktion konnte dabei nicht festgestellt werden.

2) In einer zweiten PCR-Reaktion wurden DNA-Präparationen konzentrierter DNase-behandelter Lambda-Lysate auf die Anwesenheit von 16S rDNA überprüft. Da Lambda speziell transduziert, konnten Amplifikationsprodukte nur durch Verunreinigung der Proben mit nicht abgebauter DNA des Wirtsstammes *E. coli* hervorgerufen werden. Zunächst wurde die Nachweisgrenze von 16S rDNA-Sequenzen durch PCR-Amplifikation bestimmt. Dazu wurde DNA, die nach DNase I-Behandlung aus Lysaten des generell transduzierenden Phagen P22 gewonnen wurde, als Template eingesetzt. Die Zusammensetzung (Magnesiumchlorid-, Primer- und Enzymkonzentration) und die Primeranlagerungstemperatur der PCR-Reaktion wurden optimiert. Die Aussagekraft der Kontrollreaktion wurde durch Ermittlung der minimal notwendigen Templatemenge für die Isolierung in P22-Partikel verpackter 16S rDNA verifiziert.

Amplifikationsprodukte konnten in Agarosegelen, nach Anfärbung mit Ethidiumbromid, reproduzierbar bis zu einer Untergrenze von 9 pg von aus P22-Partikeln isolierter DNA nachgewiesen werden, was einer Zahl von ca. 2×10^5 DNA-Molekülen der Größe einer P22-Verpackungseinheit entspricht. Unter Berücksichtigung abortiver Transduktionsereignisse und der Anzahl der 16S rRNA-Gene bei *Salmonella* kann davon ausgegangen werden, daß ca. einer unter 10^5 Phagenpartikeln diesen Marker verpackt hat, wodurch sich eine Nachweisgrenze von zwei Molekülen 16S rDNA ergibt.

Bedingt durch die hohe Empfindlichkeit dieses Nachweises bakterieller 16S rDNA-Sequenzen wurde im Laufe der Etablierung der Methode ein Problem offenkundig, das in Hinsicht auf Studien, die sich der PCR-Amplifikation von 16S rDNA-Sequenzen bedienen, von Bedeutung ist. In allen Lambda-DNA-Präparationen, bei denen aufgrund negativer PCR-Ergebnisse bezüglich der Amplifikation des Kontrollplasmids davon ausgegangen werden konnte, daß DNA, die nicht in Phagenköpfe verpackt war, vor dem Aufschluß der Phagenpartikel erfolgreich entfernt worden war, konnten im zweiten zur 16S rDNA-Amplifikation dienenden Kontrollansatz Produkte festgestellt werden, die in ihrer Größe mit denen erwarteter 16S rDNA-Amplifikate übereinstimmten. Wie die Sequenzierung zweier klonierter PCR-Produkte zeigte, handelte es sich bei dabei eindeutig um 16S rDNA-Sequenzen von *E. coli*, dem Wirtsorganismus von Lambda. Wie erwähnt ist Lambda als speziell transduzierender Phage nicht in der Lage diese Abschnitte des Genoms seiner propagierenden Zelle zu transduzieren. Bei den als Matrize für die PCR-Amplifikation dienenden Sequenzen mußte es sich daher entweder um Kontaminationen handeln, die der DNase-Behandlung entgangen waren, oder um Verunreinigungen von Reagenzien, die nach der DNase-Behandlung eingesetzt worden waren. Einen ersten Hinweis darauf, daß eine der PCR-Komponenten mit bakterieller DNA kontaminiert war, lieferte ein paralleler Ansatz von 20 Kontrollamplifikationen ohne Zugabe von DNA (im folgenden als Nullkontrolle bezeichnet), bei dem in sechs der Reaktionen ein ebenfalls ca. 1,5 kb großes Amplifikationsprodukt detektiert werden konnte. Eine systematische Suche nach DNA-Verunreinigungen hinsichtlich aller Materialien und Reagenzien, die bei der PCR-Reaktion zum Einsatz kamen, wies darauf hin, daß die verwendete rekombinante *Taq*-Polymerase Ursache der Kontamination war.

Insgesamt wurden acht rekombinant in *E. coli* hergestellte thermostabile DNA-Polymerasen verschiedener Hersteller überprüft. Mit jedem dieser Enzyme war es möglich, 16S rDNA-Sequenzen in Nullkontrollansätzen zu amplifizieren. Gelöst werden konnte dieses Problem letztlich durch den Einsatz einer aus *Thermus aquaticus* gewonnenen nativen *Taq*-Polymerase der Firma MBI Fermentas. Alle zur Kontrolle dienenden PCR-Reaktionen, die unter Verwendung dieses Enzyms durchgeführt wurden, waren frei von Amplifikationsprodukten (Abbildung 3, Spur 4).

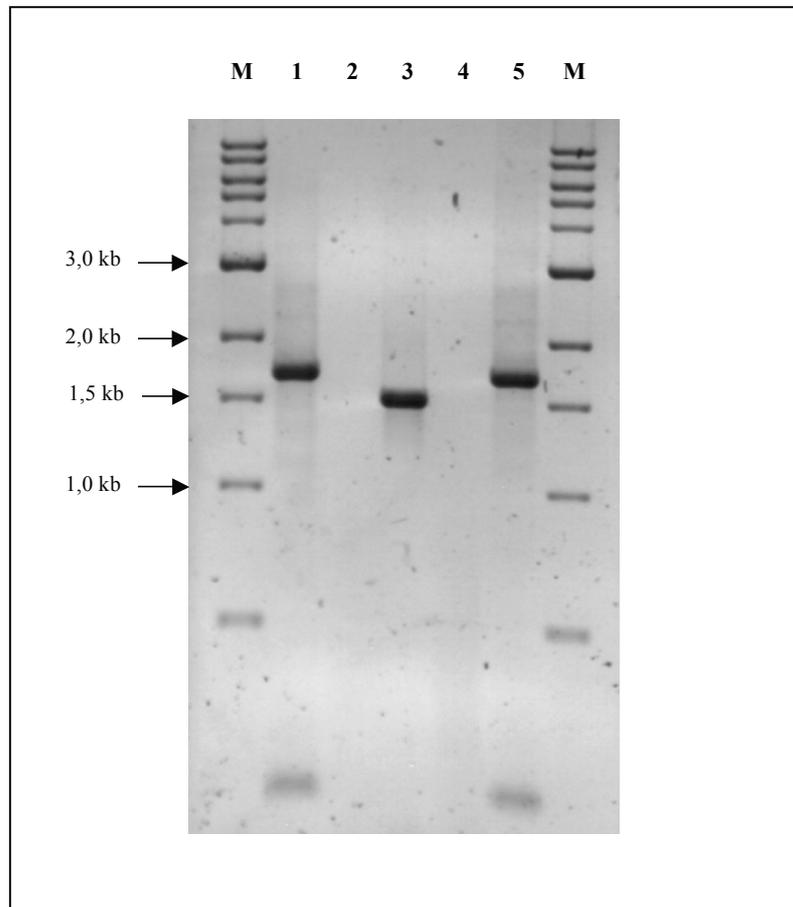


Abb. 3: Agarosegelanalyse der PCR-Amplifikationsprodukte.

16S rDNA-Amplifikationen wurden mit den Primern 28F und 1492R durchgeführt, Kontrollamplifikationen mit den Standardprimern M13 forward und M13 (-20) reverse.

Spur **M**, 1kb-Leiter; Spuren **1** und **5**, Amplifikationsprodukt des Kontrollinserts aus dem Plasmid pHpaC; Spur **2**, Test auf Anwesenheit des Kontrollinserts aus dem Plasmid pHpaC in DNA-Präparationen aus P22-Phagenpartikeln nach der Degradation freier DNA; Spur **3**, 16S rDNA-Amplifikation aus einer P22-DNA-Präparation; Spur **4**, 16S rDNA-Amplifikation aus einer Lambda-DNA-Präparation. Das 900 bp pHpaC-Amplifikationsprodukt ist in den Spuren **1** und **5** bei den aufgetragenen DNA-Mengen nicht sichtbar.

Ungeklärt blieb dabei die Frage, ob dieses Ergebnis auf die Reinheit des Enzyms zurückzuführen ist oder darauf, daß die verwendeten Primer nicht zur Amplifikation der 16S rDNA von *T. aquaticus* geeignet sind. Da die derzeit in Datenbanken verfügbare 16S rDNA-Sequenz von *T. aquaticus* nicht vollständig ist, war es nicht möglich zu überprüfen, ob dieser Organismus Sequenzabweichungen in der konservierten 5'-Region aufweist, die die effektive Anlagerung des Primers 28F verhindert. Bezüglich der Bindungsstelle für den Primer 1492R konnte eine Abweichung der *T. aquaticus*-Sequenz in zwei Basen festgestellt werden.

Das Ergebnis einer Kontrollreaktion, bei der 100 ng aus Lambda-Partikeln isolierter DNA als Template eingesetzt wurde, zeigt Abbildung 3, Spur 4. Da kein Amplifikationsprodukt sichtbar war, konnte davon ausgegangen werden, daß freie *E. coli*-DNA durch die DNase-Behandlung abgebaut worden war.

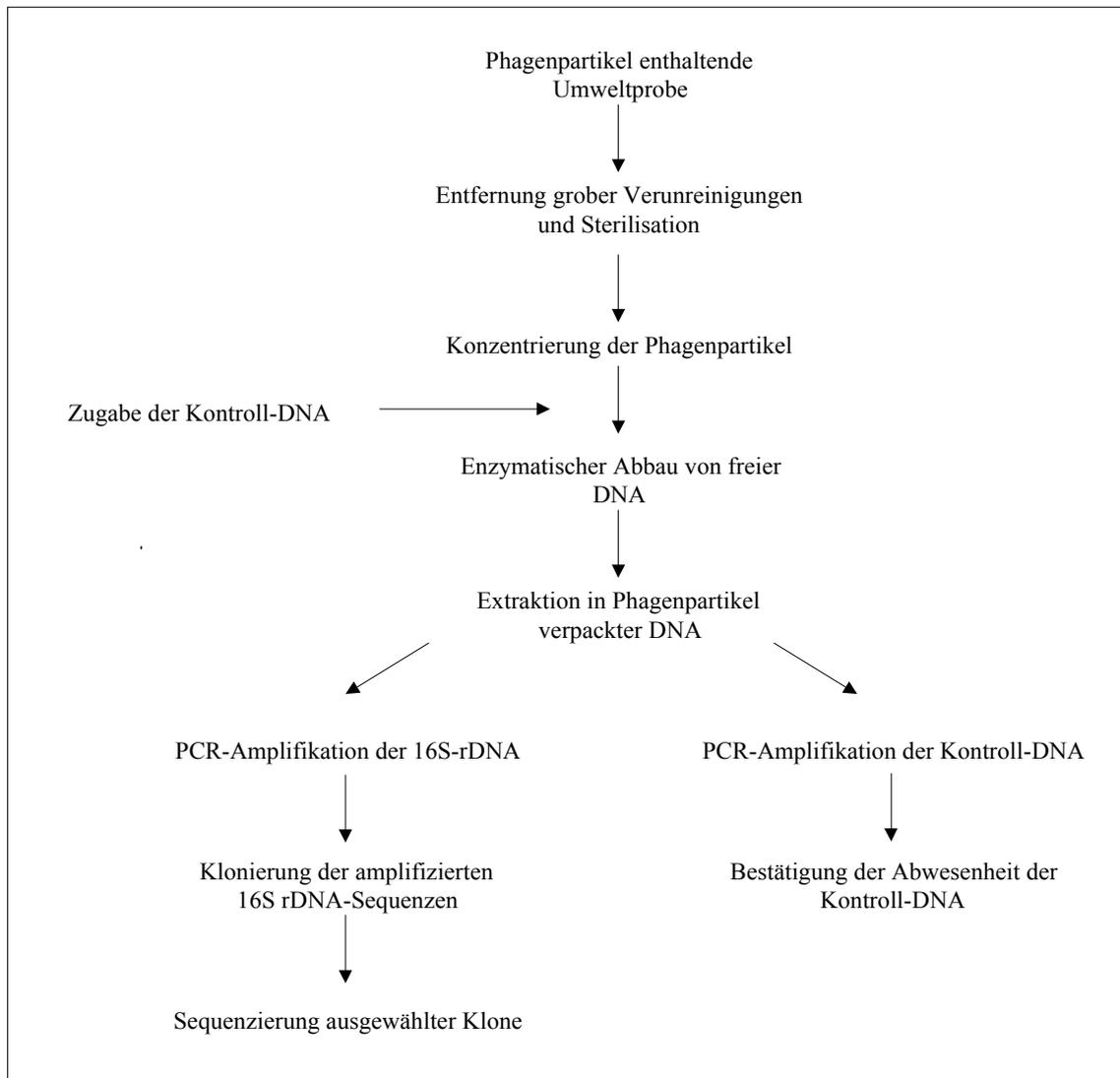


Abb. 4: Protokoll der indikatorunabhängigen Identifizierung der Wirte generell transduzierender Bakteriophagen.

6. Klonierung und Sequenzierung der 16S rDNA-Amplifikationsprodukte

PCR-Produkte wurden nach Überprüfung mittels Gelelektrophorese mit dem Vektor pCR2.1 (Invitrogen) ligiert und durch Transformation in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) amplifiziert. Plasmide ausgewählter Klone wurden isoliert und die Größe inserierter PCR-Produkte gelelektrophoretisch nach Spaltung mit *Eco*RI bestimmt.

Die Sequenzierung der Inserts erfolgte, abhängig von deren Orientierung, vom 5'- und 3'-Ende der Sequenzen mit den Primern M13 (-20) forward und M13 reverse, ausgehend von deren Anlagerungsstellen im Vektoranteil des Plasmids. Ein weiterer interner Primer, 525F, ermöglichte die Vervollständigung der Sequenzen von einer hochkonservierten Region der 16S rDNA aus (Basenpaare 515 - 533 basierend auf der Numerierung der *E. coli* 16S rRNA-Sequenz; Noller, 1984, vgl. Abbildung 2) in Richtung des 3'-Endes.

7. Retrospektive Identifizierung der Wirte generell transduzierender Phagen

Die erhaltenen überlappenden Sequenzabschnitte wurden unter Verwendung des Computerprogramms MacMolly Compare zu vollständigen Sequenzen in 5'-3'-Orientierung zusammengesetzt. Die Homologiesuche dreier aus P22-Partikeln isolierter und klonierter Sequenzen in der EMBL-Datenbank zeigte, daß es sich um 16S rDNA-Sequenzen von *S. typhimurium*, dem Wirtsorganismus von P22, handelte.

1.4. Anwendung der Methode zur Untersuchung von Umweltproben

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Methode zur Detektion generell transduzierender Partikel in natürlichen Habitaten wurden folgende Umweltproben untersucht:

- Bio I:** Abwasser eines Belebtschlammbeckens der biologischen Abwasserreinigung Stufe 1 der Kläranlage "Gut Marienhof", München
- Bio II:** Abwasser eines Belebtschlammbeckens der biologischen Abwasserreinigung Stufe 2 der Kläranlage "Gut Marienhof", München
- AW 1:** Abwasser eines Belebtschlammbeckens der biologischen Abwasserreinigung Stufe 1 des lebensmittelverarbeitenden Betriebs Aldinger GmbH u. Co KG, Pforzheim
- AW 2:** Abwasser eines Belebtschlammbeckens der biologischen Abwasserreinigung Stufe 2 des lebensmittelverarbeitenden Betriebs Aldinger GmbH u. Co KG, Pforzheim
- Heu:** Heuaufguß

1.4.1. Extraktion von in Phagenköpfen verpackter DNA aus Umweltproben und Amplifizierung der 16S rDNA

Alle Proben wurden vor der Konzentration von Phagenpartikeln durch langsame Zentrifugation (3000rpm, 30 min, Rotor SS34) von groben Verunreinigungen befreit und mittels Filtration durch bakteriendichte Filter (Porengröße 0,45 µm) sterilisiert. Zur Sterilitätskontrolle wurden 3 ml jeder Probe auf LB-Agarplatten verteilt und in Anlehnung an die Temperaturverhältnisse der Habitate, aus denen die Proben entnommen wurden, bei 30°C und 15°C für 48 Stunden bebrütet.

Phagenpartikel aus jeweils einem Liter sterilem Probenvolumen wurden durch Ultrazentrifugation (22000 rpm, 120 min, Rotor TST2838) konzentriert. Niederschläge der Ultrazentrifugation wurden in einem Volumen von 3 ml DNase-Puffer resuspendiert. Zusätzlich wurden Phagen aus einem Liter sterilfiltrierter Umweltproben Bio I und Bio II unter Einsatz von HighQ-Säulen angereichert und Säuleneluat (Volumen = 10 ml) gegen DNase-Puffer dialysiert. Zur Unterscheidung der betreffenden Konzentrate wur-

den diese Proben mit dem Zusatz uz (Anreicherung durch Ultrazentrifugation) bzw. s (Anreicherung über HighQ-Säule) gekennzeichnet.

Parallel zu jeder Umweltprobe wurden durch Ultrazentrifugation angereicherte Lysate des Phagen P22 als Positivkontrolle sowie des Phagen Lambda als Negativkontrolle aufgearbeitet. Zur Kontrolle der Effektivität der anschließenden DNase-Behandlung wurden alle Konzentrate mit dem linearisierten Plasmid pHpaC (Endkonzentration = 2 µg/ml) versetzt. Nach DNase-Behandlung aus Phagenpartikeln präparierte DNA wurde in 50 µl bidest. H₂O gelöst, zur Überprüfung der Größe gelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 5) und die DNA-Menge photometrisch bestimmt (Tabelle 1).

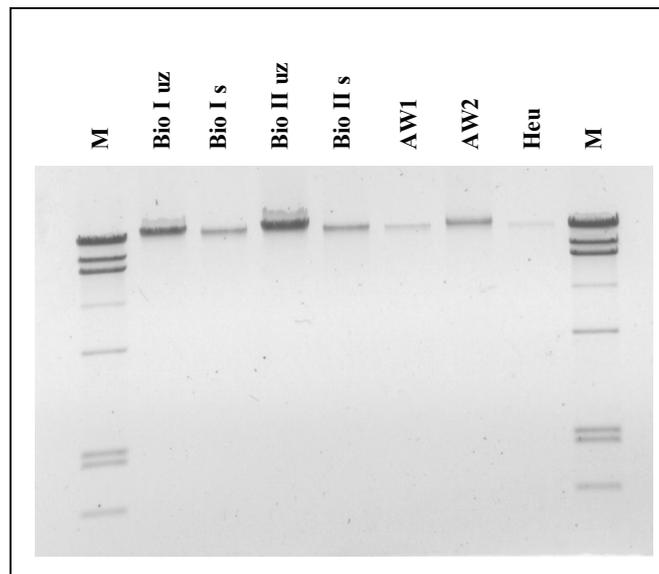


Abb. 5: Aus Phagenköpfen isolierte DNA aus Umweltproben. Aufgetragen wurden je 5µl DNA-Lösung. Als DNA-Größenstandard (M) diente *EcoRI*-gespaltene DNA des Phagen P22.

Umweltprobe	BioIuz	BioIs	BioIIuz	BioIIIs	AW 1	AW 2	Heu
Gesamtmenge isolierter DNA	6,5 µg	4,7 µg	8,3 µg	5,5 µg	4,2 µg	7,9 µg	3,4 µg

Tab. 1: Gesamtmenge aus einem Liter Probevolumen isolierter, in Phagenpartikeln verpackter DNA aus konzentrierten Umweltproben.

Alle Kontrollreaktionen zeigten die erwarteten Ergebnisse:

- 1) 16S rDNA konnte durch PCR-Amplifikation aus Präparationen in P22-Partikeln, nicht jedoch aus in Lambda-Partikeln verpackter DNA isoliert werden.
- 2) Alle DNA-Präparationen waren frei von durch PCR-Amplifikation nachweisbaren Verunreinigungen des Plasmids pHpaC.

16S rDNA wurde unter Einsatz von 100 ng aus Phagenpartikeln isolierter DNA durch PCR amplifiziert, mit dem Vektor pCR2.1 (Invitrogen) ligiert und in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) transformiert. Je Umweltprobe wurden Plasmide aus 50 Klonen isoliert. Klone wurden nach der jeweiligen Umweltprobe benannt und in der Reihenfolge ihrer Isolierung numeriert. Plasmide wurden mit dem Präfix p gekennzeichnet. Die Größe der inserierten Sequenzen wurde nach Restriktionsspaltung mit *Eco*RI auf Agarosegelen überprüft. Alle Plasmide wiesen Inserts der erwarteten Größe von ca. 1500 bp auf (Daten nicht gezeigt).

1.4.2. Sequenzierung klonierter 16S rDNA und Ausschluß chimärer Sequenzen

Wie aus Studien von Wang und Wang (1996) bekannt war, kommt es bei der Co-Amplifikation verschiedener 16S rDNAs zur Bildung chimärer Sequenzen während der PCR-Reaktion, insbesondere dann, wenn verschiedene Sequenzen in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Dies stellt ein besonderes Problem bei Einsatz von DNA-Matrizen dar, die aus Umweltproben gewonnen werden und deren Zusammensetzung hinsichtlich dieser Sequenzen nicht bekannt ist.

Für jede konzentrierte Probe wurden die 5'- und 3'-Enden klonierter 16S rDNA-Sequenzen von 20 Plasmiden sequenziert. Zur Identifizierung chimärer Sequenzen wurde für 500 bp lange Teilstücke der 5'- und 3'-Enden jeder Klonsequenz eine Homologiesuche in der EMBL-Datenbank durchgeführt.

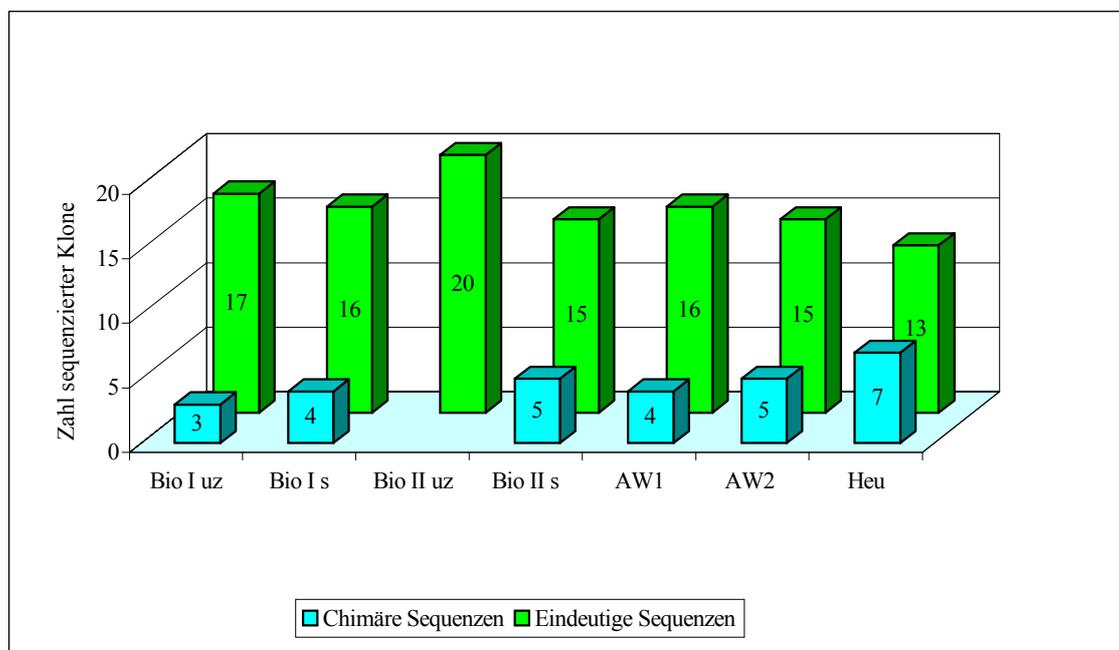


Abb. 6: Eindeutige 16S rDNA-Klone und Klone mit chimären 16S rDNA-Sequenzen der klonierten PCR-Produkte aus DNA-Extraktionen von in Phagenpartikel verpackter DNA verschiedener Umweltproben.

Sequenzen wurden dann als chimär eingestuft, wenn die 5'- und 3'-Teilbereiche einer Sequenz durch die Homologiesuche eindeutig 16S rDNA-Sequenzen verschiedener Organismen zugeordnet werden konnten. Von insgesamt 140 klonierten 16S rDNA-Sequenzen wurden 28 als Chimäre identifiziert, was einem Anteil von 20% entspricht. Für die jeweiligen Proben ergaben sich dabei unterschiedliche Anteile an chimären Sequenzen, deren Verteilung in Abbildung 6 dargestellt ist. 112 klonierte 16S rDNA-Sequenzen konnten eindeutig einer Bakteriengattung oder -art zugeordnet werden und wurden vollständig sequenziert.

1.4.3. Wirte generell transduzierender Bakteriophagen

Zur Identifizierung der Wirte generell transduzierender Bakteriophagen wurden nur die Klonsequenzen eingesetzt, die als nichtchimär eingeordnet worden waren. Mit den vollständig sequenzierten 16S rDNA-Inserts wurde eine Homologiesuche in der EMBL-Datenbank durchgeführt. Zur Bestimmung des Grades an Homologie wurden die ermittelten Sequenzen aus der Datenbank entnommen und unter Verwendung des Computerprogramms MacMolly Compare einem Vergleich mit den zugeordneten, aus Umweltproben isolierten Sequenzen unterzogen. Durch den direkten Sequenzvergleich konnten die Ergebnisse des Chimärentests (vgl. 1.4.2.) bestätigt und die prozentuale Übereinstimmung der klonierten Amplifikationsprodukte mit den jeweiligen Datenbanksequenzen ermittelt werden.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der retrospektiven Identifizierung der Wirte generell transduzierender Bakteriophagen aus den Umweltproben sowie die ermittelten Sequenzübereinstimmungen. Für Fälle, in denen mehr als zwei Klonsequenzen einem Wirtsorganismus zugeordnet werden konnten, wurde der Bereich der ermittelten Homologie angegeben.

Umweltprobe	identifizierter Wirtsorganismus	Anzahl der Klone	Homologie zur Sequenz der Datenbank in %
Bio I uz	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2	99,8
	<i>Acinetobacter</i> sp.	1	97,0
	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	1	99,1
	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20	4	99,1 - 99,6
	<i>Aeromonas media</i>	3	99,6 - 99,8

Umweltprobe	identifizierter Wirtsorganismus	Anzahl der Klone	Homologie zur Sequenz der Datenbank in %
Bio I uz	<i>Aeromonas veronii</i> Stamm B1	1	98,2
	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	4	97,0 - 99,4
	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	97,3
Bio I s	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20	2	99,0; 99,6
	<i>Haemophilus piscium</i>	4	99,8
	<i>Leminorella grimontii</i>	1	94,1
	<i>Pseudomonas</i> sp.	3	99,1
	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06	4	99,5
	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1	94,4
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	99,8
Bio II uz	<i>Polynucleobacter necessarius</i>	20	96,7 - 98,9
Bio II s	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1	99,5
	<i>Dehalospirillum multivorans</i>	1	97,3
	<i>Herbaspirillum</i> sp.	1	97,0
	<i>Polynucleobacter necessarius</i>	10	98,4- 98,9
	<i>Pseudomonas veronii</i>	2	98,4 - 98,9
AW 1	<i>Aeromonas hydrophilia</i> (ATCC 35654)	1	93,0
	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20	6	99,7 - 99,8
	Bakterium der CDC Gruppe IVc-2 str. JHH 1448	1	99,3

Umweltprobe	identifizierter Wirtsorganismus	Anzahl der Klone	Homologie zur Sequenz der Datenbank in %
AW 1	<i>Flavobacterium balustionum</i>	1	99,3
	Gamma Proteobacterium HTB019	3	96,7 - 97,1
	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	1	97,4
	<i>Ralstonia thomasi</i>	1	99,9
	<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	2	99,7
AW 2	<i>Acinetobacter</i> sp. Hop10	4	98,9
	<i>Campylobacter</i> sp.	1	98,8
	<i>Dehalospirillum multivorans</i>	3	97,1 - 98,6
	<i>Pseudomonas veronii</i>	7	99,6
Heu	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	4	99,1
	<i>Pseudomonas synxantha</i>	2	99,9
	<i>Pseudomonas veronii</i> Stamm INA06	7	99,5

Tab. 2: Wirte generell transduzierender Bakteriophagen aus Umweltproben.

Dargestellt sind die durch Homologiesuche in der EMBL-Datenbank identifizierten Wirtsorganismen generell transduzierender Bakteriophagen, die Anzahl der einem bestimmten Wirtsorganismus zugeordneten Sequenzen in den untersuchten Umweltproben sowie der Grad an Sequenzübereinstimmung zwischen den isolierten und den zugeordneten 16S rDNA-Sequenzen in Prozent.

1.4.4. Spektrum identifizierter Sequenztypen

Tabelle 3 zeigt das Spektrum identifizierter Wirtsorganismen sowie deren Verteilung bezüglich der einzelnen Umweltproben. Die isolierten 16S rDNA-Sequenzen wurden dazu mit Bezug auf die identifizierten Wirtsorganismen (im Folgenden als Sequenztypen bezeichnet) in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe I: 16S rDNA-Sequenzen, die nur einmal aus allen Umweltproben isoliert wurden.

Gruppe II: 16S rDNA-Sequenzen, die mehrmals aus einer Umweltprobe isoliert wurden.

Gruppe III: 16S rDNA-Sequenzen, die mehrmals aus verschiedenen Umweltproben isoliert wurden.

Für die Proben Bio I und Bio II wurden die Ergebnisse ohne Berücksichtigung der Methode zur Anreicherung von Phagenpartikeln zusammengefaßt.

Gruppe	Sequenztyp (identifizierter Wirtsorganismus)	Umweltprobe	Anzahl der Isolate des Sequenztyps in der Umweltprobe
I	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Bio I	1
	<i>Aeromonas hydrophilia</i> (ATCC 35654)	AW 1	1
	<i>Aeromonas veronii</i> Stamm B1	Bio I	1
	Bakterium der CDC Gruppe IVc-2 str. JHH 1448	AW 1	1
	<i>Campylobacter</i> sp.	AW 2	1
	<i>Flavobacterium balustinum</i>	AW 1	1

Gruppe	Sequenztyp (identifizierter Wirtsorganismus)	Umweltprobe	Anzahl der Isolate des Sequenztyps in der Umweltprobe
I	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	AW 1	1
	<i>Herbaspirillum</i> sp.	Bio II	1
	<i>Leminorella grimontii</i>	Bio I	1
	<i>Ralstonia thomasi</i> Stamm RAL13	AW 1	1
	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Bio I	1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bio I	1
II	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Heu	4
	<i>Aeromonas media</i>	Bio I	3
	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	Bio I	4
	Gamma Proteobacterium HTB019	AW 1	3
	<i>Haemophilus piscium</i>	Bio I	4
	<i>Polynucleobacter necessarius</i>	Bio II	30
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Bio I	4
	<i>Pseudomonas synxantha</i>	Heu	2
	<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	AW 1	2
III	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Bio I	2
	<i>Acinetobacter</i> sp. Hop10	Bio II	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. Hop10	Bio I	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. Hop10	AW 2	4
	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20	Bio I	6
<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20	AW 1	6	
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	Bio II	1	
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	AW 2	3	

Gruppe	Sequenztyp (identifizierter Wirtsorganismus)	Umweltprobe	Anzahl der Isolate des Sequenztyps in der Umweltprobe
III	<i>Pseudomonas veronii</i>	Bio I	4
		Bio II	2
		AW 2	7
		Heu	7

Tab. 3: Häufigkeit und Verteilung identifizierter Wirtsorganismen (Sequenztypen) generell transduzierender Bakteriophagen aus den Umweltproben Bio I, Bio II, AW 1, AW 2 und Heu.

Insgesamt konnten 26 verschiedene Sequenztypen identifiziert werden, von denen 12 einmal bzw. 9 mehrfach aus einer Umweltprobe sowie 5 mehrfach aus verschiedenen Umweltproben isoliert wurden. Bei allen identifizierten Wirtsorganismen handelt es sich um Gram-negative Bakterien. Das Spektrum der ermittelten Sequenztypen umfaßte Vertreter aus der Gruppe der Proteobakterien (Untergruppen alpha, beta, gamma und epsilon) sowie einen Vertreter der Gruppe der Flavobakterien.

1.5. Der Sonderfall Moor

Zur Isolierung in Phagenpartikel verpackter DNA wurde eine Probe Quellwasser aus dem Sippenauer Moor (Regensburg) entnommen. In der Probe enthaltene filamentös wachsende Konsortien von Mikroorganismen wurden durch kräftiges Rühren zerkleinert und zusammen mit anderen Verunreinigungen durch langsame Zentrifugation (3000 rpm, 30 min, Rotor SS34) abgetrennt. Die Probe wurde mittels Filtration durch bakteriendichte Filter (Porengröße 0,45 µm) sterilisiert. Zur Sterilitätskontrolle wurden 3 ml der Probe auf einer LB-Agarplatte verteilt und für 96 Stunden inkubiert. In Anlehnung an die Temperaturverhältnisse des Habitats wurde eine Inkubationstemperatur von 10°C gewählt. Phagenpartikel wurden durch Ultrazentrifugation angereichert. Die Präparation der DNA aus Phagenpartikeln erfolgte analog zu denen der anderen Umweltproben (vgl. 1.4.). Die Ausbeute aus Phagenpartikeln isolierter DNA aus einem Liter Probevolumen betrug 1,5 µg. Die Freiheit der DNA-Probe von Verunreinigungen durch Reste bakterieller DNA wurde durch die üblichen Kontrollamplifikationen gezeigt.

16S rDNA wurde unter Einsatz von 100 ng aus Phagenpartikeln isolierter DNA durch PCR amplifiziert, mit dem Vektor pCR2.1 (Invitrogen) ligiert und in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) transformiert. Plasmide aus 50 Klonen wurden isoliert und zeigten nach Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und Analyse auf Agarosegelen inserierte Sequenzen der erwarteten Größe von ca. 1500 bp (Daten nicht gezeigt). Die Klone wurden mit "Moor"

bezeichnet und in der Reihenfolge ihrer Isolierung numeriert. Plasmide wurden mit dem Präfix p gekennzeichnet.

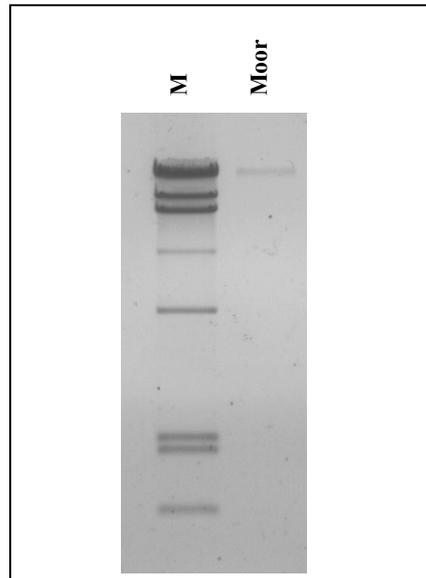


Abb. 7: Präparation in Phagenpartikel verpackter DNA aus Quellwasser des Sippenauer Moors (Regensburg). Aufgetragen wurden 15 μ l der DNA-Präparation. Als DNA-Größenstandard (M) diente *Eco*RI-gespaltene DNA des Phagen P22.

In ersten Sequenzreaktionen mit den Primern M13 (-20) universal und M13 reverse konnten jedoch nur geringe Leseweiten von maximal 400 bp erreicht werden. Zur vollständigen Sequenzierung inserierter Sequenzen wurde daher neben dem Primer 525F ein weiterer interner Primer 1047R (Basenpaare 1047 - 1061 basierend auf der Nummerierung der *E. coli* 16S rRNA-Sequenz; Noller, 1984) eingesetzt, der die Sequenzierung der 16S rDNA ausgehen von einer hochkonservierten Region in 5'-Richtung ermöglichte (vgl. Abbildung 2). Die inserierten Sequenzen von acht Klonen wurden vollständig sequenziert.

Die Überprüfung hinsichtlich chimärer Amplifikationsprodukte mit 500 bp lange Teilstücke der 5'- und 3'-Enden jeder Klonsequenz in der EMBL-Datenbank wies zunächst darauf hin, daß es sich bei allen Sequenzen um Chimäre handelte. Trotz dieses Ergebnisses wurden mit allen vollständig sequenzierten klonierten 16S rDNA-Sequenzen eine Homologiesuche in der Datenbank durchgeführt. Alle Datenbanksequenzen mit den größten Homologien stammten von bisher nichtkultivierbaren bzw. nicht identifizierten Bakterien (Tabelle 4). Für zwei Klone zeigte sich, daß Sequenzen der Datenbank, die die größte Übereinstimmung aufwiesen, lediglich eine Gesamtlänge von 759 bzw. 968 bp umfaßten. Bei den nicht verfügbaren Sequenzinformationen handelt es sich jeweils um die 5'-Bereiche der 16S rDNA. Insgesamt wurden sieben Sequenztypen identifiziert.

Im Vergleich zu den aus den anderen Umweltproben amplifizierten Sequenzen wiesen diese mit Werten zwischen 77,5 und 90,9 wesentlich geringere prozentuale Übereinstimmungen mit den zugeordneten Sequenzen der Datenbank auf. Es ist anzunehmen, daß die Ergebnisse der Überprüfung auf chimäre Sequenzen, sowie die insgesamt geringe Übereinstimmung zu Sequenzen der Datenbank darauf zurückzuführen sind, daß Sequenzen der eigentlichen Wirtsorganismen oder naher Verwandter nicht in der Datenbank enthalten sind.

Eine eindeutige retrospektive Identifizierung der Wirte der Phagen, denen diese 16S rDNA-Sequenzen entstammen, war unter diesen Voraussetzungen nicht möglich. Unter Berücksichtigung der Charakteristika der Habitate der ermittelten Wirtsorganismen können die gewonnenen Sequenzdaten jedoch als Anhaltspunkt für die Verbreitung generell transduzierender Phagen bewertet werden (vgl. Diskussion Punkt 2.5.).

Organismus	Homologie der klonierten Sequenz zur Sequenz der Datenbank in %
nicht identifiziertes Bakterium B7-1	77,5
nicht identifiziertes Pansenbakterium RF39	88,4
nicht identifiziertes Pansenbakterium RF8	87,6
nicht kultiviertes Bakterium BOL-130 (968 bp)	90,9
nicht kultiviertes epsilon Proteobakterium 1040	82,3
nicht kultiviertes epsilon Proteobakterium Stamm BD4-8	79,8
nicht kultiviertes grünes Nicht-Schwefelbakterium (759 bp)	89,1

Tab. 4: Ergebnisse der Homologiesuche aus Phagenpartikeln isolierter 16S rDNA-Sequenzen in der EMBL-Datenbank. Aufgelistet sind die Organismen, die in der Homologiesuche die größte Übereinstimmung mit den isolierten 16S rDNA-Sequenzen aufwiesen, sowie der Grad an Sequenzübereinstimmung zwischen den isolierten Sequenzen und den 16S rDNA-Sequenzen mit der größten Homologie in Prozent.

1.6. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß die entwickelte Methode es ermöglicht, allgemein transduzierende Phagenpartikel ohne Isolierung und Vermehrung der Phagen und damit ohne Indikatoren sowie ohne Spender- und Empfängerstämme nachzuweisen. Erste Anwendungen dieser Nachweistechnik lieferten interessante Informationen über das Vorkommen transduzierender Bakteriophagen in natürlichen Habitaten. Insgesamt konnten 26 verschiedene Wirte eindeutig identifiziert werden. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß bei keinem dieser Wirtsorganismen bisher transduzierende Phagen beschrieben sind. In einer weiteren Anwendung mit Quellwasser aus einem Moor war eine eindeutige Identifizierung der Wirtsorganismen zwar nicht möglich, die erhaltenen Sequenzdaten belegen jedoch einerseits das Vorkommen generell transduzierender Phagen in diesem Habitat, andererseits die Eignung der Nachweis-

technik zur Untersuchung von Transduktionsereignissen bei nicht kultivierbarer Bakterien. Es konnte gezeigt werden, daß die Methode des indikatorunabhängigen Nachweises transduzierender Phagen geeignet ist, um neue Informationen über den Austausch von genetischem Material zwischen Bakterien durch Transduktion zu erhalten.

2. Charakterisierung der *Salmonella*-Phagen 7D, PS79 und A12

Die in den letzten Jahrzehnten erworbenen Erkenntnisse über die Mechanismen der Konjugation und Transformation fanden nicht zuletzt ihren Niederschlag bei der Konstruktion von Sicherheitsstämmen und Sicherheitsvektoren. Daß genetische Information auch durch Transduktion übertragen werden kann, wurde dagegen bei der Sicherheitsforschung bisher in keinster Weise berücksichtigt. Ein Ansatz, die Transduktion von Plasmiden zu unterbinden, könnte darin liegen, die Verpackung von Vektoren in Phagenköpfe zu verhindern. Für die erfolgreiche Verpackung jeglicher DNA in einen Phagenpartikel ist das DNA-Erkennungssignal für die Terminase, die *pac site*, unabdingbar. Es stellt sich daher die Frage, ob Phagen einer Bakteriengruppe Terminasen mit gleicher oder ähnlicher *pac site*-Erkennungsspezifität besitzen und damit Sicherheitsvektoren für diese Bakterienspezies oder -gattung dadurch konstruiert werden könnten, daß *pac*-ähnliche Sequenzen eliminiert werden. Durch Untersuchungen, die sich mit dem Vorkommen lysogener Stämme bei Naturisolaten der Gattung *Salmonella* befaßten (Schicklmaier und Schmieger, 1995), sowie durch die zur Phagentypisierung weltweit eingesetzte Anderson-Sammlung von *Salmonella*-Phagen stand eine umfassende Laborkollektion bisher nicht charakterisierter Bakterienviren zur Verfügung. Um neue Informationen über die Vielfalt der Phagen von *Salmonella* zu erhalten, wurden drei Vertreter der Laborsammlung, 7D, PS79 und A12, mikrobiologisch und molekularbiologisch untersucht. Maßgebliches Auswahlkriterium war dabei die in Vorversuchen durch DNA-Hybridisierungsexperimente gezeigte Nichtverwandtschaft dieser Bakteriophagen mit dem derzeit wohl bestuntersuchten *Salmonella*-Phagen P22 sowie mit anderen prominenten Bakterienviren (vgl. dazu 2.1.). Obwohl sich diese Studien ausschließlich mit der Situation bei *Salmonella* und ihren Phagen beschäftigten, darf angenommen werden, daß die gewonnenen Erkenntnisse als exemplarisch, zumindest auch für die gentechnisch weitaus bedeutendere Spezies *Escherichia coli*, gewertet werden können. (Für *S. enterica* serov. *typhimurium* wird im folgenden die Bezeichnung *S. typhimurium* verwendet.)

2.1. Verwandtschaft der Phagen mit anderen prominenten Bakteriophagen und untereinander

Um zu überprüfen, ob die Phagen 7D, PS79 und A12 Verwandtschaft zu bereits charakterisierten prominenten Vertretern der allgemein transduzierenden Bakterienviren oder untereinander aufweisen, wurden *Southern Blot*-Experimente durchgeführt. Als prominente Testphagen dienten zwei Vertreter der Lambdoiden, P22 und Lambda, sowie die Coliphagen P1 und Mu.

Gesamt-DNA der Phagen wurde mit *EcoRI* gespalten, gelelektrophoretisch getrennt und auf Nylonmembranen übertragen. Als Hybridisierungssonden wurde *EcoRI*-gespaltene, mit Digoxigenin markierte Gesamt-Phagen-DNA eingesetzt. Die durchgeführten Hybridisierungsexperimente und deren Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

<i>EcoRI</i> - Restriktionsmuster der DNA des Phagen	Hybridisierungssignal mit der DNA-Sonde des Phagen						
	λ	P22	P1	Mu	7D	PS79	A12
7D	-	-	-	-	+	-	-
PS79	-	2400 bp- Fragment	-	-	-	+	-
A12	-	-	-	-	-	-	+

Tab. 5: Ergebnisse der *Southern Blot*-Hybridisierung *EcoRI*-gepaltener Phagen-DNA mit Gesamt-Phagen-DNA-Sonden. +: Hybridisierungssignal mit allen DNA-Fragmenten, -: kein Hybridisierungssignal.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß die Phagen 7D, PS79 und A12 auf DNA-Ebene keine Homologien und damit keine Verwandtschaft zu einem der anderen prominenten Phagen und auch nicht untereinander aufweisen.

Das mit der P22-Sonde hybridisierende ca. 2400 bp große DNA-Fragment der PS79-*EcoRI*-Spaltung konnte keiner identifizierbaren Bande im Restriktionsmuster des Phagen zugeordnet werden. Die Gegenprobe mittels *Southern Blot* der *EcoRI*-Spaltfragmente von P22 und Hybridisierung mit einer PS79-Sonde zeigte ein Signal mit der 1100 bp großen F-Bande von P22, einem Genomabschnitt des Phagen, der keine essentiellen Gene trägt (vgl. Abbildung 8). Eine phylogenetische Beziehung zwischen P22 und PS79 konnte aufgrund dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die Ursache für die detektierten Hybridisierungssignale ist nicht bekannt. Bei P22 und PS79 handelt es sich um generell transduzierende Bakteriophagen (vgl. dazu 2.5.). DNA-Präparationen dieser Bakterienviren enthalten daher neben der Phagen-DNA genomische DNA der phagenpropagierenden Wirtszellen. Die detektierten Hybridisierungssignale könnten somit durch bakterielle Sequenzen oder kryptische Prophagen-DNA verursacht werden, die von einem der beiden Phagen häufig transduziert werden und Homologien zum Genom des jeweils anderen Phagen aufweisen. Möglich wäre auch, daß die detektierten Signale durch homologe dominante DNA-Fragmente der Wirtszelle, die beide Phagen häufig transduzieren, hervorgerufen werden.

Die Phagen 7D, PS79 und A12 zeigten zudem auf DNA-Ebene keine Homologien untereinander. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Phagen als Vertreter dreier bisher unbekannter Phagenfamilien eingestuft und im folgenden genauer charakterisiert.

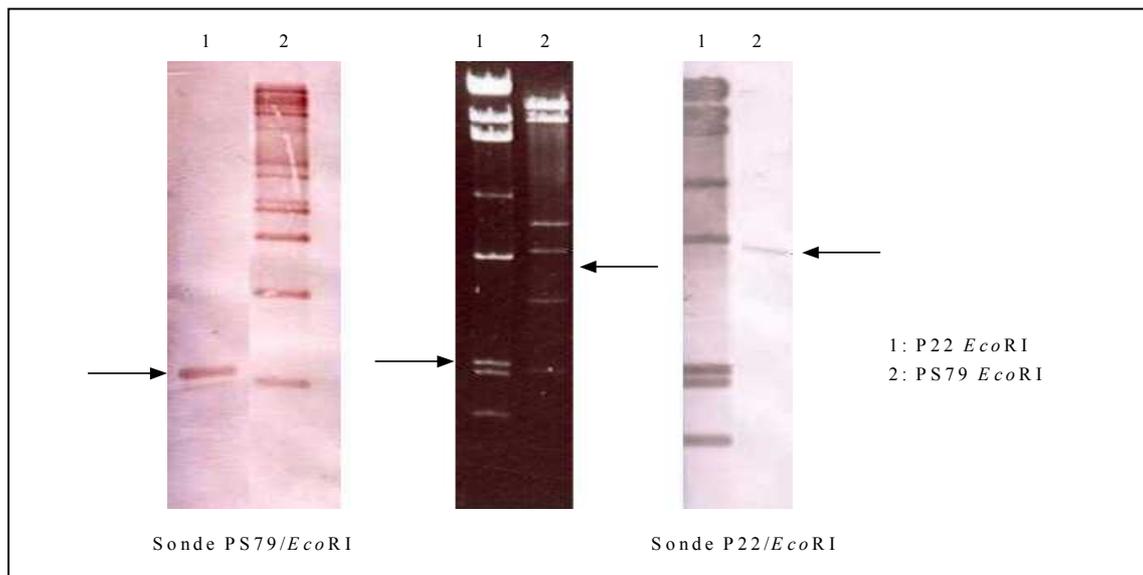


Abb. 8: Hybridisierungsmuster homologer DNA-Fragmente in DNA-Präparationen der Phagen PS79 und P22. Gezeigt ist das Ergebnis der Hybridisierung *EcoRI*-gespaltener DNA der Phagen PS79 und P22 mit digoxigeninmarkierter Gesamt-Phagen-DNA.

2.2. Plaquemorphologie

Bei der Plattierung eines Gemischs von Indikatorbakterien und Phagen in einer Weichagardeckschicht bilden nichtinfizierte Zellen auf der Platte einen geschlossenen Wachstumsrasen, während infizierte Zellen nach kurzer Zeit lysieren und dabei Phagennachkommen freisetzen, die ihrerseits wiederum benachbarte Bakterienzellen infizieren. Dieser Zyklus von Phageninfektion und Phagenfreisetzung endet, wenn die zu Mikrokolonien herangewachsenen Indikatorbakterien aufgrund von Nährstoffmangel oder gegenseitiger Hemmung ihr Wachstum einstellen. Bei geeignetem Mischungsverhältnis von Indikatorzellen und Phagen wird das Resultat der Vermehrung jedes einzelnen Phagen als ringförmiges, aufgeklartes Areal auf der konfluent bewachsenen Agarplatte sichtbar, das als Plaque bezeichnet wird. Während Plaques, die von virulenten Phagen gebildet werden, klar sind, da alle infizierten Bakterien lysiert werden, bilden temperente Phagen Plaques, die aufgrund des Wachstums lysogener immuner Bakterien trüb erscheinen. Je nach Phagentyp, Wirtsorganismus und physiologischen Bedingungen zeigen Plaques für einen Phagen typische Charakteristika in Größe und Aussehen. Zur Bestimmung der Plaquemorphologie wurden geeignete Verdünnungen der Phagenlysate von 7D, PS79 und A12 mit phagensensiblen Bakterienstämmen gemischt, in einer Weichagardeckschicht auf LB-Agarplatten plattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Phage	Indikatorstamm	Plaquedurchmesser	Plaquetyp	Vermehrungstyp
7D	DB21	1 mm	trüb	temperent
PS79	LB5000	> 1 mm	trüb	temperent
A12	DB21	1,5 mm	klar	virulent

Tab. 6: Plaquemorphologie der Phagen PS79, P7 und A12 auf zur Vermehrung geeigneten Indikatoren.

Während die Phagen 7D und PS79 trübe Lyseareale aufwiesen und daher dem temperenten Vermehrungstyp zuzuordnen sind, bildet A12 klare Plaques und stellt damit einen Vertreter der virulenten Phagen dar. Alle drei Phagen zeigten Plaques mit scharfen Rändern. Die Durchmesser der Lyseareale können, etwa im Vergleich zu denen des Phagen P22 (Durchmesser ca. 5 mm), als sehr klein bezeichnet werden.

2.3. Untersuchungen zur Kinetik der Phagenvermehrung

Die geringe Größe der Plaques von 7D, PS79 und A12 konnte verschiedene Ursachen haben. Wie in einer Studie von Elford und Andrewes (1932) gezeigt wurde, bilden Phagen mit kleiner Partikelgröße in festen Wachstumsmedien größere Lyseareale als Phagen mit großen Viruspartikeln. Dieser Befund wurde auf eine schnellere Diffusion und die daraus resultierende weitere Verbreitung kleiner Phagenpartikel in der begrenzten zur Plaquebildung verfügbaren Zeit zurückgeführt. Kleine Plaques können jedoch auch dadurch hervorgerufen werden, daß Phagen auf den zur Verfügung stehenden Indikatoren in der durch die physiologische Aktivität der Bakterienzellen begrenzten Zeit nur eine geringe Zahl von Nachkommen produzieren. Eine lange Latenzperiode (Zeitspanne zwischen Infektion und Freisetzung der Nachkommen) oder eine geringe Wurfgröße (Anzahl freigesetzter Phagen pro infizierter Zelle) der Phagen kamen damit ebenso als Ursache für den Befund der Plaquemorphologie in Betracht. Untersuchungen zur Kinetik der Phagenvermehrung erschienen daher, insbesondere im Hinblick auf die Optimierung der experimentellen Bedingungen zum Test der Transduktionsfähigkeit dieser Bakteriophagen (vgl. 2.5.), notwendig.

Um Informationen über die Vermehrungszyklen der Phagen zu erhalten, wurde das Wachstum infizierter Indikatorkulturen sowie die zeitliche Änderung der Phagenkonzentrationen während der Infektion bestimmt. Indikatorkulturen wurden zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase geteilt und je eine Hälfte der Kultur mit vier bis acht Phagen pro Bakterienzelle infiziert. Während der Infektion wurde das Bakterienwachstum durch Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen bei 580 nm sowie die Zahl freier Phagen durch Bestimmung des Phagentiters ermittelt. Die Abbildungen 9a - 9c zeigen je ein typisches Ergebnis der getesteten Phagen-Wirts-Kombinationen.

Aus den erhobenen Daten konnten folgende Charakteristika der Phagen-Wirts-Kombinationen abgeleitet werden:

Über 99% der Phagen vom Typ 7D adsorbierten innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe an die Wirtszellen des Stamms DB21. Nach der Infektion kam es zu einer deutlichen Verzögerung des bakteriellen Wachstums der infizierten Kultur im Vergleich zur Kontrollkultur. Dies wies auf eine drastische Veränderung der Syntheseleistungen infizierter Zellen hin. 60 Minuten nach Zugabe der Phagen waren erste Anzeichen für eine Abnahme der Zellzahl der infizierten Kultur durch Lyse festzustellen. Zeitgleich stieg der Phagentiter durch die Freisetzung der neuen Phagengeneration an. Trotz der insgesamt geringen Abnahme der optischen Dichte der infizierten Kultur lag der Phagentiter 200 Minuten nach der Infektion um den Faktor 76 höher als der Infektionstiter. Dieses Ergebnis zeigte, daß zwar nur wenige Zellen lysiert, aus diesen jedoch eine große Anzahl neuer Phagen freigesetzt wurden (Abbildung 9a).

Wie Experimente zur Wirtsspezifität zeigten, stand für die Vermehrung des Phagen PS79 nur der *S. typhimurium*-Stamm LB5000 zur Verfügung (vgl. dazu 2.6.). Der Phage zeigte jedoch nur eine geringe Affinität zu den Indikatorzellen. Erst nach 80 Minuten hatten etwa 96% der zugegebenen Phagen adsorbiert. Eine geringe Wachstumsverzögerung der infizierten Kultur konnte 60 Minuten nach Phagenzugabe festgestellt werden. Erste Phagen der neuen Generation wurden nach einer Latenzphase von 120 Minuten freigesetzt. Parallel zum Ansteigen des Phagentiters kam es zu einer Verringerung der Zellzahl durch Lyse. Insgesamt konnte, bezogen auf den Infektionstiter, eine Erhöhung des Phagentiters um den Faktor 45 festgestellt werden (Abbildung 9b).

A12 zeigte eine hohe Affinität zu Wirtszellen des Stammes DB21. Nach 5 Minuten waren in der infizierten Kultur weniger als 1% der zugegebenen Phagen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die Freisetzung der neuen Phagengeneration begann zwischen 60 und 80 Minuten nach der Infektion. Zwischen 20 und 30 Minuten nach Zugabe der Phagen kam die Vermehrung der Wirtszellen zum Stillstand. Mit beginnender Freisetzung der neuen Phagenpopulation nahm die optische Dichte der Kultur stetig ab und ging nahezu gegen Null (Abbildung 9c). Die ermittelte mittlere Wurfgröße des Phagen war mit ca. 38 Phagen pro infizierter Zelle jedoch gering.

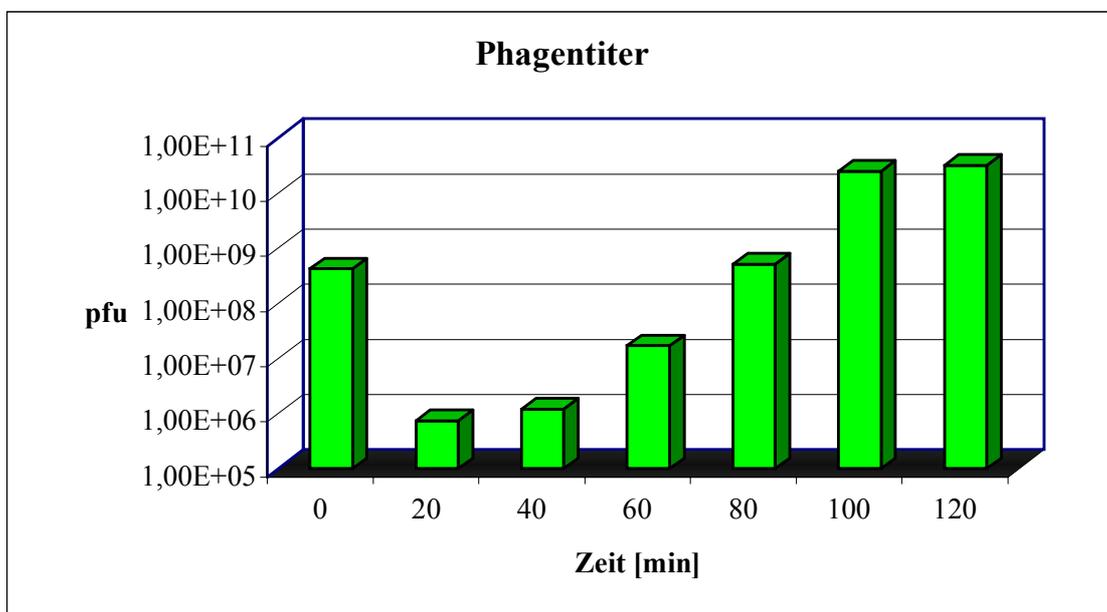
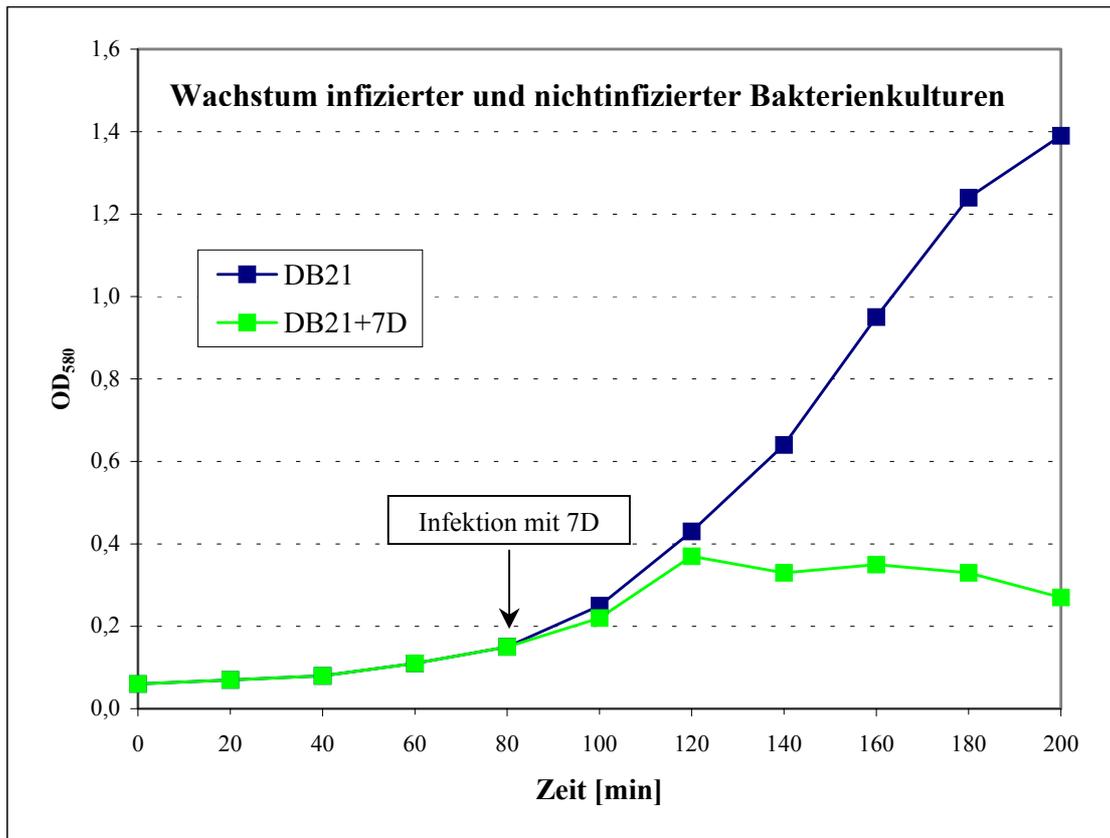


Abb. 9a: Vermehrungszyklus des Phagen 7D.

Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der optischen Dichte (OD₅₈₀) der Indikatorkultur im Vergleich zu einer nichtinfizierten Kultur sowie die zeitliche Veränderung der Phagentiter (PFU/ml) von der Infektion bis zur Freisetzung der neuen Phagengeneration.

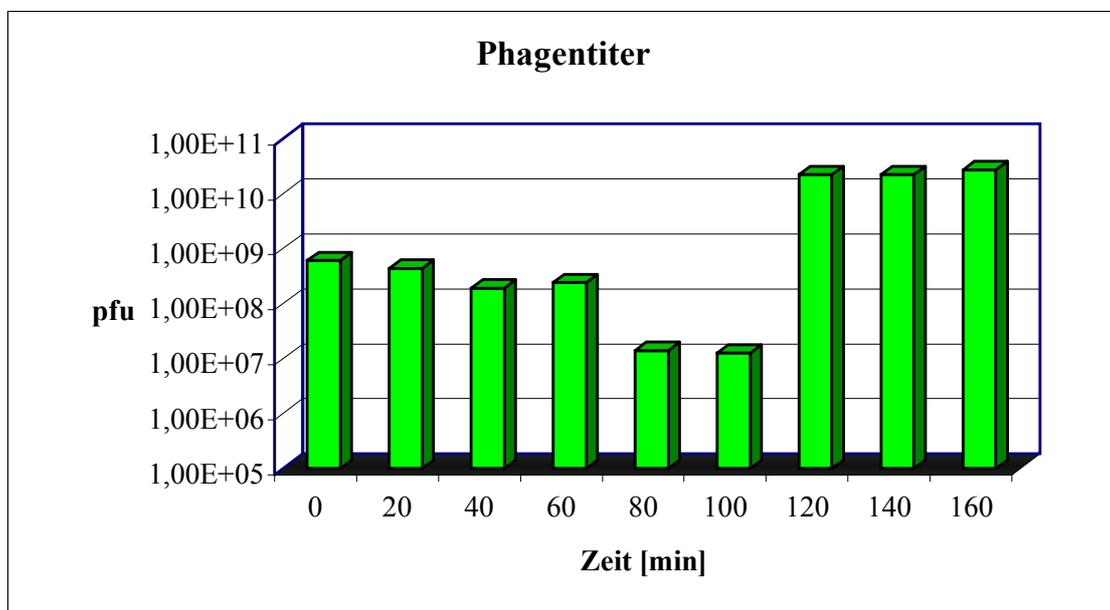
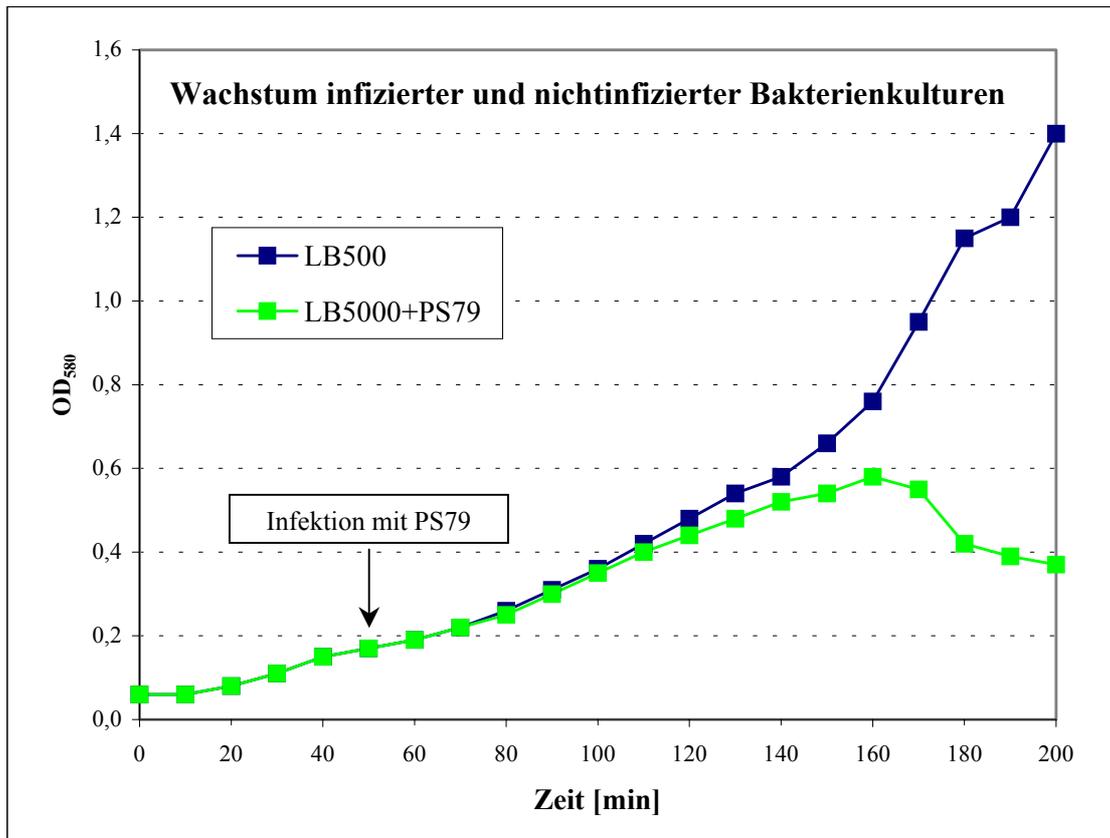


Abb. 9b: Vermehrungszyklus des Phagen PS79.

Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der optischen Dichte (OD₅₈₀) der Indikatorkultur im Vergleich zu einer nichtinfizierten Kultur sowie die zeitliche Veränderung der Phagentiter (PFU/ml) von der Infektion bis zur Freisetzung der neuen Phagengeneration.

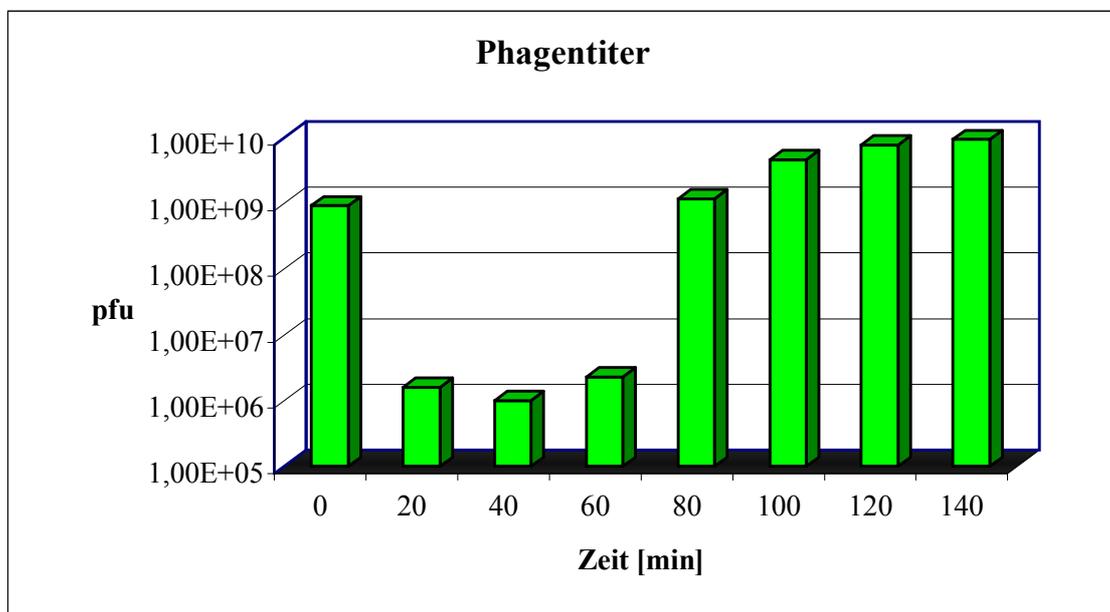
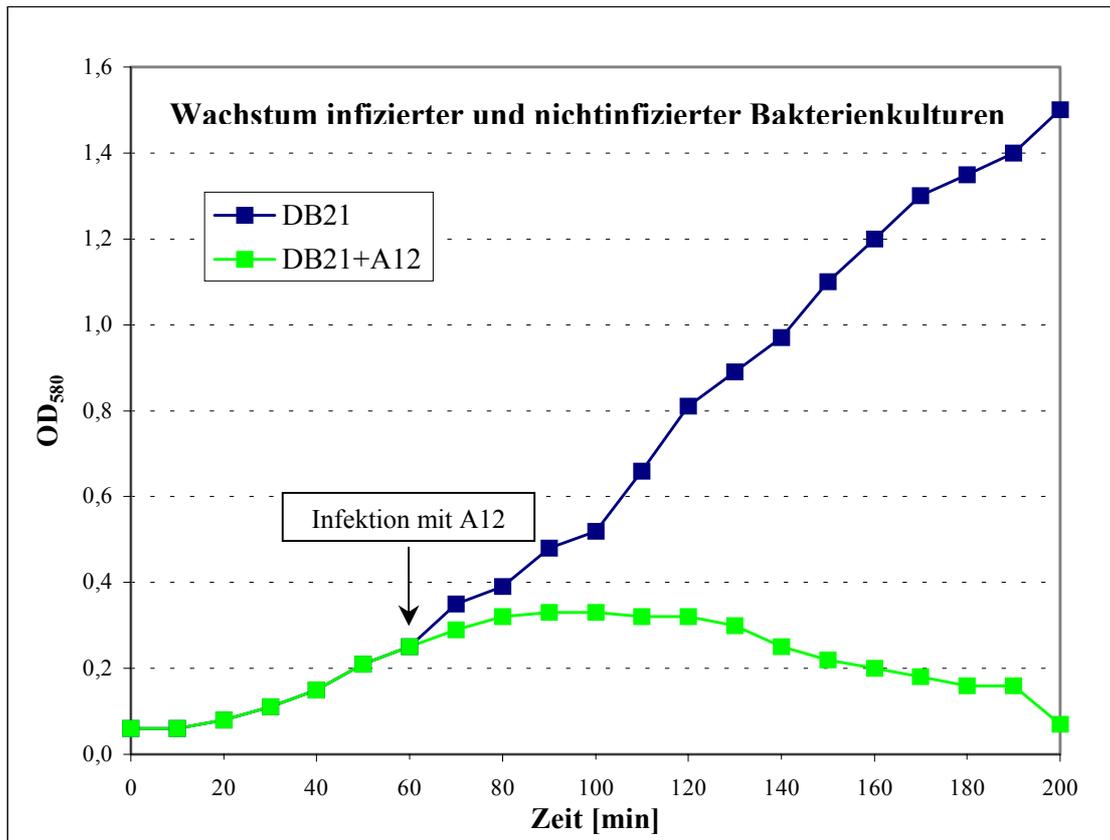


Abb. 9c: Vermehrungszyklus des Phagen A12.

Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der optischen Dichte (OD₅₈₀) der Indikatorkultur im Vergleich zu einer nichtinfizierten Kultur sowie die zeitliche Veränderung der Phagentiter (PFU/ml) von der Infektion bis zur Freisetzung der neuen Phagengeneration.

Da es sich bei den Phagen 7D und PS79 um temperente Bakterienviren handelt, führt ein Teil der Infektionsereignisse zur Lysogenisierung der Wirtszellen. Daher erlauben diese Experimente keine Rückschlüsse auf die mittlere Wurfgröße. Die geringe Größe der Plaques, die 7D auf dem Indikator DB21 bildet, ist jedoch offensichtlich auf die Lyse eines nur geringen Anteils der Zellen der infizierten Kultur zurückzuführen. Im Fall von PS79 liegt die Ursache der kleinen Lyseareale in der langen Latenzzeit begründet, die durch die geringe Affinität des Phagen zu den Zellen des Wirtes LB5000 verursacht wird. A12-infizierte DB21-Zellen setzen nur eine geringe Zahl von Phagen-nachkommen frei, was die Ausbreitung der Lyseareale ebenfalls negativ beeinflusst.

2.4. Taxonomische Einordnung

Die taxonomische Einordnung der Phagen 7D, PS79 und A12 erfolgte nach der erstmals von Bradley (1967) vorgenommenen und von Ackermann und Eisenstark (1974) erweiterten Einteilung von Bakteriophagen in 18 Gruppen auf Grund von morphologischen und Nukleinsäure-Merkmalen (DNA, RNA, ds, ss). Bei allen drei Phagen handelt es sich um Vertreter des Nukleinsäuretyps ds-DNA. Die weitere Klassifizierung erfolgte nach morphologischen Gesichtspunkten unter Verwendung elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Phagenpartikel, die von Herrn Prof. Dr. Wanner, Institut für Botanik der LMU München, angefertigt wurden.

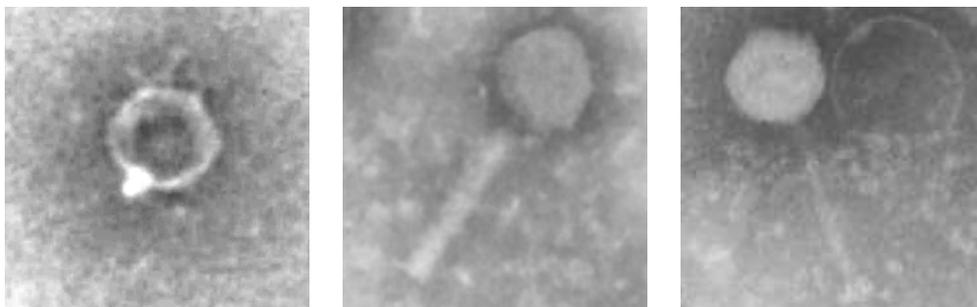


Abb. 10: Morphologie der Phagen 7D, PS79 und A12.

Tabelle 7 faßt die morphologischen Merkmale der Phagen 7D, PS79 und A12 sowie die Ergebnisse der taxonomischen Einordnung zusammen. Damit handelt es sich bei den Phagen 7D, PS79 und A12 um drei Vertreter der Ordnung *Caudovirales* (Bakteriophagen mit Schwanz), die aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Phagenschwänze den drei Familien dieser Phagengruppe (Ackermann, 2000) zugeordnet werden konnten.

Unter mehr als 5100 seit 1959 elektronenmikroskopisch untersuchten Bakteriophagen haben Phagen mit Schwanz mit ca. 96% den weitaus größten Anteil, während die übr-

gen ca. 4% zu den Ordnungen kubische, filamentöse oder pleomorphe Phagen zählen. Unter den *Caudovirales* wiederum zählen 60,8% zur Familie der *Siphoviridae* (Schwanz lang, nicht kontraktile), 25,1% zur Familie der *Myoviridae* (Schwanz kontraktile) und 14,1% zur Familie der *Podoviridae* (Schwanz kurz) (Ackermann, 2001).

Phage	Kopf	Schwanz	Familie
7D	Form: Ikosaeder Ø ca. 60 nm	kurz (< 10 nm)	<i>Podoviridae</i>
PS79	Form: Ikosaeder Ø ca. 50 nm	lang (ca. 90 nm); kontraktile	<i>Myoviridae</i>
A12	Form: Ikosaeder Ø ca. 50 nm	lang (ca. 100 nm); nicht kontraktile	<i>Siphoviridae</i>

Tab. 7: Morphologische Merkmale der Phagen 7D, PS79 und A12 und Zuordnung der Phagen zu den Familien der Ordnung *Caudovirales*.

Bei der taxonomischen Einordnung von Bakterienviren muß jedoch berücksichtigt werden, daß diese keine Aussagen hinsichtlich der Evolution oder Phylogenie zulassen. Molekularbiologische Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß Phagen einer Familie trotz ähnlicher Morphologie völlig unterschiedliche Charakteristika in Genomorganisation und Replikationsmodus zeigen und daher in vielen Fällen phylogenetisch wenig oder nicht verwandt sind.

2.5. Untersuchung der Phagen bezüglich ihrer Fähigkeit zur generellen Transduktion

Von besonderem Interesse war die Frage, ob die Phagen 7D, PS79 und A12 die Fähigkeit besitzen, chromosomale Gene oder Plasmide durch generelle Transduktion zu übertragen, und damit Anteil am Genfluß in mikrobiellen Lebensgemeinschaften haben.

2.5.1. Transduktion chromosomaler Markergene

Da keinerlei Informationen darüber vorlagen, ob und, wenn ja, wo die Phagen in das Wirtschromosom integrieren, wurde für jeden Phagen die Transduktion von zwei chromosomalen Markergenen mit einem Abstand von mehr als einer Minute auf dem Chromosom von *Salmonella* untersucht. Diese Vorgehensweise war notwendig, da unter Berücksichtigung von nur einem Markergen nicht ausgeschlossen werden konnte, daß diese Phagen speziell transduzierende Partikel durch fehlerhafte Exzision bilden.

Die Größe eines DNA-Fragments, das ein Phage transduzieren kann, wird durch dessen Kopfvolumen begrenzt. Aufgrund der Resultate der morphologischen Untersuchung der Phagen 7D, PS79 und A12 konnte davon ausgegangen werden, daß deren Verpackungs-

kapazität mit der des Phagen P22 (Kopfdurchmesser ca. 60 nm) vergleichbar ist. P22 ist in der Lage, etwa 1% (45 kb) der chromosomalen DNA seines Wirtes zu verpacken, was einer Minute auf der Karte des *Salmonella*-Chromosoms entspricht.

Auf Spenderstämmen gezogene Lysate wurden mit Empfängerzellen (m.o.i. = 3) gemischt und zur Adsorption der Phagenpartikel an die Wirtszellen bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden so gewählt, daß davon ausgegangen werden konnte, daß über 90% der Phagen adsorbiert hatten (vgl. 2.3.). Transduktionsansätze zur Übertragung von Antibiotikaresistenzmarkern wurden auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Die Übertragung von Auxotrophiemarkern wurde auf Minimalmedienplatten getestet.

Tabelle 8 faßt die im Rahmen der Untersuchung durchgeführten Transduktionsexperimente sowie deren Ergebnisse zusammen. Für jedes Experiment wurde das Verhältnis von Transduktanten zu infektiösen Partikeln (T/P-Wert) bestimmt.

Bakteriophage	Spenderstamm	Empfängerstamm	Markergen	T/P-Wert
7D	DB21::Tn10	DB21(7D)	tet ^R (47 min)	5,8 x 10 ⁻⁸
	DB21	HisB22(H1;7D)	hisB22 (34 min)	7,2 x 10 ⁻⁹
PS79	LB5000trp ⁺	LB5000(PS79)	trpB8 (42 min)	4,7 x 10 ⁻⁷
	LB5000::Tn10	LB5000(PS79)	tet ^R (47 min)	7,2 x 10 ⁻⁷
A12	DB21	HisB22(H1)	hisB22 (34 min)	2,7 x 10 ⁻⁸
	DB21	Try8(sie)	trpB8 (42 min)	1,2 x 10 ⁻⁹

Tab. 8: Transduktion chromosomaler Markergene.

Dargestellt sind die zur Überprüfung der Fähigkeit der Phagen 7D, PS79 und A12 zur generellen Transduktion eingesetzten Kombinationen von Spender- und Empfängerstämmen sowie die zur Selektion rekombinanter Phänotypen eingesetzten Markergene. Die Lage der Markergene auf der genetischen Karte von *Salmonella typhimurium* nach Sanderson et al. (1995) ist in Klammern angegeben. T/P-Werte stellen die gemittelten Ergebnisse von je vier Transduktionsexperimenten dar. Die Infektion erfolgte jeweils mit der m.o.i. = 3.

Die Transduktionsexperimente zeigten eindeutig, daß die Phagen 7D, PS79 und A12 in der Lage sind, genetische Marker aus verschiedenen Bereichen des *Salmonella*-Chromosoms zu transduzieren. Damit sind sie den generell transduzierenden Phagen zuzuordnen. Die Verhältnisse von Transduktanten zu infektiösen Partikeln zwischen 10⁻⁷ und 10⁻⁹ liegen in der Größenordnung der bekannten T/P-Werte von 10⁻⁶ bis < 10⁻⁹, die für verschiedene Marker für P22 ermittelt wurden (Schmieger, 1972).

2.5.2. Transduktion von Plasmiden

Phagen, die chromosomale Marker durch generelle Transduktion übertragen können, sind häufig auch in der Lage, Plasmide ihrer Wirtszelle zu verpacken und zu transferieren. Nach dem derzeitigen Wissensstand können plasmidtransduzierende Partikel durch zwei unterschiedliche Mechanismen gebildet werden. Einer dieser Mechanismen beruht auf der Bildung eines Kointegrats aus Plasmid- und Phagen-DNA, das durch *rolling circle*-Replikation vervielfältigt und, ausgehend von der *pac site* auf der Phagen-DNA, in Phagenpartikel verpackt wird (Orbach und Jackson, 1982). Ein anderes Prinzip stellt die Verpackung, ausgehend von einer *pac*-ähnlichen Sequenz auf dem Plasmid, dar. Dies erfordert die Bildung eines Plasmidkonkatemers über den *rolling circle*-Mechanismus, wodurch die benötigte Länge des DNA-Moleküls für die Füllung eines Phagenkopfes (*headful*-Mechanismus) erreicht wird (Schmidt und Schmieger, 1984).

Zur Überprüfung der Transduktionsfähigkeit wurden plasmidhaltige Abkömmlinge der Stämme DB21, DB21(7D) und LB5000(PS79) durch Transformation mit pBR322-Plasmid-DNA hergestellt und die Phagen auf diesen Spenderstämmen vermehrt. Die Infektion der Empfängerstämme erfolgte mit der m.o.i. = 3. Die erfolgreiche Übertragung wurde durch Selektion der Transduktanten auf die Expression der plasmidkodierten Ampicillinresistenz auf antibiotikahaltigen Agarplatten nachgewiesen. Zudem wurden Plasmide der Transduktanten isoliert und nach Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und Gelelektrophorese mit dem Originalplasmid verglichen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 9 zeigt die getesteten Phagen-Empfänger-Kombinationen sowie die ermittelten T/P-Werte der Transduktionsexperimente.

Bakteriophage	Empfängerstamm	T/P-Wert
7D	DB21(7D)	$4,4 \times 10^{-7}$
PS79	LB5000(PS79)	$3,0 \times 10^{-6}$
A12	DB21	$< 1,1 \times 10^{-9}$

Tab. 9: Transduktion von Plasmiden.

Dargestellt sind die eingesetzten Phagen-Empfänger-Kombinationen. T/P-Werte stellen die gemittelten Ergebnisse von je vier Transduktionsexperimenten dar. Die Infektion erfolgte jeweils mit der m.o.i. = 3.

Die Fähigkeit, pBR322 zu transduzieren, konnte für 7D und PS79 nachgewiesen werden. A12-Lysate enthielten dagegen keine nachweisbaren pBR322-transduzierenden Partikel. Ebenso erfolglos blieben weitere Transduktionsversuche mit den Plasmiden pET32 und pIC19H.

Da es sich bei A12 um einen virulenten Phagen handelt, stand für Transduktionsexperimente kein A12-immuner Empfängerstamm zur Verfügung. Es bestand daher die

Möglichkeit, daß Zellen, auf die Plasmid-DNA übertragen worden war, durch eine gleichzeitige Infektion mit weiteren Phagenpartikeln lysiert wurden. Diese Ursache konnte durch Experimente, bei denen Empfängerulturen mit geringen Infektionsmultiplizitäten infiziert wurden (m.o.i.: 0,5 und 1) und die ebenfalls negative Ergebnisse zeigten, ausgeschlossen werden. Es muß daher angenommen werden, daß die getesteten Plasmide keine Sequenzen tragen, die als Verpackungsstartpunkt für A12 dienen können bzw. daß keine ausreichend großen DNA-Moleküle in Form von Phagen-Plasmid-Kointegraten bzw. Plasmidkonkatemeren für die Füllung der Phagenköpfe zur Verfügung stehen.

2.6. Das Wirtsspektrum

Phagen besitzen spezielle Strukturkomponenten zur irreversiblen Anheftung und zum Transfer ihres genetischen Materials in die Wirtszelle. Der Wirtsbereich eines Phagen ist durch definierte molekulare Interaktion zwischen Phage und Wirtszelloberfläche determiniert. Zusätzlich können Schutzmechanismen der Bakterienzellen, wie Restriktions-Modifikations-Systeme, Barrieren für eine erfolgreiche Infektion darstellen. Von besonderer Bedeutung bei generell transduzierenden Phagen ist die Frage, ob diese in der Lage sind, stamm- oder spezieübergreifende Wirtsspektren erfolgreich zu infizieren. Die Phagen 7D, PS79 und A12 wurden daher einerseits auf ihre Vermehrungsfähigkeit auf verschiedenen Stämmen von *S. typhimurium* untersucht, die sich hinsichtlich ihrer Zelloberfläche sowie ihrer Restriktions-Modifikations-Systeme unterscheiden, andererseits auf ihre Vermehrung auf der zu *Salmonella* nah verwandten Spezies *E. coli*. Je 100 µl 10^{-2} - 10^{-8} verdünnter Phagenlysate wurden mit Bakterienzellen gemischt, in einer Weichagardeckschicht auf LB-Agarplatten plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die Verdünnung der Phagenlysate wurde sichergestellt, daß keine falsch positiven Ergebnisse durch das Austitrieren der Restriktionsenzyme infolge zu hoher Phagentiter simuliert wurden.

Folgende Bakterienstämme wurden als Indikatoren eingesetzt: *S. typhimurium* DB21, *S. typhimurium* LB5000, *S. typhimurium* LB5010 sowie *E. coli* C. Bei DB21 handelt es sich um einen prototrophen Wildtyp serovar LT-2. Die Stämme LB5000 und LB5010 weisen in allen drei für *S. typhimurium* LT-2 beschriebenen Restriktionssystemen Defekte auf. Sie besitzen jedoch funktionsfähige Modifikationssysteme (Bullas und Ryu, 1983) und unterscheiden sich untereinander bezüglich ihrer Zelloberfläche. LB5000 besitzt wie DB21 O-spezifische Polysaccharidketten, was Kolonien dieses Stammes ein glattes (*smooth*) Aussehen verleiht. Bei LB5010 fehlen diese Strukturen aufgrund eines Defekts im Galactose-Epimerase-Gen ganz oder teilweise (Schlegel, 1992), wodurch die Oberfläche der Kolonien rau (*rough*) erscheint. Dadurch werden bei LB5010 Rezeptoren auf der Zelloberfläche zugänglich, die sonst durch die LPS-

Schicht maskiert vorliegen. Bei *E. coli* C handelt es sich um einen Wildtypstamm ohne Restriktionssysteme. Tabelle 10 faßt die Ergebnisse zu Überprüfung der Wirtsspezifität zusammen.

Indikator	Phage		
	7D	PS79	A12
<i>S. typhimurium</i> DB21	+	-	+
<i>S. typhimurium</i> LB5000	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> LB5010	+	-	+
<i>E. coli</i> C	-	-	-

Tab. 10: Vermehrung der Phagen PS79, P7 und A12 auf verschiedenen Indikatoren.
 +: erfolgreiche Phagenvermehrung, -: keine Phagenvermehrung.

Die Phagen 7D und A12 konnten auf allen getesteten Indikatoren von *S. typhimurium* vermehrt werden. Dies zeigt einerseits, daß ihre DNA vor dem Abbau durch die Restriktionsenzyme von LT-2 geschützt ist, andererseits, daß die für die Infektion dieser Phagen notwendigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche nicht durch die LPS-Schicht maskiert werden. Beim Phagen PS79 dagegen, der nur auf LB5000 vermehrt werden konnte, handelt es sich um einen *smooth*-spezifischen Vertreter der *Salmonella*-Phagen. Überraschend war in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß PS79 nicht in der Lage ist, den *smooth*-Stamm DB21 zu infizieren. Durch die Bestimmung des Phagentiters während der Infektion einer DB21-Kultur mit PS79 konnte gezeigt werden, daß der Phage nicht an Zellen dieses Stammes adsorbiert. In einem Zeitraum von 0 bis 100 Minuten nach der Infektion verringerte sich die Zahl freier Phagen lediglich um 4%. Keiner der Phagen konnte auf dem Stamm *E. coli* C vermehrt werden. Auch in diesen Fällen war nahezu keine Abnahme des Phagentiters (< 8%) bis 100 Minuten nach der Infektion festzustellen.

Es ist anzunehmen, daß die Unfähigkeit der Phagen, *E. coli* zu infizieren, auf das Fehlen oder die Maskierung von für 7D, PS79 und A12 spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen zurückzuführen ist. Dies wurde als Hinweis auf den engen Wirtsbereich der Phagen gewertet.

2.7. Schutzmechanismen lysogener Zellen

Im Gegensatz zu virulenten Phagen, bei denen die Infektion einer Wirtszelle unmittelbar zur Produktion von Phagennachkommen und damit zum Tod der propagierenden Zelle führt, sind temperente Phagen nach erfolgreicher Injektion ihrer DNA in die Wirtszelle in der Lage, zwei prinzipiell unterschiedliche Strategien für ihre Vermehrung zu nutzen (Abbildung 11).

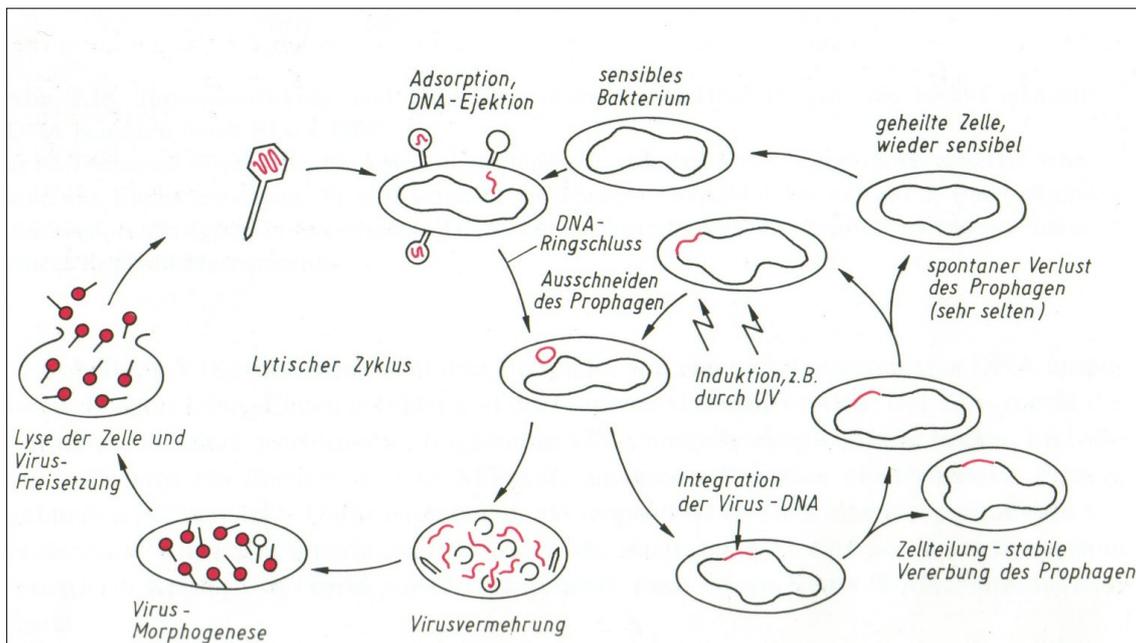


Abb. 11: Vermehrungsstrategien tempererter Bakteriophagen (aus Klaus et al., 1992).

Während bei einem Teil der Infektionsereignisse die lytische Vermehrung des Phagen mit anschließender Lyse der Wirtszelle unter Freisetzung der Phagennachkommen stattfindet, bleibt bei dem anderen Teil die Produktion von Phagen aus. Die vegetative Vermehrung des Phagen wird unterdrückt, das Phagengenom stabil in das Genom der Wirtszelle integriert und bei deren Vermehrung an die Tochterzellen weitergegeben. Das reprimierte Genom des Phagen wird als Prophage, die den Prophagen tragende Zelle als lysogen bezeichnet. Lysogene Zellen bleiben zwar weiterhin empfindlich gegenüber Infektion durch andere Phagentypen (heteroimmune Superinfektion), sie sind jedoch generell gegen Infektionen mit dem gleichen Phagen (homoimmune Superinfektion) immun.

Die Immunität lysogener Zellen wird dabei unter anderem durch phagenkodierte spezifische Repressormoleküle vermittelt, die die Transkription viraler Gene durch Bindung an Operatorregionen der Prophagen-DNA blockieren. Diese Repressoren wirken zudem auf die Operatoren superinfizierender Phagen, die in ihrer Repressor-Operator-Spezifität dem Prophagen gleichen (homoimmune Phagen). Neben der repressorvermittelten Immunität sind weitere Mechanismen beschrieben, wie die Veränderung von Oberflächenrezeptoren (Uetake und Hagiwara, 1972) oder der Restriktions-Modifikations-Systeme (Arber und Wauters-Willems, 1970), die eine prophagentragende Zelle durch lysogene Konversion vor weiteren Phageninfektionen schützen. Eine Überprüfung der neuen Phagen auf ihre Fähigkeit, P22-lysogene Zellen zu infizieren sowie Zellen, die 7D oder PS79 als Prophagen tragen, vor der Infektion mit anderen Phagen zu schützen,

sollte Informationen über die Repressor-Operator-Spezifitäten und andere Schutzmechanismen lysogener Zellen vor weiteren Phageninfektionen liefern.

Um den Prophagenstatus und die Immunität gegen überinfizierende Phagen aufrecht zu erhalten, besitzt der Phage P22 ein zweiteiliges Immunitätssystem. Das *immC*-System umfaßt den kodierenden Bereich des C2-Repressors sowie die durch diesen Repressor negativ regulierten Operatoren O_R und O_L , die die Expression der "frühen Gene" in der lytischen Entwicklung des Phagen regulieren. Die zweite Region, *immI*, enthält die Gene für den Mnt-Repressor (*maintenance*) sowie den Antirepressor, Ant. Da die Expression des Antirepressors, der seinerseits den C2-Repressor inaktiviert, negativ durch die Bindung des Mnt-Repressors reguliert wird, müssen zur Aufrechterhaltung des Prophagenstatus beide Repressormoleküle, C2 und Mnt, in ausreichender Menge in der Zelle vorhanden sein. Da es sich bei C2 und Mnt um *trans*-aktive Faktoren handelt, binden diese auch an die Operatoren überinfizierender sowie die anderer Phagen mit homologen Operatorregionen und unterdrücken dadurch deren lytische Vermehrung. Zusätzlich besitzen für den Wildtyp von P22 lysogene Zellen noch weitere Mechanismen zum Schutz gegen Überinfektion mit verwandten Phagen, deren Vermehrung nicht durch C2 und Mnt unterdrückt werden kann. Diese sogenannten *superinfection exclusion*-Systeme (*sieA* und *sieB*) wurden im Immunitätstest durch Verwendung einer P22 *sie*⁻-Mutante ausgeschaltet, da sie auch bei Phagen, die keine P22-homologen Operatorregionen besitzen, repressorvermittelte Homoimmunität vorspiegeln würden.

Zum Test wurden der Stamm DB21(P22*sie*) in Weichagar auf LB-Agarplatten plattiert und je 10 µl 10⁻² - 10⁻⁶ verdünnter Lysate der Phagen 7D und A12 aufgetropft. Durch das Auftropfen verschiedener Verdünnungen wurde gewährleistet, daß Repressormoleküle des Prophagen nicht durch die gleichzeitige Infektion der lysogenen Zellen mit mehreren Testphagen ausverdünnt wurden, was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Deutliche Lyseareale in den Tropfbereichen beider Phagen auf dem Indikatorstamm zeigten eindeutig, daß diese heteroimmun zu P22 sind. Der Phage PS79 konnte mit diesem System nicht getestet werden, da er nicht in der Lage ist, DB21 zu infizieren (vgl. 2.6.).

Für weitere Untersuchungen wurden 7D-lysogene und PS79-lysogene Stämme von DB21 bzw. LB5000 auf Immunität gegen Infektionen mit den Phagen P22, ES18 sowie 7D, PS79 und A12 überprüft. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben. Wie Tabelle 11 zeigt, sind die lysogenen Stämme gegen die Infektion mit den Phagen geschützt, die sie als Prophagen tragen. Der Prophage 7D schützt seine Wirtszelle vor Infektionen mit dem Phagen ES18, nicht jedoch vor P22. Dieses Ergebnis überraschte insofern, als ES18 wie P22 das *immC*-System zur Unterdrückung der Expression der "frühen Gene" in der vegetativen Vermehrung benutzt. Im Gegensatz zu P22 besitzt ES18 jedoch kein *immI*-System und damit keinen Antirepressor. Aus diesem Grund

kann sich P22 auf ES18-lysogenen Zellen vermehren. P22-Lysogene sind dagegen vor einer Infektion mit ES18 geschützt.

Eine mögliche Erklärung für die Sensitivität 7D-lysogener Zellen für P22 könnte die Wirkung des P22-Antirepressors auf den Repressor von 7D sein. Wie bekannt ist, wird der Antirepressor von P22 nach der Infektion einer Wirtszelle aktiviert und ist in der Lage, eine Reihe verschiedener Repressoren homoimmuner Phagen wie Lambda, L und ES18 zu inaktivieren. Man nimmt an, daß die Induktion eines Prophagen P22 den Zugriff auf dessen Genom und damit den Austausch von Modulen ermöglicht (Poteete, 1988). Denkbar wäre auch, daß 7D als Prophage eine lysogene Konversion bewirkt, die den ansonsten ES18-sensitiven Stamm DB21 resistent gegen diesen Phagen werden läßt. ES18 und P22 adsorbieren an verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche von *S. typhimurium*. Während ES18 an das Ferrichrom-Bindungsprotein Sid K bindet, erfolgt die Anheftung von P22 über das O-Antigen (Beumer et al., 1987). Dadurch ist ES18 im Gegensatz zu P22 in der Lage, auch *rough*-Stämme von *S. typhimurium* zu infizieren. Eine durch den Prophagen 7D induzierte Veränderung der Zelloberfläche, die Auswirkungen auf Sid K, nicht jedoch auf das O-Antigen hat, könnte zur Resistenz gegenüber ES18 führen, ohne die Infektiosität von P22 zu beeinflussen. PS79-lysogene Zellen sind für die Infektion mit P22 und ES18 sensibel und somit bezüglich dieser Phagen heteroimmun.

Teststamm	Phage				
	P22	ES18	7D	PS79	A12
DB21(7D)	+	-	-	+	+
LB5000(PS79)	+	+	+	-	+

Tab. 11: Immunität 7D und PS79-lysogener Stämme gegenüber einer Infektion mit verschiedenen Phagen. +: Vermehrung des Phagen auf dem Teststamm, -: keine Vermehrung des Phagen auf dem Teststamm.

Der Phage A12 nimmt in diesem Zusammenhang insofern eine Sonderstellung ein, als es sich um einen Vertreter der virulenten Phagen handelt. Die Infektion einer Zelle mit A12 führt unabdingbar zur vegetativen Vermehrung des Phagen mit anschließender Zerstörung der Wirtszelle. Der Phage ist daher, im Gegensatz zu temperenten Phagen, nicht auf Schutzmechanismen gegen weitere Phageninfektionen angewiesen. Wie die Ergebnisse des Immunitätstests zeigten, wird die Vermehrung von A12 durch keinen der getesteten Prophagen beeinträchtigt.

2.8. Molekulargenetische Charakterisierung

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse der molekulargenetischen Charakterisierung für die Phagen 7D, PS79 und A12 im folgenden getrennt dargestellt. Abbildung 12 zeigt einen Vergleich der *EcoRI*-Restriktionsmuster aus den Phagenpartikeln isolierter Gesamt-DNA.

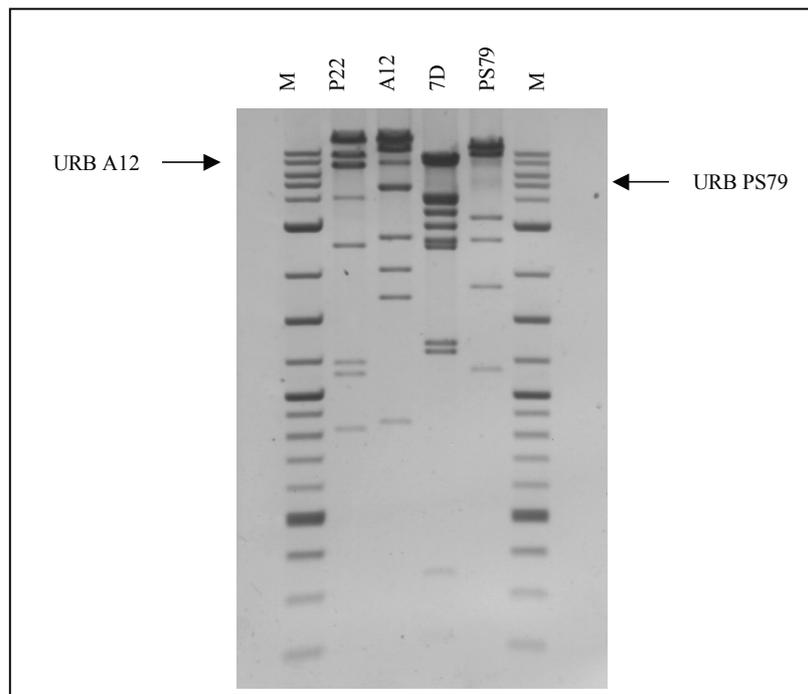


Abb. 12: Restriktionsmuster *EcoRI*-gespaltener DNA der Phagen 7D, PS79 und A12. Als DNA-Größenstandard (M) diente *EcoRI*-gespaltene DNA des Phagen P22. URB: unterrepräsentierte Bande.

2.8.1. Molekulargenetische Charakterisierung des Phagen 7D

2.8.1.1. Restriktionskartierung und Bestimmung der Genomgröße

Zur Erleichterung der Restriktionskartierung wurde das Genom von 7D subkloniert. Dazu wurde zunächst das Verfahren der *shotgun*-Klonierung eingesetzt. Das Genom des Phagen wird durch Restriktionsspaltung fragmentiert. Die entstandenen Phagen-DNA-Fragmente werden mit Plasmid-DNA, die mit einem geeigneten Enzym geöffnet ist und deren 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert sind, durch Inkubation mit T4-Ligase verknüpft. Die Vermehrung rekombinanter Plasmide erfolgt durch Transformation kompetenter Bakterienzellen mit dem Ligationsansatz. Hybridplasmide werden aus positiven Klonen isoliert und nach Restriktionsspaltung und Gelelektrophorese die

Größe der inserierten Phagen-DNA-Fragmente ermittelt. Im günstigsten Fall können durch diese Methode in einem Ansatz alle DNA-Spaltfragmente kloniert werden.

Zur Herstellung zweier überlappender Genbanken wurden zwei *shotgun*-Klonierungen mit *EcoRI* und *EcoRV* fragmentierter Phagen-DNA durchgeführt. Diese Ansätze erschienen aufgrund der Größe und der Anzahl der entstehenden Spaltprodukte als geeignet (vgl. Abbildung 13). Als Klonierungsvektor diente pIC19H.

pIC-Plasmide tragen das Gen für Ampicillin-Resistenz sowie das Gen für die α -Untereinheit der β -Galaktosidase (*lacZ α*), das bei der Insertion von Fremd-DNA in die Klonierungsregion des Vektors zerstört wird. Dies ermöglicht die Identifizierung hybridplasmid-tragender Bakterienzellen auf Nährmedien mit Ampicillin, IPTG und X-Gal. Voraussetzung dafür ist die Transformation von Zellen mit Mutationen im *lacZ*-Gen, die die Aktivität des Enzyms durch Komplementation mit der vektorkodierten α -Untereinheit erlauben. Zellen mit Plasmiden ohne Insert besitzen β -Galaktosidaseaktivität und spalten X-Gal, wodurch 5-Brom-4-chlor-indigo entsteht, das die Kolonien blau färbt. Zellen mit Hybridplasmiden bilden dagegen weiße Kolonien.

Für Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm JM109 verwendet. Plasmide positiver Klone wurden isoliert und durch Restriktionsspaltung mit *EcoRI* bzw. *EcoRV* analysiert. Mit dieser Methode konnten 18 *EcoRV*-Fragmente sowie neun von zehn *EcoRI*-Fragmenten der Phagen-DNA kloniert werden. Eine fehlende 2700 bp große *EcoRI*-Bande (F-Bande) wurde aus gespaltener Phagen-DNA nach gelelektrophoretischer Trennung isoliert und kloniert. Klone der Genombanken wurden fortlaufend in der Reihenfolge ihrer Isolierung und mit dem Zusatz _{EV} für *EcoRV*-Fragmente bzw. _{EI} für *EcoRI*-Fragmente gekennzeichnet. Der die F-Bande tragende Klon wurde mit F_{EI} bezeichnet. Aus den Klonen isolierte Plasmide wurden durch das Präfix p gekennzeichnet.

Die dadurch zu Verfügung stehenden überlappenden Genbanken, die alle auf Agarosegelen sichtbaren Fragmente der mit *EcoRI* bzw. *EcoRV*-gespaltenen Phagen-DNA enthielten, ermöglichten die Erstellung einer linearen Karte des Phagen-genoms durch *chromosome walking*. Dazu wurden die klonierten Fragmente durch Spaltung der Plasmide mit *EcoRI* bzw. *EcoRV* und Gelelektrophorese vom Vektoranteil getrennt, isoliert und mit Digoxigenin markiert. Die Sonden einer Genbank wurden zur Detektion überlappender Anschlußklone der jeweils anderen Genbank zur *Dot Blot*-Hybridisierung mit isolierten Plasmiden eingesetzt. Zur weiteren Restriktionskartierung wurden Doppelspaltungen der Plasmide der Genbank mit dem für die jeweilige Fragmentklonierung eingesetzten Enzym und den Restriktionsendonukleasen *DraI*, *HindIII*, *MluI*, *PstI*, *SmaI* und *XhoI* durchgeführt. Die Kartierung mehrmals vorhandener Schnittstellen eines Enzyms in einem klonierten Fragment erfolgte durch partielle Spaltung. Die Größe der Restriktionsfragmente wurde mittels Gelelektrophorese und Vergleich mit DNA-Größenstandards ermittelt.

Nicht in den Genbanken enthalten waren die bei der *EcoRI*- bzw. der *EcoRV*-Spaltung entstehenden Anfangs- und Endfragmente des Phagengenoms. Diese Fragmente werden auf der einen Seite durch die Schnittstelle des eingesetzten Restriktionsenzym, auf der anderen Seite durch den Schnitt der an der DNA-Verpackung beteiligten Terminase begrenzt. Es ist nicht bekannt, welche Art von DNA-Enden die 7D-Terminase produziert. Die Randfragmente konnten im Rahmen der *shotgun*-Klonierungen nicht isoliert werden. Aufgrund der Tatsache, daß diese Spaltprodukte jedoch weder auf Agarosegelen, noch auf *Southern Blots*, die mit Gesamt-Phagen-DNA-Sonden hybridisiert wurden, sichtbar waren, kann angenommen werden, daß die beiden nichtkartierten Endbereiche des Genoms von 7D jeweils weniger als 200 bp umfassen.

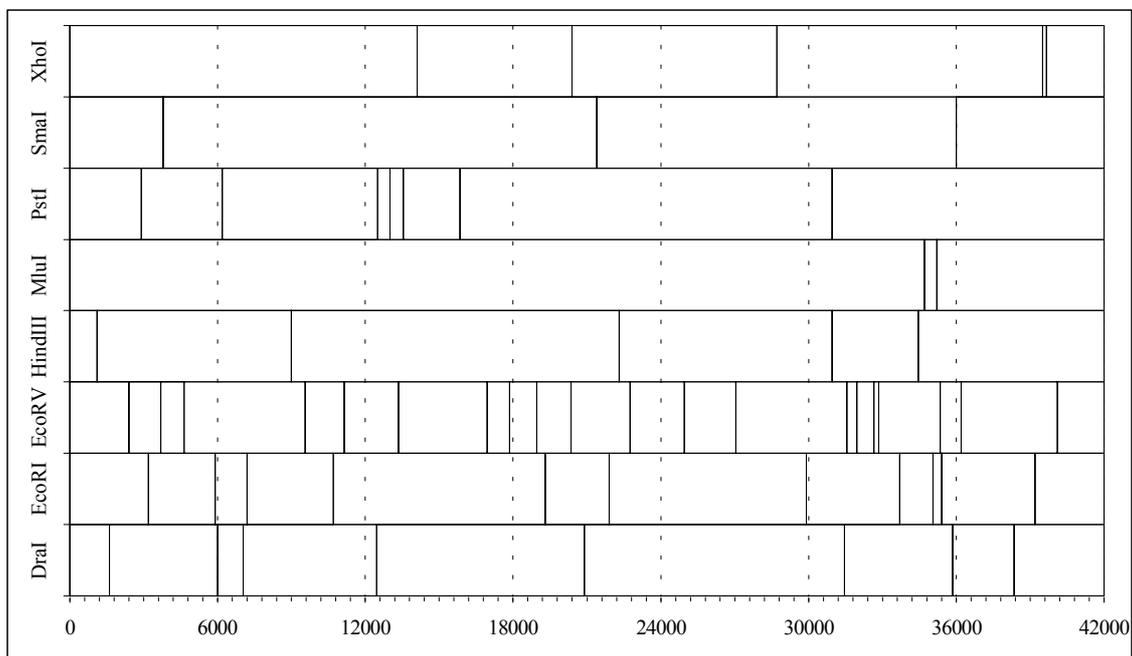


Abb. 13: Restriktionskarte des Phagen 7D.

Dargestellt ist die Restriktionskarte für acht verschiedene Restriktionsenzyme. Angaben zur genauer Länge der Fragmente sowie die Positionsangaben der Schnittstellen sind in tabellarischer Form im Anhang aufgelistet. Der Anfang der Karte wurde willkürlich durch das 3200 pb große *EcoRI*-Fragment festgelegt. In der Karte fehlen das Anfangs- sowie das Endfragment des Phagengenoms mit einer jeweiligen Größe von maximal 200 bp.

Die Genomgröße des Phagen wurde aus der Summe der klonierten Fragmente beider Genbanken gemittelt. Demnach umfaßt das Genom von 7D zwischen 42000 und 42400 bp.

2.8.1.2. Untersuchungen zum Status des Prophagen in 7D-lysogenen Zellen

Das Genom eines temperenten Phagen kann eine stabile, über mehrere Generationen andauernde Wechselwirkung mit der Wirtszelle eingehen (vgl. 2.7.). Einige Phagen, wie etwa Lambda (Campbell, 1962), integrieren in das Wirtschromosom, andere, wie z.B. P1, replizieren autonom als Plasmid (Ikeda und Tomizawa, 1968). Für die Integration in das Chromosom der Wirtszelle wurden zwei Mechanismen beschrieben. Die DNA des Phagen wird demnach entweder wie bei Mu (Taylor, 1963) durch Transposition an beliebiger Stelle oder wie bei Lambda durch ortsspezifische Rekombination zwischen der Anheftungsregion (*attachment site*) des Phagen (*attP*) und des Bakterienchromosoms (*attB*) integriert. Unter Einsatz einer Gesamt-Phagen-DNA-Sonde kann ein Vergleich der Hybridisierungsmuster mit Restriktionsenzymen gespaltener Phagen- und Prophagen-DNA Informationen darüber liefern, ob und, wenn ja, durch welchen Mechanismus die Integration erfolgt (Abbildung 14).

Aus Phagenpartikeln isolierte DNA unterscheidet sich von der ringförmigen DNA eines autonom replizierenden Prophagen nach der Spaltung einerseits durch das Vorhandensein der Banden, die die beiden Enden einer DNA-Verpackungseinheit repräsentieren, andererseits durch das Fehlen der Bande, die diese Enden in verknüpfter Form beinhaltet (vgl. dazu auch 2.8.1.3.). Ist der Prophage Bestandteil des Wirtschromosoms, können die Hybridisierungsmuster gespaltener DNA Aufschluß über den Integrationsmechanismus geben. Unter der Voraussetzung, daß die Phagen-DNA nur an einer Stelle des Wirtschromosoms integriert, ist folgendes Ergebnis zu erwarten: Durch Transposition integrierte Prophagen-DNA unterscheidet sich im Hybridisierungsmuster von der DNA freier Phagen durch das Fehlen der Endfragmente sowie das Auftreten zweier größerer Fragmente, die durch die kovalente Verknüpfung der Enden mit dem Chromosom der Wirtszelle entstehen. Bei Phagen, die durch Rekombination zwischen den Anheftungsregionen des Phagengenoms *attP* und des Bakterienchromosoms *attB* in das Genom ihrer Wirtszelle integrieren, wird der die *attachment site* des Phagen tragende Genombereich geteilt. Daher unterscheidet sich die integrierte Form von der nichtintegrierten einerseits durch das Fehlen des die *attP site* tragenden Fragments, andererseits durch das Vorhandensein zweier neuer Spaltprodukte, die die beiden mit der Wirts-DNA verknüpften Teile des fehlenden Fragments repräsentieren. Zudem sollten in diesem Fall, bedingt durch die Zirkularisierung des Phagengenoms, vor der Integration die beiden Endfragmente der freien linearen Phagen-DNA im Genom des Prophagen in verknüpfter Form als neues Fragment auftauchen.

Zur Untersuchung des Prophagenstatus von 7D wurde *EcoRV*-gespaltene Phagen-DNA und Gesamt-DNA des Stammes DB21(7D) nach gelelektrophoretischer Trennung auf

eine Nylonmembran übertragen und mit *EcoRV*-gespaltener, digoxigeninmarkierter 7D-Gesamt-DNA hybridisiert.

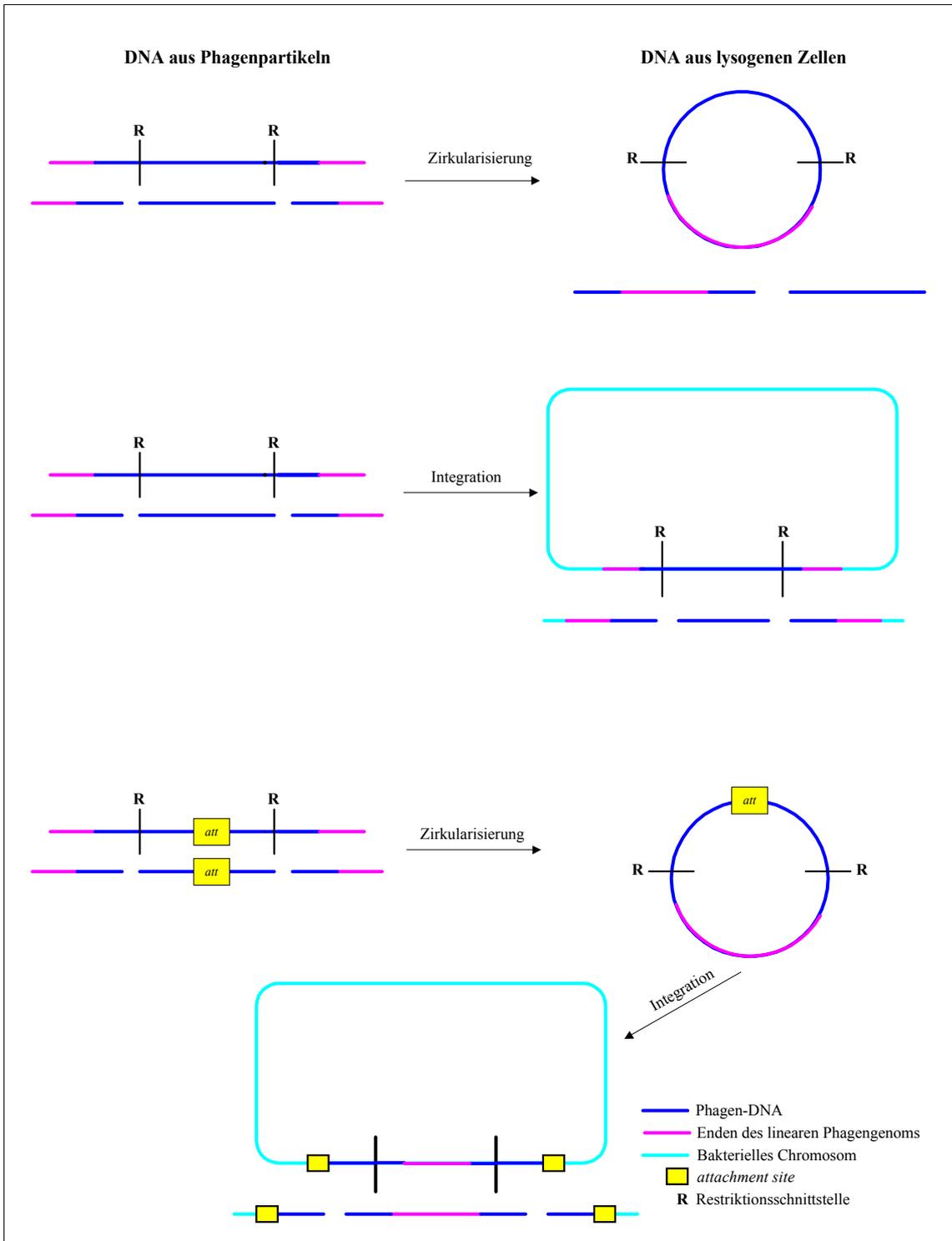


Abb. 14: Prophagenstatus: Unterschiede in den Hybridisierungsmustern von restriktionsgespaltener Phagen-DNA im Vergleich zu restriktionsgespaltener DNA des Prophagen bei Einsatz einer Gesamt-Phagen-DNA-Sonde.

Wie die Abbildung 15 zeigt, unterscheiden sich die Restriktionsmuster bei 7D durch das Fehlen einer 951 bp großen, als M-Fragment bezeichneten Bande im Restriktionsmuster des Prophagen gegenüber dem der nichtintegrierten Form. Dieses Ergebnis wies darauf hin, daß es sich bei dem M-Fragment der *EcoRV*-Spaltung der Phagen-DNA um den die *attP site* tragenden Abschnitt des Phagengenoms handelt.

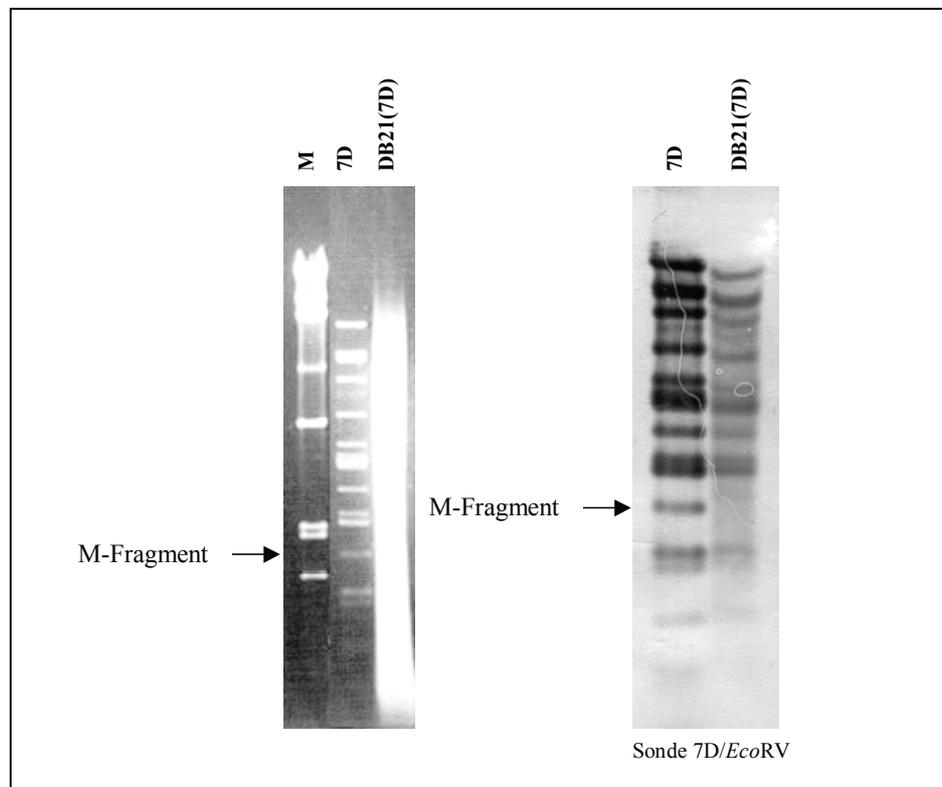


Abb. 15: Untersuchung des Prophagenstatus von 7D. Vergleich der *EcoRV*-Fragmentmuster aus 7D-Phagenpartikeln und 7D-lysogenen Zellen isolierter DNA durch *Southern Blot*-Hybridisierung unter Verwendung einer Gesamt-Phagen-DNA-Sonde von 7D. → markiert die M-Fragment-Bande. Als DNA-Größenstandard (M) diente *EcoRI*-gespaltene DNA des Phagen P22.

Weitere bei diesem Integrationsmechanismus zu fordernde zusätzliche Banden im Hybridisierungsmuster des Prophagen konnten, wahrscheinlich aufgrund von Signalüberlagerungen, nicht detektiert werden. Zur weiteren Untersuchung wurde daher die *EcoRV*-M-Bande durch Restriktionsspaltung und Gelelektrophorese der Plasmid-DNA des entsprechenden Genbank-Klons ($p4_{EV}$) aus einem Agarosegel isoliert. Das DNA-Fragment wurde mit Digoxigenin markiert und als Sonde zur *Southern Blot*-Hybridisierung *EcoRV*-gespaltener DNA von 7D und DB21(7D) eingesetzt. Dadurch konnten im Spaltmuster der chromosomalen DNA zwei Fragmente mit einer Größe von 1500 bp und 2500 bp identifiziert werden, die jeweils einen Teil der *EcoRV*-M-Bande repräsentieren (Daten nicht gezeigt). Um dieses Ergebnis zu bestätigen und die *attB*-Stelle auf dem Chromosom von DB21 zu identifizieren, wurde der Bereich, der das 1500 bp-Frag-

ment enthielt, nach gelelektrophoretischer Trennung *EcoRV*-gespaltener DNA des 7D-lysogenen Stammes aus einem Agarosegel ausgeschnitten. Die darin enthaltenen DNA-Fragmente wurden eluiert, mit dem Vektor pIC19H ligiert und damit *E. coli* JM109 transformiert. Plasmid-DNA wurde aus 84 positiven Klonen isoliert. Der gesuchte Klon wurde durch *Dot Blot*-Hybridisierung der Plasmide mit der M-Fragment-Sonde identifiziert und mit 7D1500att bezeichnet. Versuche, das 2500 bp-Fragment auf die gleiche Weise zu klonieren, blieben dagegen erfolglos.

Das klonierte M-Fragment sowie das aus DB21(7D) isolierte 1500 bp-Fragment wurden sequenziert und miteinander verglichen. Der Sequenzvergleich ist im Anhang zu finden. Beide Klonsequenzen sind bis zum Basenpaar 591 identisch, weisen jedoch im weiteren Verlauf keinerlei Homologie auf. Dies zeigt, daß die *attachment site* von 7D im *EcoRV*-M-Fragment liegt. Das 1500 bp-*EcoRV*-Fragment aus DB21(7D) besteht zum einen Teil aus Prophagen-DNA (bp 1 - 591), zum anderen Teil aus DNA des Wirtszellgenoms (bp 592 - 1555). Zur Identifizierung der Integrationsstelle des Phagen 7D wurde ein Homologievergleich der Basen 592 bis 1555 mit der *Salmonella typhimurium*-Datenbank durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß diese Sequenz bis auf eine Abweichung von 4 bp mit einer 953 bp Sequenz der Datenbank (bp 2622829 - 2623728) identisch ist. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Einbau des Genoms von 7D in einem genlosen Abschnitt des Chromosoms von *S. typhimurium* stromaufwärts des *guaA*-Gens erfolgt. Der betreffende Ausschnitt des *S. typhimurium*-Chromosoms ist im Anhang zu finden.

2.8.1.3. Untersuchung zum Mechanismus der Zirkularisierung der Phagen-DNA

Soweit bekannt, verpacken generell transduzierende Phagen ihr Genom nach dem *headful*-Mechanismus. Ausgehend von einem konkatemeren Phagen-DNA-Molekül beginnt die Verpackung an einer spezifischen Sequenz, der *pac site*. Die Menge an verpackter DNA wird dabei ausschließlich durch die Kapazität des Viruskapsids begrenzt. Da ein Kapsid für gewöhnlich eine DNA-Menge aufnehmen kann, die etwas größer ist als die eines Genoms, weisen die verpackten Sequenzen eine terminale Redundanz von einigen Prozent auf. Nachdem der erste DNA-Abschnitt vom Konkatermer abgetrennt wurde, beginnt die nächste Verpackungseinheit an dem von einer Terminase produzierten Ende und führt damit zur zirkulären Permutation der Phagengenome. Nach der Infektion der Wirtszelle erfolgt der Ringschluß der Phagen-DNA durch Rekombination in der terminal redundanten Region. Dieser Ringschluß schützt die Phagen-DNA vor zellulären Exonukleasen (z.B. RecBCD) und ermöglicht die Integration in das Genom der Wirtszelle durch Rekombination. Abbildung 16 zeigt die schematische Darstellung der *headful*-Verpackung.

Spaltet man nach diesem Mechanismus verpackte DNA mit Restriktionsenzymen, so sind im Restriktionsmuster häufig unterrepräsentierte Banden zu finden. Diese stellen

DNA-Fragmente dar, die aufgrund ihrer Lage im Genom nur beim ersten Verpackungsereignis des Konkatemers entstehen.

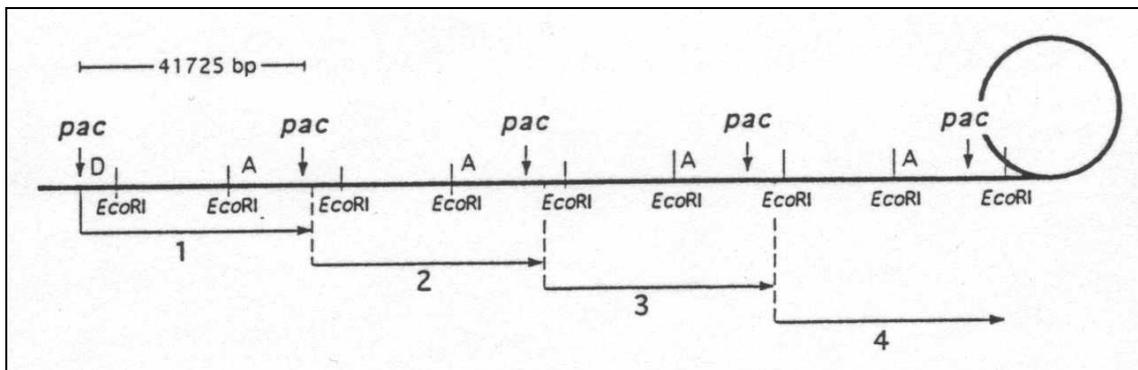


Abb. 16: Prinzip der *headful*-Verpackung. Die Darstellung zeigt ein konkatemeres DNA-Molekül mit *pac sites* und den Restriktionsschnittstellen, die zur Entstehung der unterrepräsentierten Banden A und D führen, sowie die Genomabschnitte der ersten vier Verpackerrunden (aus Schicklmaier, 1995).

Wie die Ergebnisse der Transduktionsexperimente (vgl. 2.5.) sowie Untersuchungen zum Status des Prophagen (vgl. 2.8.1.2.) eindeutig zeigten, gehört 7D zur Gruppe generell transduzierender Bakteriophagen, die durch Rekombination in das Genom der Wirtszelle integrieren. Es überraschte daher, daß in Restriktionsspaltungen der DNA des Phagen 7D niemals unterrepräsentierte Banden sichtbar waren (vgl. Abbildung 12). Insgesamt wurden 13 verschiedene Restriktionsenzyme getestet (Daten nicht gezeigt). Um zu klären, ob 7D wie Lambda kohäsive DNA-Enden besitzt, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Lineare Phagen Genome, die *cos sites* besitzen, können mit T4-Ligase zirkularisiert werden. Spaltet man lineare und zirkularisierte Genome mit demselben Restriktionsenzym, so erhält man nach gelelektrophoretischer Trennung der Spaltprodukte charakteristische Bandenmuster (vgl. Abbildung 17). Bei der Spaltung ringförmiger DNA-Moleküle fehlen - im Vergleich zum Spaltmuster linearer DNA - zwei Fragmente, deren eines Ende die *cos site* darstellt. Im Gegenzug erscheint ein neues Fragment, das in seiner Größe der Summe der fehlenden Fragmente entspricht und die *cos*-Enden in verknüpfter Form beinhaltet. Phagen, deren DNA terminal redundante Enden aufweist, können nicht mit T4-Ligase zirkularisiert werden und zeigen daher mit und ohne Ligase-Behandlung das gleiche Restriktionsmuster. Andere Phagen wie Lambda erreichen die Zirkularisierung ihres Genoms nach der Injektion in die Wirtszelle durch Verknüpfung der kohäsiven DNA-Enden (*cos sites*).

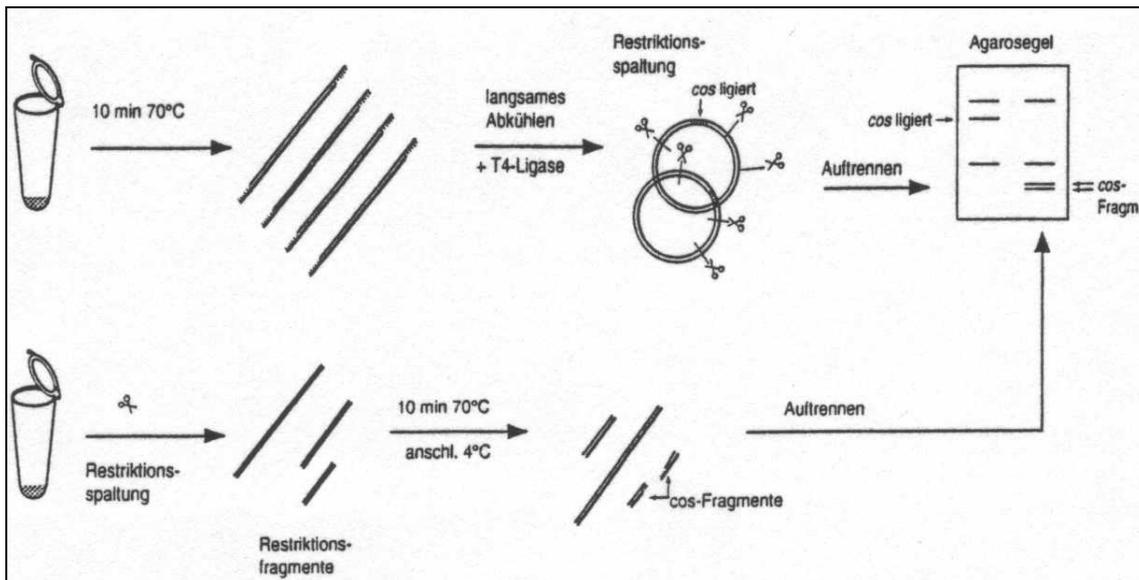


Abb. 17: Experimenteller Nachweis der Zirkularisierung von Phagen-DNA über *cos*-Enden (aus Schicklmaier, 1995).

DNA des Phagen 7D wurde zwei verschiedenen Behandlungen unterzogen. Ein Teil der Phagen-DNA wurde 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Dadurch werden über kohäsive Enden verknüpfte zirkuläre Moleküle linearisiert. Durch langsame Abkühlung, Zusatz von T4-Ligase und Inkubation über Nacht bei 15°C wurde - *cos*-Enden vorausgesetzt - ein Ringschluß und die kovalente Verknüpfung der DNA-Moleküle ermöglicht. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 68°C wurde die Ligase inaktiviert. Die DNA wurde anschließend mit *DraI* gespalten. Der andere Teil der Phagen-DNA wurde zuerst mit *DraI* gespalten, danach 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Durch anschließendes sofortiges Abkühlen im Eis/Ethanol-Bad wurde die Religation der DNA-Moleküle verhindert. Das Ergebnis dieses Test zeigt Abbildung 18.

Im Fall der Positivkontrolle Lambda sind deutliche quantitative Unterschiede einzelner Banden im Restriktionsmuster zwischen den unterschiedlich behandelten DNA-Proben zu erkennen. Das die ligierte *cos site* enthaltende Fragment der zirkularisierten DNA von 11284 bp (Spur 2) entspricht dabei den durch Spaltung linearer DNA entstandenen Fragmenten mit den Größen von 6694 bp und 4590 bp (Spur 3). Die jeweils im submolaren Verhältnis sichtbaren Banden der nicht ligierten *cos*-Fragmente in zirkularisierter Lambda-DNA sowie das die ligierte *cos site* tragende Fragment in linearer Lambda-DNA werden durch die Bildung von linearen konkatemeren Lambda-DNA-Molekülen während der Ligasebehandlung bzw. durch die Hybridisierung von *cos*-Fragmenten nach der Linearisierung verursacht. Dagegen weisen die Spaltmuster der beiden 7D-DNA-Proben keinerlei Unterschiede auf. Die Zirkularisierung der DNA des Phagen 7D erfolgt demnach nicht über kohäsive Enden.

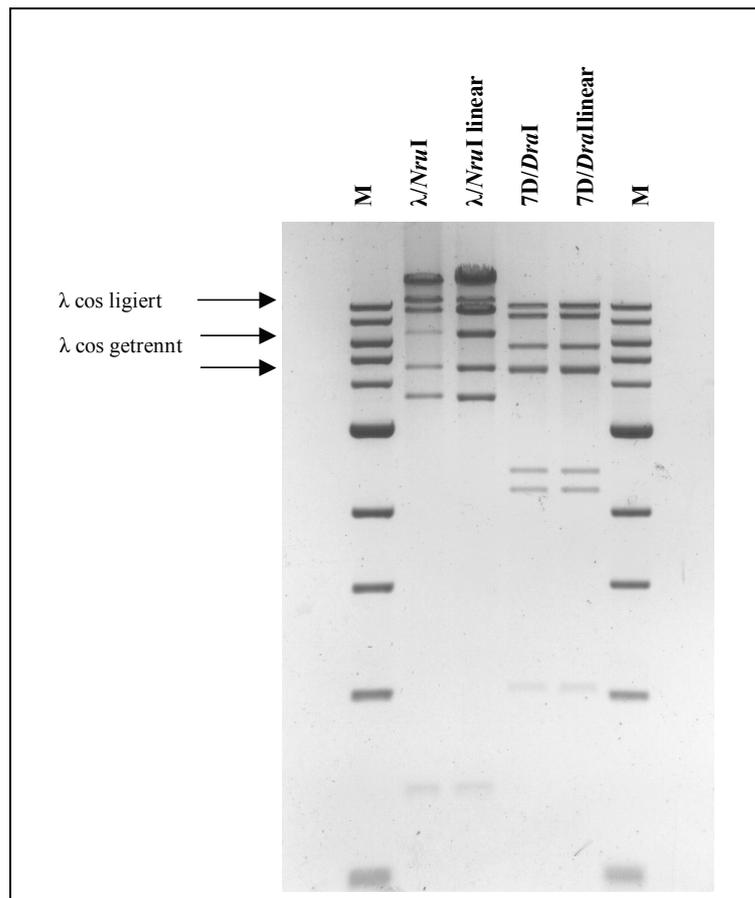


Abb. 18: Untersuchung des Genoms von 7D auf cos-Enden.

Fragmente, die die ligierte *cos site* bzw. die *cos* Endfragmente der Lambda-DNA tragen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Als DNA-Größenstandard (M) diente die 1 kb DNA-Leiter.

2.8.2. Molekulargenetische Charakterisierung des Phagen PS79

2.8.2.1. Restriktionskartierung und Bestimmung der Genomgröße

Das Phagen genom wurde zur Erleichterung der Restriktionskartierung subkloniert. Zur Herstellung einer PS79-Genbank wurden *shotgun*-Klonierungen mit den Enzymen *NruI*- und *EcoRV*-gespaltener Phagen-DNA durchgeführt (vgl. dazu 2.8.1.1.). Diese Enzyme produzieren DNA-Fragmente, die aufgrund ihrer Größe und Anzahl für den Ansatz geeignet erschienen (vgl. Abbildung 19). Als Klonierungsvektor diente in beiden Fällen das mit *EcoRV* gespaltene Plasmid pIC19H. Die Vermehrung rekombinanter Plasmide erfolgte durch Transformation von *E. coli* JM109. Plasmide wurden aus positiven Klonen isoliert und die Größe der inserierten Fragmente nach Restriktionspaltung und gelelektrophoretischer Trennung überprüft. Plasmide mit *EcoRV*-Fragmenten wurden dabei mit *EcoRV* gespalten. Plasmide der *NruI*-Klonierung wurden

nach Spaltung mit *Hind*III analysiert, da die Schnittstelle für *Nru*I durch die Ligation mit dem *Eco*RV-gespaltenen Vektor zerstört wurde.

Dadurch konnten 18 von 21 *Eco*RV- und 12 von 18 *Nru*I-Fragmenten des Phagen-genoms kloniert werden. Die Klone wurden in der Reihenfolge der Isolierung nummeriert und mit _{EV} für *Eco*RV-Fragment bzw. _{NI} für *Nru*I-Fragment bezeichnet. Durch *Southern Blot*-Hybridisierungen *Eco*RV- und *Nru*I-gespaltener Phagen-DNA mit Sonden der klonierten Fragmente und Kartierung der Schnittstellen von fünf weiteren Restriktionsenzymen konnte gezeigt werden, daß die Genbank einen zusammenhängenden Abschnitt des Phagen-genoms von 41300 bp repräsentiert. Die Lage der Schnittstellen zueinander wurde durch Spaltungen der klonierten Fragmente sowie Einzelspaltungen und Doppelspaltungen mit den verschiedenen Enzymkombinationen ermittelt. Fragmentgrößen wurden durch Vergleich mit DNA-Größenstandards bestimmt.

Das *Eco*RV-Spaltmuster der Phagen-DNA zeigte eine unterrepräsentierte, ca. 3400 bp große Bande (Daten nicht gezeigt). Die Kartierung der Restriktionsschnittstellen weiterer Enzyme wies darauf hin, daß es sich dabei um ein Teilfragment einer 6500 bp großen, ebenfalls unterrepräsentierten Bande der *Nde*I-Spaltung der Phagen-DNA handeln könnte. Durch Hybridisierungen auf Nylonmembranen übertragener *Nde*I-Spaltmuster der PS79-DNA mit einer Sonde der *Eco*RV-Bande, die aus einem Agarosegel isoliert wurde, sowie mit Sonden der Klone die an diese Bande anschließen (89_{EV} und 24_{EV}) konnte dies bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Bande stellt somit die auf der einen Seite durch die *pac site* begrenzte Startbande des Phagen-genoms dar und schließt an die klonierte 300 bp-Bande des Klons E89 an.

Versuche, das unterrepräsentierte *Eco*RV-Fragment zu klonieren, blieben erfolglos. Die Überprüfung dieses Genombereichs auf Schnittstellen der anderen zur Kartierung verwendeten Enzyme erfolgte durch Vergleich von Einzel- und Doppelspaltungen der Gesamt-Phagen-DNA mit dem jeweiligen Enzym und *Eco*RV.

Da das Genom von PS79 terminal redundant ist, wie das Vorhandensein unterrepräsentierter Banden zeigt (vgl. Abbildung 12), war eine zirkuläre Restriktionskarte des Phagen-genoms zu fordern. Ein Fragment, das die *pac site* überspannt und daher mit der unterrepräsentierten Bande der *Eco*RV-Spaltung hybridisiert, konnte jedoch nicht kloniert werden. Da dieses fehlende Fragment auf *Southern Blots*, die mit Gesamt-Phagen-DNA-Sonden hybridisiert wurden, nicht sichtbar war, kann angenommen werden, daß dieser nichtkartierte Endbereich des Genoms von PS79 kleiner als 200 bp ist. Abbildung 19 zeigt die Restriktionskarte des Genoms von PS79.

Die Genomgröße von PS79 wurde aus den Daten der Restriktionskartierung bestimmt und beträgt 46200 bp.

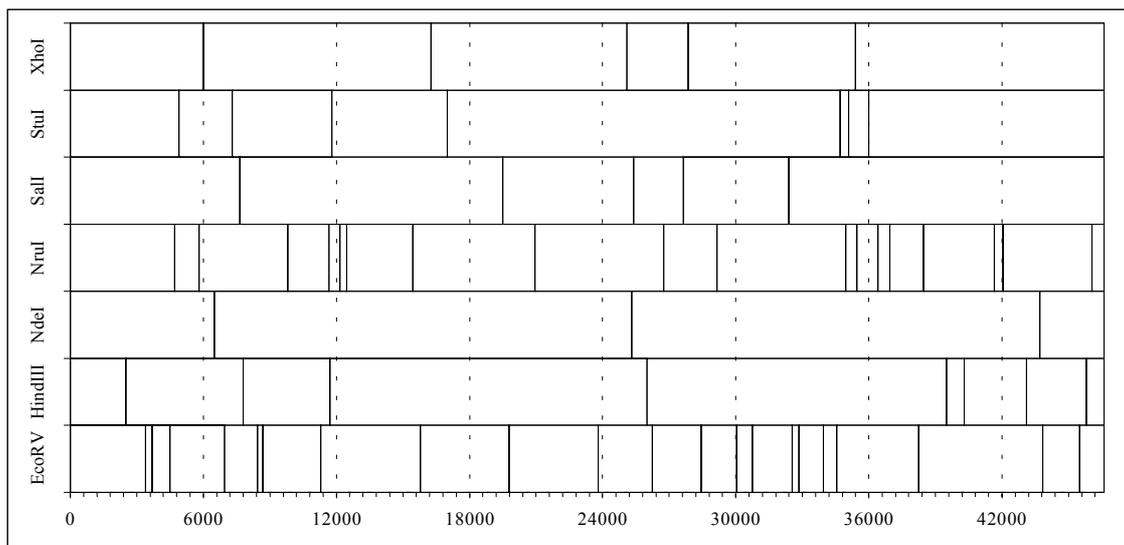


Abb. 19: Restriktionskarte des Phagen PS79.

Dargestellt ist die Restriktionskarte für sieben verschiedene Enzyme. Angaben zur genauen Länge der Fragmente sowie die Positionsangaben der Schnittstellen sind in tabellarischer Form im Anhang aufgelistet. 0 bezeichnet den Verpackungsstartpunkt *pac*. Bei den jeweiligen Startfragmenten, der *EcoRV*-, *HindIII*- sowie der *NdeI*-Spaltung handelt es sich um unterrepräsentierte Banden. In der Karte ist das maximal 200 bp große Endfragment des Phagenoms nicht enthalten.

2.8.2.2. Untersuchungen zum Status des Prophagen in lysogenen Zellen

In Analogie zu 7D (vgl. 2.8.1.2.) wurden die bei der Spaltung von aus Phagenköpfen isolierter DNA und chromosomaler DNA des lysogenen Stammes LB5000(PS79) entstandenen Restriktionsmuster durch *Southern Blot*-Analyse untersucht. Als Sonde diente *EcoRI*-gespaltene digoxigeninmarkierte Gesamt-DNA des Phagen. Wie der Vergleich der Bandenmuster mit *HindIII*-gespaltener DNA zeigt (Abbildung 20), fehlt im Hybridisierungsmuster der Prophagen-DNA eine ca. 2500 bp große Bande, die der unterrepräsentierten Bande im Restriktionsmuster der Phagen-DNA entspricht. Zudem zeigt das Hybridisierungsmuster von aus LB5000(PS79) isolierter Gesamt-DNA eine zusätzliche ca. 7000 bp große Bande.

Diese Unterschiede im Restriktionsmuster wiesen darauf hin, daß die DNA des Phagen nach der Injektion in die Wirtszelle durch Rekombination in der terminal redundanten Region zirkularisiert. In diesem Fall war jedoch das Fehlen einer weiteren Bande im Restriktionsmuster der Phagen-DNA zu fordern, die zusammen mit der 2500 bp-Bande das zusätzliche 7000 bp-Fragment bildet (vgl. Abbildung 14). Eine solche Bande konnte jedoch nicht identifiziert werden. Auch Untersuchungen mit weiteren sechs Restriktionsendonukleasen erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

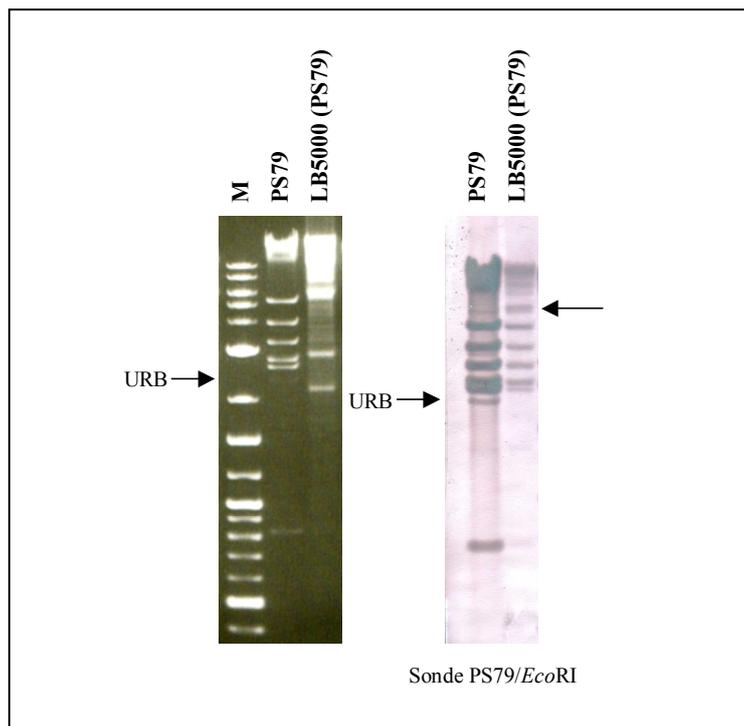


Abb. 20: Untersuchung des Prophagenstatus von PS79.

Vergleich der Hybridisierungssignale *Hind*III-gespaltener DNA aus PS79-Phagenpartikeln und *Hind*III-gespaltener Gesamt-DNA des PS79-lysogenen Stammes LB5000(PS79) durch *Southern Blot*-Hybridisierung. Als Sonde diente digoxigeninmarkierte Gesamt-Phagen-DNA von PS79. Als DNA-Größenstandard (M) diente ein Gemisch aus 1 kb und 100 bp DNA-Leiter. URB: unterrepräsentierte Bande. → markiert die ca. 7000 bp große zusätzliche Bande.

Aufgrund dieser Ergebnisse erschien es wahrscheinlich, daß PS79 als ringförmige extrachromosomale Replikationseinheit im Cytoplasma lysogener Zellen vorliegt. Um dies zu überprüfen, wurde aus dem PS79-lysogenen Stamm extrachromosomale DNA nach einer zur Isolierung von Cosmiden geeigneten Methode präpariert. Diese DNA-Präparation sollte - für den Fall, daß PS79 nicht integriert - die DNA des Prophagen enthalten. Zur Entfernung spontan freigesetzter Phagen während der Anzucht der Bakterien wurden die Zellen vor der DNA-Präparation dreimal mit Verdünnungsflüssigkeit gewaschen. Extrachromosomale DNA wurde nach Spaltung mit *Eco*RI und gelelektrophoretischer Trennung auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer PS79-Gesamt-Phagen-DNA-Sonde hybridisiert. PS79-DNA konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Da extrachromosomale DNA jedoch ebenfalls aus dem nichtlysogenen Stamm LB5000 isoliert werden konnte, war anzunehmen, daß dieser, wie die Originallinie von *S. typhimurium* LT2, das 90 kb-Plasmid pSLT trägt (Sanderson et al., 1995). Dieses in mehreren Kopien pro Zelle vorkommende Plasmid könnte einen negativen Einfluß auf die Präparation oder den Nachweis der Phagen-DNA haben. Die *Southern Blot*-Hybridisierung *Eco*RV-gespaltener PS79-DNA mit einer Sonde digoxigenin-

markierter extrachromosomaler DNA aus LB5000(PS79) zeigte dagegen Signale, die mit dem Restriktionsmuster der Phagen-DNA identisch waren (Daten nicht gezeigt). Zur zweifelsfreien Bestätigung dafür, daß PS79 in lysogenen Zellen als selbständige extrachromosomale Replikationseinheit vorliegt, wären weitere Untersuchungen mit einem PS79-sensiblen plasmidlosen Wirtstamm notwendig. Ein geeigneter Stamm stand jedoch nicht zur Verfügung.

2.8.3. Molekulargenetische Charakterisierung des Phagen A12

2.8.3.1. Restriktionskartierung und Bestimmung der Genomgröße

Für die Erstellung der Restriktionskarte des Phagen A12 wurde zunächst versucht, das Genom zu subklonieren. Zur Herstellung einer Genbank wurden *shotgun*-Klonierungen mit *SalI*- und *HindIII*- gespaltener Phagen-DNA durchgeführt. Als Klonierungsvektoren diente das mit *HindIII* bzw. *SalI* geschnittene Plasmid pIC19H. Die Vermehrung rekombinanter Plasmide erfolgte durch Transformation von *E. coli* JM109. Durch diese Methode konnten jedoch lediglich sieben von insgesamt 12 *SalI*-Fragmenten sowie drei von insgesamt sieben *HindIII*-Fragmenten kloniert werden. Die Klone wurden mit dem Kennbuchstaben des Restriktionsfragments (mit abnehmender Größe, beginnend mit A) und dem Zusatz _{HIII} für *HindIII* bzw. _{SI} für *SalI* bezeichnet.

Wie aus der Analyse der Restriktionsmuster mit verschiedenen Enzymen gespaltener DNA von A12 ermittelt wurde, umfaßt das Genom des Phagen 44600 bp. Die klonierten Fragmente repräsentierten damit lediglich einen Anteil von ca. 32% (14000 bp) des mit *SalI* geschnittenen bzw. ca. 19% (8500 bp) des mit *HindIII* geschnittenen Genoms. Alle Versuche, die fehlenden Fragmente nach gelelektrophoretischer Trennung und Isolierung aus Agarosegelen zu klonieren, blieben erfolglos.

Wie die *Southern Blot*-Analyse mit *SalI*- bzw. *HindIII*-gespaltener Phagen-DNA unter Verwendung der klonierten digoxigeninmarkierten Restriktionsfragmente als Sonden zeigte, repräsentieren die Fragmente beider Spaltungen zudem überlappende Bereiche des Phagengenoms. Da die Phagen-DNA für die Klonierung mit nur einem Enzym geschnitten wurde, war die Integration der Fragmente in den Vektor in beiden Orientierungen möglich. Es konnte daher ausgeschlossen werden, daß die Expression phagenkodierter Gene mit toxischer Wirkung für die transformierten Zellen, ausgehend vom Promotor des β -Galaktosidasegens des Vektors, zur Nichtklonierbarkeit der Fragmente führte. Es muß angenommen werden, daß die fehlenden Spaltfragmente entweder aufgrund störender Sekundärstrukturen der DNA nicht mit dem Vektor ligiert werden konnten oder daß die Expression zellschädigender Gene von Promotoren der Phagen-DNA ausging.

Zur Erstellung einer *Hind*III-Restriktionskarte von A12 wurde die Phagen-DNA in Einzel- und Doppelspaltungen mit den Enzymen *Sal*I und *Hind*III analysiert. Klonierte Fragmente wurden durch Restriktionsspaltung mit *Hind*III und *Sal*I analysiert. Nicht-klonierbare Fragmente der Einzelspaltungen, deren Zuordnung nicht möglich war, wurden nach gelelektrophoretischer Trennung und Isolierung aus Agarosegelen mit dem jeweils anderen Enzym nachgespalten und nach Markierung mit Digoxigenin als Sonden für die Hybridisierung von *Southern Blots* einfach und doppelt gespaltener Phagen-DNA eingesetzt. Dadurch konnte neben den *Hind*III-Schnittstellen die Lage von sieben Fragmenten der *Sal*I-Spaltung bestimmt werden. Fünf weitere *Sal*I-Fragmente konnten der 18000 bp großen Bande der *Hind*III-Spaltung zugeordnet werden, ohne daß ihre Reihenfolge festgelegt werden konnte.

14 weitere getestete Enzyme erwiesen sich für eine Kartierung durch Einzel- und Doppelspaltungen der Phagen-DNA als ungeeignet, da entweder keine oder für die Zuordnung der Fragmente zu viele Schnittstellen im A12-Genom vorhanden sind. Die Kartierung des Gesamtgenoms wurde aus diesem Grund auf die Schnittstellen für *Hind*III beschränkt. Für einen Abschnitt des Genoms wurde die Lage der Schnittstellen für *Eco*RI durch Spaltung klonierter bzw. aus Agarosegelen isolierter *Hind*III-Fragmente ermittelt.

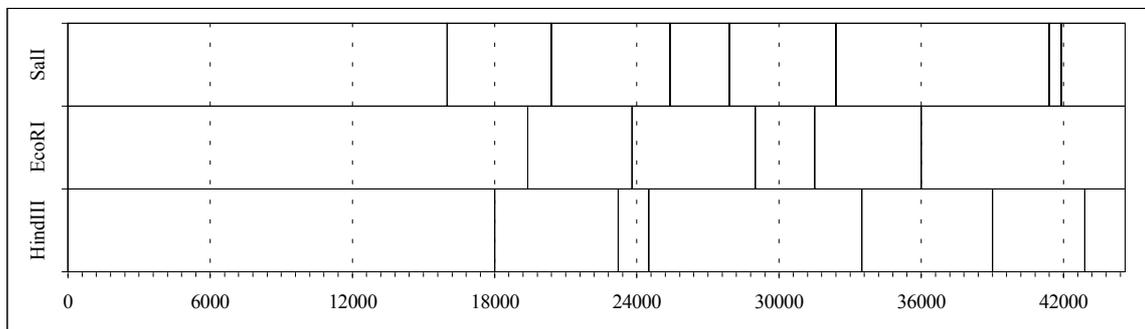


Abb. 21: Restriktionskarte des Phagen A12.

Dargestellt ist die Lage der Schnittstellen von *Hind*III auf dem Genom von A12. Anfang und Ende der Karte wurden willkürlich festgelegt. Die Karte zeigt zudem eindeutig kartierte Schnittstellen der Enzyme *Sal*I und *Eco*RI. Angaben zur genaueren Länge der Fragmente sowie die Positionsangaben der Schnittstellen sind in tabellarischer Form im Anhang aufgelistet.

Das *Eco*RI-Spaltmuster von A12 zeigt eine ca. 8000 bp große unterrepräsentierte Bande (Abbildung 12). Dieser Befund zeigt eindeutig, daß das Genom von A12 nach dem *headful*-Mechanismus verpackt wird und A12 eine *pac site* besitzt.

2.9. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

Bei den Phagen 7D, PS79 und A12 handelt es sich um drei Vertreter verschiedener bisher unbekannter Phagenfamilien, die taxonomisch zur Familie der *Caudovirales* zählen. 7D und PS 79 sind dem temperenten, A12 dem virulenten Vermehrungstyp zuzuordnen. Alle drei Phagen sind in der Lage, verschiedene Abschnitte des Chromosoms ihrer Wirtszelle zu transduzieren, und gehören damit zur Gruppe der generell transduzierenden Bakteriophagen. Für die Phagen 7D und PS79 konnte die Fähigkeit nachgewiesen werden, Plasmide zu transduzieren. 7D- und PS79-lysogene Zellen sind vor weiteren Infektionen mit dem Phagen, den sie als Prophagen tragen, geschützt. Der Prophage 7D vermittelt lysogenen Zellen zudem einen Infektionsschutz vor dem *Salmonella*-Phagen ES18. Im Rahmen der molekulargenetischen Charakterisierung wurden die Genomgrößen ermittelt. Demnach umfaßt das Genom von 7D ca. 42000 bp, von PS79 46200 bp und von A12 44600 bp. Für 7D und PS79 wurden Restriktionskarten mit acht bzw. sieben Restriktionsenzymen für A12 für das Enzym *HindIII* erstellt. Das Genom des Phagen 7D integriert in zirkularisierter Form durch ortsspezifische Rekombination in einem genlosen Bereich des Chromosoms von *Salmonella*. Die Restriktionsanalyse der Genome von PS79 und A12 zeigte eindeutig, daß diese Phagen DNA nach dem *headful*-Mechanismus verpacken. Unter Berücksichtigung Ergebnisse der Transduktionsexperimente ist dieser Verpackungsmechanismus auch für den Phagen 7D zu fordern.

Diskussion

1. Die Rolle der Transduktion beim horizontalen Gentransfer

Der laterale Transfer nichthomologer DNA zwischen Prokaryonten wurde bei seiner Entdeckung zunächst für ein labortechnisches Artefakt gehalten. Heute ist die Aufnahme fremder Gene als effektive Strategie in der Evolution von Bakterien zur schnellen Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und zur Besiedlung neuer Habitate unumstritten. Die molekularen Mechanismen der bakteriellen Gentransfersysteme, Konjugation, Transformation und Transduktion, wurden durch grundlegende Studien der letzten Jahrzehnte weitgehend aufgeklärt. Bisher gibt es jedoch nur wenige Erkenntnisse über das Ausmaß des horizontalen Gentransfers in der Natur. Die rasante Entwicklung der mikrobiellen Genomforschung ermöglicht heute einen Einblick in Umfang und Einfluß von Gentransferprozessen bei der Evolution bakterieller Genome.

Vergleichende DNA-Sequenzanalysen zeigen, daß horizontaler Gentransfer bei Prokaryonten weit verbreitet ist und eine entscheidende Rolle in der mikrobiellen Evolution spielt (Lawrence und Ochman, 1997). DNA-Abschnitte mit atypischem GC-Gehalt oder ungewöhnlichem Kodongebrauch sind Indizien für die Aufnahme von fremder genetischer Information in das Genom einer Bakterienzelle. Weitere Hinweise auf Transferprozesse geben plasmid- oder bakterio-phagenähnliche Elemente im Bakteriengenom sowie signifikante Homologien zwischen Genen verschiedener Organismengruppen.

Trotz einer Fülle publizierter Daten ist derzeit nur wenig über den Gentransfer zwischen Bakterien unter natürlichen Lebensbedingungen bekannt. Studien an Umweltproben mit definierten Donor- und Rezipientenstämmen zeigten grundsätzlich die Möglichkeit des Genaustauschs in der Natur. Zur Klärung ökologisch relevanter Fragen über den Gentransfer in natürlichen mikrobiellen Lebensgemeinschaften sind Ansätze dieser Art jedoch ungeeignet. Die Beantwortung der Fragen, welche Organismen am Gentransfer in der Natur beteiligt sind, mit welcher Häufigkeit der Austausch von genetischem Material erfolgt und welche Rolle biotische und abiotische Faktoren dabei spielen, werden primär durch das Fehlen geeigneter Methoden erschwert.

Hauptproblem der mikrobiellen Ökologie ist der Mangel an geeigneten Kultivierungsbedingungen, zur Vermehrung der Bakterien aus einer Umweltprobe. Nach Untersuchungen von Amann und Kollegen (1995) ist davon auszugehen, daß lediglich 0,1 - 10% der metabolisch aktiven Bakterien verschiedener Habitate isoliert und angereichert werden können. Fortschritte auf diesem Gebiet verspricht der Einsatz molekularbiologischer von der Kultivierbarkeit unabhängiger Methoden (Jaenecke et al., 1996; Strätz et al., 1996).

Neben seiner Bedeutung für die Evolution ist der horizontale Gentransfer insbesondere unter dem Aspekt der biologischen Sicherheitsforschung in das öffentliche Interesse gerückt. Der Einsatz gentechnischer Methoden zur Erzeugung von Organismen mit gezielt veränderten Eigenschaften für Medizin, Biotechnologie, Landwirtschaft und Grundlagenforschung ist begleitet von der kritischen Diskussion in der Öffentlichkeit über die Risiken gentechnisch veränderter Organismen (GVO) und Produkte.

GVOs treten im Freiland mit den dort vorkommenden mikrobiellen Lebensgemeinschaften in Wechselwirkung. Zur Vorhersage und Bewertung der Auswirkungen, die diese Organismen auf die Umwelt haben, ist ein grundsätzliches Verständnis der ökologischen und biochemischen Eigenschaften und Funktionen mikrobieller Ökosysteme notwendig. Dem Transfer genetischen Materials in natürlichen Lebensgemeinschaften kommt dabei besondere Bedeutung zu. Aus unersichtlichen Gründen richtet sich das Hauptaugenmerk der derzeitigen Forschung auf diesem Gebiet auf den Austausch genetischer Information durch Konjugation und Transformation, während die Transduktion nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Gerade der Mechanismus der Transduktion zeichnet sich jedoch durch eine Reihe von Eigenschaften aus, die ihn gegenüber den beiden anderen Mechanismen als besonders leistungsstark erscheinen lassen. Durch die Verpackung bakterieller DNA in Bakteriophagen stellen Viren ein Reservoir exogener genetischer Information dar, das vor schädigenden Umwelteinflüssen geschützt ist. Phagen sind häufig unempfindlich gegenüber Agenzien mit bakteriostatischer oder bakteriozider Wirkung wie Antibiotika, Proteasen, Schwermetallen, vielen organischen Lösungsmitteln sowie Veränderungen der Umweltbedingungen bezüglich des Salzgehalts, pH-Wertes oder der Temperatur.

Die Konsequenz ist, daß durch GVOs eingebrachte Fremdgene, die in Phagenköpfe verpackt werden, in einem Habitat unter Umständen länger existent sind als der Organismus, dem sie entstammen. Solange kein geeigneter Wirtsorganismus für die Infektion des transduzierenden Phagenpartikels zur Verfügung steht, bleibt ihre Existenz verborgen. Bakterienviren sind jedoch häufig in der Lage, lange Zeiträume unter ungünstigen Bedingungen zu überdauern, ohne ihre Infektivität einzubüßen. Sie können daher als genetische Container betrachtet werden, deren Zusammentreffen mit einem geeigneten Wirt die schnelle Ausbreitung fremder Gene ermöglicht.

Eine Reihe von Faktoren hat dazu geführt, daß Transduktion bis heute sowohl hinsichtlich der Evolution der Prokaryonten als auch hinsichtlich der Sicherheitsdiskussion nur eine geringe Rolle spielt:

Das Wirtsspektrum

Phagen besitzen spezielle Strukturkomponenten zur Anheftung an und zur Injektion ihres genetischen Materials in die Wirtszelle. Ihr Wirtsbereich ist damit durch definierte molekulare Interaktionen zwischen dem Phagen und der Oberfläche der Bakterienzelle

determiniert. Dieser Wirtsbereich ist allerdings dynamisch. Einerseits kann eine Bakterienzelle durch Mutation resistent gegen eine Phageninfektion werden, andererseits kann sich auch das Wirtsspektrum eines Phagen verändern. Ursache hierfür sind Veränderungen der Schwanzfasergene eines Bakteriophagen durch Punktmutationen, Austausch der Gene durch Rekombination mit dem Genom eines anderen Phagen oder die alternative Nutzung verschiedener Genkassetten (Haggård-Ljungquist et al., 1992). Diese Mechanismen ermöglichen es z.B. dem Phagen P2, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Klebsiella* und *Yersinia* zu infizieren.

Restriktions-Modifikationssysteme

Generell geht man davon aus, daß Restriktions-Modifikationssysteme Bakterien vor der Infektion mit fremder DNA schützen. Dieser Schutz ist aber nicht absolut. Entsprechend modifizierte DNA wird nicht als fremd erkannt. Viele Phagen besitzen Mechanismen wie die Vermeidung oder Maskierung potentieller Restriktionsschnittstellen oder die Inaktivierung der Restriktions-Modifikations-Enzyme, um diesen Schutzsystemen zu entgehen (King und Murray, 1994). Restriktionsenzyme können durch Umweltfaktoren wie Hitze (Rolfe und Holloway, 1966) oder ultraviolette Strahlung (Walker, 1984) inaktiviert werden. Überdies unterscheidet sich das Schicksal der Phagen-DNA erheblich von dem durch Transduktion übertragener bakterieller DNA. Während die DNA des Phagen durch Restriktion eliminiert wird, können transferierte Fragmente des Bakterienchromosoms durch homologe Rekombination mit dem Wirtszellgenom gerettet werden. Wie die Analyse von *E. coli*-Transduktanten ergab, beeinflußt das Restriktions-Modifikationssystem zwar den Einbau von DNA-Fragmenten in das Rezipientenchromosom, verhindert ihn jedoch nicht (McKane und Milkman, 1995). Die entstehenden genomischen Mosaikmuster stimmen mit den beobachteten Mustern in *trp*-Operons von *E. coli*-Naturisolaten überein. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß Schutz vor und die Aufnahme von Fremd-DNA ein fein abgestimmtes System darstellen.

Immunität lysogener Bakterien

Die Tatsache, daß lysogene Zellen durch repressorvermittelte Immunität die Vermehrung superinfizierender homoimmuner Phagen verhindern, wird häufig als Einschränkung für den DNA-Transfer gewertet. Fakt ist, daß diese Infektionsbarriere zwar die Vermehrung eines superinfizierenden Phagen, nicht jedoch die Injektion der von ihm transportierten DNA in die Empfängerzelle verhindert. Da generell transduzierende Phagenpartikel in der Regel ausschließlich bakterielle DNA enthalten, hat repressorvermittelte Immunität keinen negativen Einfluß auf den DNA-Transfer. Vielmehr konnte gezeigt werden, daß lysogene Zellen als Empfängerstämme besonders gut geeignet sind, da sie vor der Infektion mit intakten Phagen und damit vor der Lyse geschützt sind (Saye et al., 1987).

Entscheidend für die Einschätzung, daß der Anteil der Transduktion beim horizontalen Gentransfer eine vernachlässigbare Größe darstellt, ist wohl, daß derzeit nur wenige transduzierende Bakteriophagen bei gut untersuchten bakteriellen Systemen bekannt sind. Dies hat zu dem Eindruck geführt, daß solche Phagen in der Natur selten vorkommen.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, setzt der traditionelle Nachweis eines Bakteriophagen das Vorhandensein sensitiver Indikatorstämme voraus (vgl. dazu Einleitung Punkt 2., Seite 19). Zur Untersuchung der Transduktionsfähigkeit eines Phagen sind zudem sensitive Empfänger- und Spenderstämme erforderlich, die sich in selektierbaren Markern unterscheiden. Dadurch sind die Nachweismöglichkeiten extrem eingeschränkt und machen die generelle Suche nach transduzierenden Phagen in natürlichen Habitaten praktisch unmöglich.

Hinweise darauf, welches Transferpotential dieser Mechanismus haben kann, lieferten Untersuchungen von Naturisolaten von *Salmonella typhimurium* unter Einsatz traditioneller Methoden (Schicklmaier und Schmieger, 1995). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten einerseits, daß zumindest bei der Spezies *Salmonella typhimurium* Lysogenie den Normalzustand in der Natur darstellt, und andererseits, daß über 98% der prüfaren Phagen generell transduzieren. Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Anteils lysogener Stämme bei Naturisolaten brachten Untersuchungen an *Escherichia coli* (Moser, 1997), *Pseudomonas aeruginosa* (Ogunseitán et al., 1992) und *Corynebacterium* (Moreau et al., 1995). Es ist anzunehmen, daß transduzierende Phagen entgegen der vorherrschenden Meinung in der Natur weit verbreitet sind, ihre Existenz jedoch unter dem Einsatz traditioneller Methoden nicht nachweisbar ist.

Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung eines indikatorunabhängigen Nachweissystems zur Detektion transduzierender Bakteriophagen für die Untersuchung natürlicher Habitate.

2. Der indikatorunabhängige Nachweis generell transduzierender Bakteriophagen

2.1. Das Prinzip

Maßgebliches Ziel dieses Teil der Arbeit war die Etablierung eines molekulargenetischen Ansatzes zum Nachweis transduzierender Phagen in der Natur. Der Nachweis dieser Bakteriophagen war bisher immer der Selektion durch die zu Verfügung stehenden kultivierbaren Indikator-, Spender- und Empfängerstämme unterworfen. Aus einer Reihe von Studien ist bekannt, daß Bakteriophagen in erstaunlich großen Mengen in aquatischen Ökosystemen vorkommen (Oren et al., 1997; Paul et al., 1991b; Bergh et al., 1989). Bakterien, die Wirte der Phagen, sind überall dort zu finden, wo physika-

lische und chemische Bindungen prinzipiell die Existenz von Leben erlauben. Es darf daher angenommen werden, daß Bakteriophagen auch in allen anderen Lebensräumen Teil der mikrobiellen Lebensgemeinschaft sind.

Lysate generell transduzierender Phagen enthalten Partikel, die nicht mit Phagen-DNA sondern mit DNA der Wirtszelle gefüllt sind. In ihrer Gesamtheit repräsentieren diese allgemein transduzierenden Partikel das vollständige Genom ihrer Wirtszellen.

Die im Rahmen der Arbeit etablierte Methode basiert auf dem sogenannten rRNA-Zyklus (Amann et al., 1995). Die direkte *in vitro*-Amplifikation ribosomaler DNA aus komplexem Probenmaterial, gefolgt von Klonierung und vergleichender Sequenzanalyse, stellt den derzeit meistgenutzten und aussagekräftigsten Ansatz zur Struktur- und Funktionsanalyse natürlicher mikrobieller Lebensgemeinschaften dar. Sie ermöglicht den Rückschluß auf die Präsenz von Organismen in einer Umweltprobe ohne die Notwendigkeit der Kultivierung oder Kultivierbarkeit.

Bakterielle 16S rDNA konnte in Präparationen aus Phagenpartikeln freigesetzter DNA nachgewiesen werden und ermöglichte die retrospektive Identifizierung der Wirte dieser Phagen. Den kritischen Punkt der Nachweismethode stellte eine mögliche Kontamination der Proben mit freier bakterieller DNA dar, die zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Um dies auszuschließen, wurden zwei unabhängige Kontrollsysteme eingesetzt. Der Abbau nicht in Phagenpartikel verpackter DNA sowie die Freiheit der nach dem Aufschluß der Phagen eingesetzten Agenzien wurde dokumentiert. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Kontrollsysteme konnten DNA-Kontaminationen, und damit eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch falsche Amplifikationsprodukte, ausgeschlossen werden.

2.2. Was macht rRNA-Gene so speziell?

Ribosomen sind Ribonukleoproteinpartikel, die als Orte der Proteinbiosynthese bei allen Organismen eine zentrale Rolle spielen. Die 70S-Ribosomen der Prokaryonten sind aus der kleinen 30S-Untereinheit, die aus der 16S rRNA (ca. 1540 Nukleotide) und 21 ribosomalen Proteinen besteht, und der großen 50S-Untereinheit, die sich aus der 23S rRNA, der 5S rRNA (ca. 2900 bzw. 120 Nukleotide) und 32 Proteinen zusammensetzt, aufgebaut. Die Gene der ribosomalen RNAs sind bei den meisten Prokaryonten in gleicher Anordnung zu einem Operon zusammengefaßt. Diese Genkopplung ermöglicht die gleichmäßige Expression aller rRNA-Komponenten eines Ribosoms (Schmidt, 1998). rRNA-Moleküle setzen sich aus konservierten und variablen Regionen zusammen. Einige variable Segmente verändern ihre Sequenz sehr langsam und ermöglichen die Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume entfernt verwandter taxonomischer Gruppen. Andere zeigen genügend Variabilität, um verschiedene Spezies innerhalb einer Gattung zu unterscheiden. Die große Zahl unabhängig voneinander mutierender

Nukleotide der 16S und 23S rDNA liefern ausreichend Daten für zuverlässige Rückschlüsse auf phylogenetische Beziehungen.

Von besonderer Bedeutung für den Nachweis transduzierender Phagenpartikel war, daß rDNA-Sequenzen niemals natürlicher Bestandteil des Phagengenoms sind. Einen praktischen Grund für die Wahl der 16S rDNA-Sequenz stellte die Tatsache dar, daß heute in Datenbanken mehr als 22000 Sequenzen für die vergleichende Analyse und damit für die retrospektive Identifizierung der Wirte transduzierender Phagen zur Verfügung stehen.

2.3. Der methodische Ansatz

Aus früheren Studien über generell transduzierende Phagen war bekannt, daß etwa 2% der Partikel eines Wildtyplysates bei P22 (Ebel-Tsipis et al., 1972) bzw 0,3% bei P1 (Lennox, 1955) bakterielle DNA ihrer Wirtszelle enthalten. Es mußte daher davon ausgegangen werden, daß der Anteil 16S rDNA-transduzierender Partikel bei den Phagen, die aus Umweltproben isoliert werden, weit unter einem Prozent liegt. Um 16S rDNA-Sequenzen aus dem komplexen Gemisch in Phagenköpfe verpackter DNA zu isolieren, schien die Amplifikation der Zielsequenzen durch PCR, gefolgt von deren Klonierung, die geeignete Methode.

Bei der Wahl der PCR-Primer wurde insbesondere darauf geachtet, daß sie die Amplifikation der 16S rDNA eines Großteils der in den untersuchten Habitaten vorkommenden Bakteriengattungen in nahezu voller Länge ermöglichen (Weisburg et al., 1991). Dies hat zwei Vorteile. Zum einen bieten die erhaltenen Sequenzdaten eines Ansatzes einen Überblick über die Diversität der Wirte transduzierender Phagen in der natürlichen mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Zum anderen ermöglicht die Analyse der Sequenzen den Ausschluß chimärer Amplifikationsprodukte. Letzteres ist insofern von Bedeutung, als die Co-Amplifikation der 16S rRNA-Gene verschiedener Spezies in einem einzigen Reaktionsansatz zur Bildung chimärer oder rekombinanter Moleküle führt (Kopczynski et al., 1994; Liesack et al., 1991). Diese PCR-Produkte entstehen durch vorzeitige Termination der Polymerase. Die dadurch gebildeten DNA-Fragmente können in der nächsten Amplifikationsrunde als Primer an einer "falschen" DNA-Vorlage dienen (*jumping* PCR). In der vorliegenden Arbeit ergab sich (ohne Einbeziehung der Sequenzdaten aus dem Sippenauer Moor) im Durchschnitt ein Anteil von 20% Chimären.

Verschiedene Studien weisen darauf hin, daß die Tendenz zur Chimärenbildung in Proben mit großer DNA-Variabilität besonders erhöht ist (Godon et al., 1997; Wang und Wang, 1996). Dieses Phänomen konnte insofern beobachtet werden, als in der Probe Bio II uz, in der ausschließlich Sequenzen von *Polynucleobacter necessarius* amplifiziert und kloniert werden konnten, keine Chimären identifiziert wurden. Alle an-

deren Proben, die bezüglich der identifizierbaren 16S rDNA-Sequenzen variierten, zeigten dagegen Chimären mit Anteilen zwischen 15% und 35%. Trotz dieser Einschränkung ermöglicht der in diesem Fall gewählte Ansatz die Zuordnung von vier Fünfteln aller analysierten Sequenzen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß auch die Wahl der PCR-Primer, die in Hinsicht auf die Amplifikation der 16S rRNA-Gene eines breiten Spektrums der mikrobiellen Lebensgemeinschaft der Habitate vorgenommen wurde, den Anteil der Chimären erhöht.

Die hier vorgestellte Methode kann als Prototyp des indikatorunabhängigen Nachweises transduzierender Phagen für prinzipiell alle Bakterienarten gelten. Unter Einsatz verschiedener 16S rDNA-Primerpaare ist der Suche nach transduzierenden Partikeln in natürlichen Habitaten nahezu keine Grenze gesetzt. Dieser Ansatz erlaubt sowohl die Überprüfung einer Probe auf das Vorkommen transduzierender Phagen mit unterschiedlichen Wirtsspezifitäten als auch die gezielte Suche nach am DNA-Transfer beteiligten Phagen spezieller Vertreter der Prokaryonten. Ebenfalls denkbar wäre ein Einsatz der Methode zur Dokumentation der Ausbreitung von Fremdgenen bei der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen in einer Bakterienpopulation durch transduzierende Partikel mit speziellen Primern.

Eine absolute Notwendigkeit beim Einsatz dieser Methode in Kombination mit anderen PCR-Primern stellt die Überprüfung und gegebenenfalls die Anpassung des Kontrollsystems dar, das neben der Dokumentation des Abbaus freier DNA den Nachweis ermöglicht, daß verwendete Materialien und Agenzien keine störenden DNA-Kontaminationen enthalten. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür DNA-Präparationen des allgemein transduzierenden Phagen Lambda eingesetzt. Dadurch konnte gezeigt werden, daß rekombinant in *E. coli* hergestellte *Taq*-Polymerasen wegen der Verunreinigung mit genomischer DNA für diese spezielle Anwendung ungeeignet sind. Es darf angenommen werden, daß dies auf alle DNA-Polymerasen zutrifft, unabhängig davon, ob sie nativ oder rekombinant hergestellt wurden. Im vorliegenden Fall konnte dieses Problem durch Verwendung einer nativen *Taq*-Polymerase gelöst werden. Unter dem Einsatz *Archaea*-spezifischer Primer könnten eventuell vorhandene Spuren genomischer DNA von *Thermus aquaticus* jedoch zu falsch positiven Amplifikationsprodukten führen. In diesem Fall könnte der Einsatz einer rekombinant hergestellten *Taq*-Polymerase das Problem beheben.

Nicht unerwähnt bleiben sollte, daß dieser Ansatz auch die Möglichkeit bietet, Viren höherer Organismen aufzuspüren, die in der Lage sind, genetisches Material ihrer Wirte zu transportieren. Voraussetzung dafür wäre wiederum die Auswahl entsprechender Primer. Da viele zelluläre Onkogene auch in einer veränderten viralen Form bekannt sind, nimmt man an, daß Retroviren Teile des jeweiligen Onkogens in ihr Genom integriert haben. Dieser Mechanismus entspricht der speziellen Transduktion bei Bakteriophagen. Virusinduzierte Tumoren sind derzeit bei Hühnern, Nagetieren und Katzen

bekannt. Es muß angenommen werden, daß die durch die Entstehung von Tumoren sichtbaren Transferereignisse nur die Spitze des Eisberges darstellen. Da Retroviren nicht ortsspezifisch in das Genom ihrer Wirtszelle integrieren, kann angenommen werden, daß auch andere Wirtsgene transferiert werden. Transferereignisse, die keine verheerenden Folgen für den Wirt haben, bleiben jedoch unentdeckt. Zudem besteht die Möglichkeit, daß auch andere Viren als Retroviren in Folge einer fehlerhaften DNA-Verpackung zur generellen Transduktion fähig sind.

2.4. Bewertung der identifizierten Wirte transduzierender Bakteriophagen

Aus den Umweltproben konnten insgesamt 26 verschiedene Wirte transduzierender Bakteriophagen identifiziert werden. Eine Überprüfung erbrachte, daß bisher für keines dieser Bakterien transduzierende Phagen beschrieben sind. Alle identifizierten Organismen stellen typische Vertreter der mikrobiellen Lebensgemeinschaft der jeweiligen Habitate dar. Die Tatsache, daß es sich dabei ausschließlich um Gram-negative Bakterien handelt, entspricht, zumindest was die Proben aus Kläranlagen betrifft, der Beobachtung, daß bei Untersuchungen von Klärschlämmen ausschließlich Gram-negative gefunden wurden oder diese zumindest stark dominierten (Bond et al., 1995; Hiraishi, 1988). Im Fall des Heuaufgusses kann dagegen angenommen werden, daß auch Gram-positive Bakterien wie *Bacillus subtilis* enthalten waren. Wie bekannt ist, spielt Transduktion vor allem bei klinisch relevanten Gram-positiven Krankheitserregern eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Resistenzplasmiden (Klaus et al., 1992).

Eine Selektion gegen Gram-positive durch die verwendeten PCR-Primer konnte ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung wurden PCR-Reaktionen mit genomischer DNA von *Bacillus cereus* durchgeführt, bei denen eindeutig 16S rDNA-Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden konnten. Ursache für dieses Ergebnis könnte die Anzahl analysierter klonierter Sequenzen oder eine Diskriminierung der Sequenzen bei der Amplifikation oder Klonierung sein. Weitere Faktoren, die die Häufigkeit des Auffindens bestimmter Wirte beeinflussen, sind der Anteil, mit dem diese in einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft vorkommen, der Anteil an Lysogenen in einer Probe, die Anzahl der rRNA-Operons der verschiedenen Bakterien und nicht zuletzt die Freisetzungsrate der Phagen.

2.5. Bewertung der Sequenzdaten

Die retrospektive Identifizierung der Wirte generell transduzierender Bakteriophagen basiert auf der Suche nach homologen Sequenzen in der EMBL-Datenbank zu aus Phagenpartikeln isolierter 16S rDNA. Es stellte sich die Frage, inwieweit die festgestellten

Homologien Rückschlüsse auf die Wirtsorganismen zulassen. Allgemein sind ribosomale RNAs ein essentieller struktureller und funktioneller Bestandteil der Ribosomen. Voraussetzung für ihre Funktion ist die Faltung in festgelegte Strukturen. Damit stehen die Gene der ribosomalen RNAs unter einem hohen Selektionsdruck. Die Sekundärstruktur der 16S rRNA ist durch drei ausgedehnte Doppelhelixbereiche in eine kleine und drei große strukturelle Domänen unterteilt (vgl. Abbildung 2). Diese strukturelle Homologie aller 16S rRNA-Moleküle spiegelt sich im hohen Konservierungsgrad bestimmter Bereiche der Primärstruktur wider. Man nimmt an, daß die Homologie dieser Gene über alle Prokaryonten bei ca. 60% liegt. Ein Sequenzvergleich zeigte, daß die 16S rDNA von *E. coli* mit der eines nah verwandten Organismus wie *Klebsiella pneumoniae* zu 96,4%, mit der des entfernt verwandten *Thermotoga marina* zu 73,9% übereinstimmt (Schleifer, persönliche Mitteilung).

Abbildung 22 zeigt eine Übersicht über die ermittelten Homologiegrade zwischen den klonierten Sequenzen der Umweltproben Bio I, Bio II, AW1, AW2 und Heu und den Sequenzen der Datenbank.

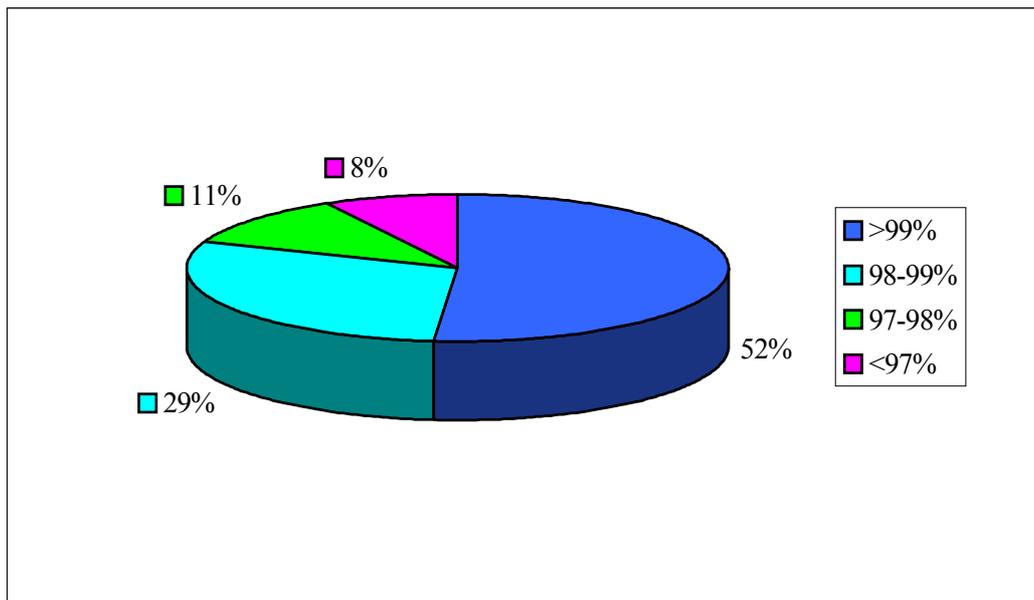


Abb. 22: Ermittelte Homologiegrade zwischen klonierten 16S rDNA-Sequenzen von aus Phagenpartikeln isolierter DNA und Sequenzen der Datenbank. Dargestellt sind die zusammengefaßten Ergebnisse der Identifizierung der Wirtsorganismen der Umweltproben Bio I, Bio II, AW 1, AW 2 und Heu.

91% der Sequenzen zeigen eine Übereinstimmung mit den Sequenzen der Datenbank von 97,0 bis 99,8%. Bei neun Sequenzen wurden mit den zugeordneten Datenbanksequenzen Übereinstimmungen zwischen 93% und 97% ermittelt. Als Ursache für die ermittelten Homologiedifferenzen kommen folgende Erklärungen in Betracht: Bereits verschiedene Isolate eines Bakterienstammes können sich erheblich in ihrer 16S rDNA-

Sequenz unterscheiden. Ein Vergleich der heute in der Datenbank verfügbaren Sequenzen von *Aeromonas hydrophilia* zeigte, daß diese Unterschiede von bis zu 6% aufweisen. Die betreffende isolierte Sequenz stimmt zu 93% mit der zugeordneten *Aeromonas hydrophilia*-Sequenz der Datenbank überein. Es ist anzunehmen, daß innerhalb mancher Bakterienstämmen durchaus größere Sequenzabweichungen vorkommen.

Wenig Informationen gibt es derzeit über die Divergenz multipler rRNA-Gene der Bakterien. Die meisten Prokaryonten besitzen mehrere rRNA-Operons. Deren Anzahl schwankt, soweit bekannt, bei *Archaea* (Ree und Zimmermann, 1990) zwischen einer und vier Kopien, bei *Bacteria* zwischen einer und 13 Kopien (Sanz et al., 1988). Bei *Panbacillus* wurden sogar 14 16S rRNA-Gene identifiziert, die sich in 1-2% ihrer Sequenz unterscheiden. Bei *Haloarco* wurde ein Unterschied von 4,5% zwischen den 16S rDNA-Sequenzen verschiedener Operons festgestellt (Schleifer, persönliche Mitteilung). Es liegt also durchaus im Bereich des Möglichen, daß die Unterschiede der Klonsequenzen zu denen der identifizierten Wirtsorganismen auf Sequenzheterogenitäten multipler Gene zurückzuführen sind.

Unterschiede konnten auch in den aus Umweltproben amplifizierten 16S rDNA-Sequenzen festgestellt werden, die aufgrund der Datenbanksuche demselben Wirtsorganismus (Sequenztyp) zugeordnet wurden. Abbildung 23 zeigt stellvertretend den Vergleich eines Ausschnitts von 40 Basenpaaren der 12 amplifizierten Sequenzen des Sequenztyps *Aeromonas hydrophilia* Stamm T20.

Umweltprobe	<i>Aeromonas hydrophilia</i> Stamm T20 16S rDNA-Sequenz: bp 468 - 508
Bio I uz	AGGAGGAAAGGTTGATACCTAATACGTATCAGCTGTGACG
Bio I uz	AGGAGGAAAGGTTGATACCTAATACGTATCAGCTGTGACG
Bio I uz	AGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAACTGTGACG
Bio I uz	AGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAACTGTGACG
Bio I s	AGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTACCAACTGTGACG
Bio I s	AGGAGGAAAGGTTGGCGCCTAATACGTGTCAACTGTGACG
AW 1	AGGAGGAAAGGTTGATGCCTAATACGTATCAACTGTGACG

Abb. 23: Vergleich eines Ausschnitts von 40 Basenpaaren der 12 amplifizierten Sequenzen des Sequenztyps *Aeromonas hydrophilia* Stamm T20. Farblich hervorgehoben sind die von den am häufigsten amplifizierten Sequenzen abweichenden Basen.

Sequenzheterogenitäten konnten in diesem Fall bei Sequenzen aus den Umweltproben Bio I uz, Bio I s und AW 1, aber auch zwischen den Sequenzen, die aus den Proben Bio

I uz bzw. Bio I s stammten, festgestellt werden. Diese Heterogenitäten können auf Sequenzunterschiede der 16S rDNA verschiedener Organismen des selben Sequenztyps beruhen. Abweichungen aus einer Probe isolierter Sequenzen könnten jedoch auch mehrerer rRNA-Operons eines Organismus repräsentieren.

Trotz der Fülle an verfügbaren Sequenzinformationen ist die 16S rDNA-Datenbank weit davon entfernt, vollständig zu sein. Insofern kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß die Sequenzen der eigentlichen Wirtsorganismen nicht verfügbar sind. Dies betrifft insbesondere die Klonsequenzen der Proben des Sippenauer Moors. Aus Phagenpartikeln isolierte 16S rDNA-Sequenzen zeigen keine ausgedehnte Sequenzübereinstimmung mit 16S rDNA-Sequenzen in der EMBL-Datenbank. Die Untersuchung dieses Habitats beschränkt sich heute auf *Archaea* und auf wenige Bakterien, die mit diesen Konsortien bilden. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß die transduzierten 16S rDNA-Sequenzen von bisher unbekanntem Bakterien stammen.

Das Sippenauer Moor (Regensburg, Bayern), ein Areal von ca. 90000 m², besitzt rund 20 Quellen, von denen einige Sulfid als charakteristische chemische Komponente aufweisen. Der Bach, aus dem die Probe entnommen wurde, zeigt über das ganze Jahr eine nahezu konstante Temperatur von 10°C (±2°C) und einen konstanten pH-Wert von 6,5. Die chemische Analyse des Wassers zeigte eine Sulfidkonzentration von 1,2 mg/Liter, eine geringe Sauerstoffkonzentration von 1,4 mg/Liter und einen geringen Salzgehalt (Rudolph et al., 2001). Vergleicht man die Gegebenheiten des Sippenauer Moors mit den Charakteristika der Biotope, aus denen die 16S rDNA-Sequenzen der EMBL-Datenbank mit den größten Übereinstimmungen isoliert wurden, so zeigt sich, daß diese sich durch ein sauerstoffarmes bzw. sauerstofffreies, pH-neutrales bis leicht saures Milieu auszeichnen. Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die Habitate der Organismen, die die größten Homologien zu den aus Bakteriophagen isolierten 16S rDNA-Sequenzen aufweisen.

Organismus	Habitat
nichtidentifiziertes Bakterium B7-1 (Li et al., 1999)	Tiefseesediment
nichtkultiviertes grünes Nicht-Schwefelbakterium (Urakawa et al., 1999)	marines Sediment
nichtkultiviertes Bakterium BOL-130 (Dojka et al., 2000)	marines Sediment
nichtidentifizierte Pansenbakterien: RF8, RF39 (Nagamine et al., 1999)	Rinderpansen
nichtkultiviertes epsilon Proteobakterium 1040 (Watanabe et al., 2000)	petroleumkontaminiertes Grundwasser

Tab. 12: Aufgelistet sind die Organismen mit der größten Homologie zu aus Phagenpartikeln isolierten 16S rDNA-Sequenzen des Sippenauer Moors (Regensburg) sowie die Habitate dieser Organismen.

Informationen über den Stoffwechsel dieser Organismen liegen in keinem Fall vor. Aufgrund der Umweltbedingungen ist jedoch davon auszugehen, daß es sich um obligat oder fakultativ anaerobe Bakterien handelt, die zur Energiegewinnung anstelle molekularen Sauerstoffs andere anorganische Substanzen wie SO_4^{2-} , S^0 oder NO_3^- als terminalen Elektronenakzeptor nutzen. Die Zuordnung der Wirte transduzierender Phagen aus dem Sippenauer Moor erlaubt zwar keine Identifizierung der Wirtsorganismen, spiegelt jedoch die Milieubedingungen dieses Habitats wider. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die isolierten 16S rDNA-Sequenzen typische, bisher nicht beschriebene, vielleicht auch nicht kultivierbare Vertreter dieses Biotops repräsentieren.

2.6. Die Grenzen des Systems und Möglichkeiten der Weiterentwicklung

In der anfänglichen Euphorie wurde die Aussagekraft des rRNA-Zyklus, insbesondere in Hinsicht auf quantitative Aussagen über die Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften, häufig überschätzt. Vor allem zwei Probleme sind in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Diese betreffen auf der einen Seite die Spezifität der Amplifikationsprimer, auf der anderen Seite die Vollständigkeit der rDNA-Genbanken hinsichtlich des im Probenmaterial vorhandenen Artenspektrums.

Die Qualität der Primer, die zur Amplifikation eines breiten Spektrums von 16S rDNA-Sequenzen eingesetzt werden sollen, hängt in erster Linie von der Verfügbarkeit umfassender rDNA-Sequenzdatenbanken ab. Diese Datenbanken sind allgemein zugänglich und werden ständig aktualisiert. Trotzdem wäre eine Überprüfung der Eignung solcher allein aus Sequenzdaten abgeleiteter Primer wünschenswert, besonders dann, wenn diese auch die Detektion derzeit nicht kultivierbarer Organismen ermöglichen sollen. Umfangreiche Evaluierungstests sind aber gerade in diesen Fällen, in denen keine Referenzorganismen oder -nukleinsäuren zur Verfügung stehen, nicht möglich. Ferner ist zu berücksichtigen, daß Umweltproben Organismen enthalten, deren 16S rDNA-Sequenzen unbekannt sind. Unterscheiden sich diese Sequenzen im Bereich der Primerbindungsstellen, können sie nicht amplifiziert werden und entziehen sich somit dem Nachweis.

Die Vollständigkeit einer 16S rDNA-Genbank bezüglich des vorhandenen mikrobiellen Spektrums der Arten in einer Probe hängt außer von den eingesetzten Primern von einer Reihe weiterer Faktoren ab. Besonders wichtig ist dabei die Zugänglichkeit und Amplifizierbarkeit der DNA einer Umweltprobe. Diese wird vor allem von der Vorbereitung des Probenmaterials beeinflusst. Im vorliegenden Fall machte die geringe Konzentration transduzierender Partikel in den Proben eine Anreicherung der Phagen notwendig. Unter Verwendung einer Reihe von Phagen der Laborkollektion wurden in Vorversuchen verschiedene positiv und negativ geladene Säulenmaterialien und Filter zur Konzentrierung von Bakterienviren getestet. Alle Versuche zeigten, daß damit nur

selektive Anreicherungen einzelner der getesteten Phagen möglich sind. Die besten Ergebnisse konnten mit HighQ-Säulen erreicht werden, obwohl auch in diesem Fall nicht alle Phagen der Testkollektion gleich gut konzentriert werden konnten. Als die am wenigsten selektive Methode erwies sich im Rahmen der Vorversuche die Anreicherung von Phagen durch Zentrifugation.

Wie ein Vergleich der identifizierten Wirtsorganismen in den Proben Bio II uz und Bio II s (vgl. Tabelle 2, Seite 60) zeigt, erweitert der Einsatz verschiedener Anreicherungsverfahren das Spektrum identifizierbarer Sequenztypen aus einer Umweltprobe. Im Fall der durch Ultrazentrifugation konzentrierten Probe (Bio II uz) konnte lediglich ein Wirtsorganismus, *Polynucleobacter necessarius*, identifiziert werden. In der über eine HighQ-Säule angereicherten Probe (Bio II s) gelang es zusätzlich 16S rDNA-Sequenzen von fünf weiteren Organismen zu amplifizieren. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß Phagen mit dieser Wirtsspezifität bei der Säulenreicherung dezimiert, jedoch nicht vollständig eliminiert werden, so daß dadurch die Wahrscheinlichkeit für die Amplifikation und Klonierung anderer Sequenztypen erhöht wird. Möglich wäre auch, daß Phagen der anderen Wirtsspezifitäten eine geringere Masse haben und daher bei der Zentrifugation schlechter sedimentieren. Für die Untersuchung eines Habitats empfiehlt es sich daher, verschiedene Anreicherungstechniken einzusetzen, um möglichst umfassende Informationen über das Vorkommen transduzierender Bakteriophagen zu erhalten.

Die Forderung, sämtliche freie DNA vor der Öffnung der Phagenpartikel zu entfernen, machte zudem die Abtrennung grober Verunreinigungen sowie aller Bakterien der Umweltproben vor der DNase-Behandlung notwendig. Es ist bekannt, daß nicht nur DNA, sondern auch Bakteriophagen an Mineralien und andere Partikel adsorbieren (Lipson und Stotzky, 1987; Stotzky, 1986). Daher muß angenommen werden, daß durch die zur Entfernung grober Verunreinigungen notwendige Zentrifugation sowie die anschließende Sterilfiltration der Proben ein Teil der Phagen und damit, die in diesen enthaltenen, 16S rDNA-Sequenzen verlorengehen.

Die Zusammensetzung der 16S rDNA-Datenbank eines Biotops wird zudem dadurch beeinflußt, daß bestimmte Sequenzen in unterschiedlichem Maß bei der PCR-Amplifikation (Hansen et al., 1998; Liu et al., 1997) sowie bei der Klonierung, bedingt durch die Wahl des Vektors (Rainey et al., 1994), diskriminiert werden können. Dies führt dazu, daß manche Sequenzen in der 16S rDNA-Bank eines Biotops unterrepräsentiert oder gar nicht vorhanden sind. Die Effizienz der PCR-Amplifikation hängt selbstverständlich auch von experimentellen Parametern und der Konzentration der Zielnukleinsäuren ab. Im vorliegenden Fall wurde die PCR-Reaktion hinsichtlich der Magnesiumchlorid-Konzentration und der Temperatur zur Primeranlagerung optimiert. Die Zusammensetzung und damit die Menge und Art potentieller Zielsequenzen von aus Umweltproben isolierter DNA war dagegen unbekannt. Unter diesen Voraussetzungen ist es zu

empfehlen, die in Phagenpartikeln einer Umweltprobe enthaltenen 16S rDNA-Sequenzen in parallelen PCR-Reaktionen unter dem Einsatz geringer Template-DNA-Mengen zu amplifizieren und zu klonieren. Störende Einflüsse durch zu hohe Diversität der Proben, wie etwa die Bildung von Chimären, könnten durch diese Vorgehensweise minimiert werden. Zur Abdeckung eines großen Spektrums verschiedener Sequenztypen erfordert diese Vorgehensweise einen erheblichen Mehraufwand an Klonierungs- und Sequenzierungsarbeit.

Eine Erhöhung der Auflösung des Sequenzspektrums wäre durch die Erweiterung der hier vorgestellten Methode durch Ansätze vorstellbar, die nicht auf Sequenzinformationen der 16S rDNA-Fragmente angewiesen sind. Im Zusammenhang mit der Aufklärung der Diversität bakterieller Lebensgemeinschaften haben sich in den letzten Jahren drei molekulargenetische Techniken bewährt. Die "Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese" (DGGE) bzw. "Temperaturgradienten-Gelelektrophorese" (TGGE), die Bestimmung des "Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus" (ARDRA) sowie die Analyse des "DNA-Einzelstrang-Konformationspolymorphismus" (SSCP) werden derzeit zur Identifizierung durch PCR-Amplifikation isolierter 16S rRNA-Gene eingesetzt. Zu den Vorteilen dieser Methoden zählt neben der Zeit- und Kostenersparnis die Tatsache, daß auf die Klonierung und Sequenzierung der Amplifikationsprodukte verzichtet werden kann. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß diese Methoden auf die Verfügbarkeit von Referenzorganismen oder -nukleinsäuren angewiesen sind, was Aussagen über das Vorkommen transduzierender Bakteriophagen auf verfügbare Referenzen beschränkt und somit erneut zu einer Selektion führt, die gerade vermieden werden sollte.

3. Die Charakterisierung der *Salmonella*-Phagen 7D, PS79 und A12

Die eine Vielzahl von *Salmonella*-Phagen umfassende Laborkollektion stellt eine ideale Basis für die Erweiterung der Kenntnisse über die Diversität von Bakterienviren dar. Durch DNA-Hybridisierungsexperimente konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Phagen 7D, PS79 und A12 um drei bisher unbekannte Familien von Bakterienviren handelt. Die mikrobiologische und molekulargenetische Charakterisierung erbrachte interessante Informationen über Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser Phagen untereinander bzw. zu anderen gut untersuchten Vertretern der Bakterienviren.

Alle drei Phagen bildeten auf den zur Verfügung stehenden Indikatoren im Vergleich zu P22 kleine Plaques. Wie die Untersuchungen zur Kinetik der Phagenvermehrung zeigten, läßt sich dieser Befund bei 7D, der auf dem Indikator DB21 vermehrt wurde, auf die Lyse eines nur geringen Anteils der infizierten Wirtszellen zurückführen. Im Fall von PS79 liegt die Ursache der kleinen Lyseareale in der langen Latenzzeit begründet, die durch die geringe Affinität des Phagen zu den Zellen des Wirtes LB5000 verursacht

wird. A12-infizierte DB21-Zellen setzen nur eine geringe Zahl von Phagennachkommen frei, was die Ausbreitung der Lyseareale ebenfalls negativ beeinflusst.

Den ersten Schritt der Infektion stellt das zufällige Zusammentreffen des Phagen mit einer Wirtszelle dar, dem ein präziser irreversibler Anheftungsprozeß folgt. Die Kinetik, mit der Phagen an bakterielle Rezeptoren adsorbieren, wird maßgeblich vom Phagen-Wirtssystem sowie den Milieubedingungen beeinflusst. Der pH-Wert, die Ionenkonzentration und insbesondere zweiwertige Kationen spielen dabei meist eine wichtige Rolle, indem sie negative Ladungen der Phagenpartikel sowie der Bakterienzellen neutralisieren. Einige Phagen benötigen zudem Adsorptionsfaktoren (z.B.L-Tryptophan). Zusätzlich beeinflusst die Anzahl der auf der Bakterienoberfläche vorhandenen Rezeptoren die Adsorptionsgeschwindigkeit. Das erfolgreiche Eindringen der Phagennukleinsäure wird von dem durch die Zytoplasmamembran vermittelten Membranpotential der Wirtszelle beeinflusst. Viele Phagen verändern die Makromolekülsynthese ihrer Wirtszelle erheblich, indem sie diese auf die Bildung von Viruskomponenten umdirigieren. Im Extremfall kommt dadurch die gesamte bakterielle DNA- und RNA-Synthese zum Erliegen, die zelleigene RNA wird abgebaut, und die nachfolgenden Syntheseleistungen der Zelle dienen ausschließlich der Bereitstellung viraler Nukleinsäuren und Proteine. Die Infektiosität sowie das Ausmaß der Änderung des Zellmetabolismus kann abhängig vom Phagen-Wirtssystem erheblich variieren und beeinflusst damit maßgeblich die Effektivität der Vermehrung eines Phagen.

Die beobachtete schlechte Vermehrbarkeit der untersuchten Phagen weist darauf hin, daß die verwendeten Indikatoren nicht die optimalen Wirte darstellen. Es muß angenommen werden, daß es sich bei den Phagen um Vertreter handelt, deren "natürliche" Wirtsorganismen anderen *Salmonella*-Arten angehören, obwohl sie aus Naturisolaten von *S. typhimurium* isoliert wurden und auch auf DB21 oder LB5000 vermehrt werden können.

3.1. Transduktion

7D, PS79 und A12 sind in der Lage, generell zu transduzieren, und haben damit Anteil am Genfluß in mikrobiellen Lebensgemeinschaften. Diese Ergebnisse scheinen gerade im Rahmen der Sicherheitsforschung von Bedeutung. Die Fähigkeit eines generell transduzierenden Phagen, bakterielle DNA zu verpacken, ist eine Folge der fehlerhaften DNA-Erkennung beim Verpackungsvorgang. Unabdingbare Voraussetzung für die Verpackung jeglicher DNA in einen Phagenpartikel ist ein Erkennungssignal für die Terminase, die sogenannte *pac site* (Schmieger, 1984).

Der Mechanismus der DNA-Verpackung ist beim Phagen P22 am besten untersucht. Eine spezifische Terminase, die aus den Genprodukten gp3 und gp2 besteht, ist für die Erkennung und Abtrennung der zu verpackenden DNA vom konkatemeren *Precursor*

verantwortlich. Dabei erkennt gp3 die mehr oder weniger definierte Basensequenz der *pac site*, gp2 besitzt Endonukleaseaktivität und schneidet im Bereich dieser *pac site* und am Ende eines *headfuls*. Dadurch, daß diese Terminase nicht absolut sequenzspezifisch arbeitet, werden auch *pac*-ähnliche Sequenzen auf dem Bakterienchromosom oder auf Plasmiden erkannt, von denen aus die Verpackung sequentiell fortschreitet. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist die Sequenz der *pac site* von P22 bis heute nicht zweifelsfrei aufgeklärt. Die Genauigkeitsanforderungen der Terminase an die *pac site* sind offenbar nicht sehr hoch. Trotzdem ist es möglich, diese DNA-Sequenz so zu verändern, daß sie nicht mehr als Verpackungsstartpunkt erkannt wird (Casjens, persönliche Mitteilung).

Die Frage, die sich daher stellt, ist, ob alle oder ein Teil der transduzierenden Phagen einer Bakteriengruppe die gleiche Terminase mit identischer *pac site*-Erkennung benutzen. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, durch die Eliminierung *pac*-ähnlicher Sequenzen Sicherheitsvektoren für eine Bakteriengattung oder-spezies zu konstruieren. P22-artige stellen die zahlenmäßig dominierende Gruppe bisher isolierter generell transduzierender *Salmonella*-Phagen dar. Untersuchungen der für die *pac*-Erkennung zuständigen gp3-Gene einiger dieser Phagen zeigten, daß diese dem P22-Gen zwar außerordentlich ähnlich sind, sich jedoch von diesem sowie untereinander durch eine Reihe von Punktmutationen unterscheiden, die zum Teil zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen. Viele dieser Abweichungen fallen in den für die *pac*-Erkennung sensiblen Bereich von gp3 (Schmieger, persönliche Mitteilung). Bei 7D, PS79 und A12 handelt es sich um Phagen, die nicht mit P22 verwandt sind. Es muß angenommen werden, daß diese jeweils eigene *pac*-Signale verwenden. Den DNA-Transfer von in die Umwelt freigesetzten GVOs auf die natürliche Bakterienpopulation durch Transduktion zu verhindern, indem man Basensequenzen vermeidet, die für Vertreter der verschiedenen Phagengruppen als Verpackungssignale dienen, scheint daher ein aussichtsloses Unterfangen.

Für 7D und PS79 konnte zudem die Fähigkeit nachgewiesen werden, Plasmide zu übertragen. Wie aus zahlreichen Studien bekannt ist, spielt der horizontale Transfer von genetischem Material bei der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen eine entscheidende Rolle. Die Übertragung von Plasmiden, die in vielen Fällen multiple Antibiotikaresistenz vermitteln, ist in diesem Zusammenhang als besonders kritisch anzusehen.

Bemerkenswert erscheint die Tatsache, daß der Phage A12 "von Natur aus" generell transduziert. Die Fähigkeit zur generellen Transduktion resultiert aus dem Verpackungsmodus, den ein Phage benutzt - prinzipiell sollten somit alle Phagen, die ihre DNA sequentiell nach dem *headful*-Mechanismus verpacken, auch in der Lage sein, die DNA ihrer Wirtszelle zu verpacken. Bisher ist jedoch kein virulenter Wildtyp-Phage bekannt, der generell transduziert. In der Tat konnte der Transfer von DNA bei Virulenten bisher lediglich in ausgesprochenen artifiziellen Systemen nachgewiesen werden. Als Beispiel seien hier die *E. coli*-Phagen T4 und T1 erwähnt. T4 zerstört

während seines Vermehrungsprogramms die DNA seiner Wirtszelle. Die Phagen-DNA ist vor dem Angriff der T4-kodierten Endonukleasen IV und II dadurch geschützt, daß sie anstelle von Cytosin 5-Hydroxymethylcytosin (HMC) enthält. Unter diesen Voraussetzungen ist eine Verpackung bakterieller DNA natürlich unmöglich. Durch gleichzeitige Mutation verschiedener T4-Gene konnte man erreichen, daß der Phage in seiner DNA das "normale" Cytosin anstelle von HMC trägt und generell transduzierende Partikel bildet. Dazu wurden die Gene des Stoffwechselwegs zum 5-Hydroxymethylcytosintriphosphat (Gene 56 und 42), die endonucleasekodierenden Gene (*denA* und *denB*) sowie ein weiteres Gen (*alc/unf*), dessen Produkt die Entfaltung der Wirts-DNA bewirkt und gleichzeitig die Transkription der späten Phagen-Gene bei nichtmodifizierter T4-DNA verhindern würde, durch Mutation ausgeschaltet (Klaus et al., 1992). Die Beobachtung der Transduktion beim Phagen T1 erforderte eine Technik, die eine virulente Vermehrung der Phagenpartikel verhinderte und dadurch das Überleben der Transduktanten ermöglichte. Dies konnte durch die Infektion *amber*-nicht-permissiver Zellen (*sup*⁺) mit T1-Phagen, die *amber*-Mutationen tragen und auf *amber*-permissiven Zellen (*sup*⁻) vermehrt worden waren, erreicht werden (Drexler, 1970). A12 dagegen besitzt offensichtlich keine diskriminierenden Mechanismen, die Bildung oder den Nachweis transduzierender Partikel verhindern, sondern verhält sich eher wie die Klarplaquemutante eines temperenten Phagen, der z. B. durch eine Mutation im Repressorgen die Fähigkeit verloren hat, seine Wirtszelle zu lysogenisieren.

3.2. Virustaxonomie

Bereits bei der Einführung der internationalen Virustaxonomie durch Bradley (1967) wurde betont, daß morphologische und Nukleinsäure-Kriterien (DNA, RNA, ds, ss) keine Aussagen hinsichtlich der Evolution und der Phylogenie zulassen. Die Untersuchung der Phagen 7D, PS79 und A12 zeigte, daß es sich um drei Vertreter der Ordnung *Caudovirales* handelt, der ca. 96% der bisher untersuchten Phagen zugeordnet werden können (Ackermann, 2000). Zu dieser Ordnung gehören unter anderen auch die aufgrund der Ergebnisse der DNA-Hybridisierung mit den Phagen als nichtverwandt eingestuften Vertreter P1, Lambda, Mu, P22 und ES18.

Dies zeigt deutlich die eingeschränkte Aussagekraft der taxonomischen Einordnung neuer Phagen. Für die phylogenetische Zuordnung eines Phagen zu einer Gruppe ist daher heute die Genomorganisation ein maßgebliches Kriterium. Nach der Theorie der modularen Evolution ist Phagen einer Gruppe eine bestimmte Genomarchitektur gemein (Botstein, 1980). Dies bedeutet, daß Gene, deren Produkte analoge Funktionen haben, sich im Genom an gleicher Stelle befinden und die gleiche Transkriptionsrichtung aufweisen. Dies wiederum ermöglicht den Mitgliedern einer Familie den Austausch von Modulen durch Rekombination, wobei Module Gruppen von Genen, einzelne Gene

oder auch Domänen eines Gens umfassen können. Der Pool an Modulen, auf den ein Phage zugreifen kann, umfaßt andere koinfizierende Phagen sowie intakte oder kryptische Prophagen oder sogar Plasmide. Daß Bakteriophagen ausgiebig Gebrauch von dieser Möglichkeit der Genomvariation machen, ist für verschiedene Phagengruppen, wie die Familie der Lambdoiden (Campbell und Botstein, 1983) oder die kappa-theta-Phagenfamilie von *Bacillus licheniformis* (Doskočil et al., 1988) belegt. Aufgrund dieser Variationsmöglichkeiten ist anzunehmen, daß jeder aus der Natur isolierte Phage eine einmalige Genomkombination darstellt. Da die Phagen 7D, PS79 und A12 weder untereinander noch mit den getesteten prominenten Phagen Homologie auf Nukleinsäureebene zeigen, stellen sie jeweils Vertreter bisher unbekannter Phagenfamilien dar. Es kann jedoch angenommen werden, daß jede dieser Familien eine Vielzahl von Mitgliedern besitzt, die dieselbe Genomorganisation aufweisen, die sich wiederum hinsichtlich ihrer Modulkombination unterscheiden und untereinander Module austauschen.

3.3. Immunität und Schutz lysogener Zellen

Bestätigt wird die Nichtverwandtschaft der Phagen untereinander sowie mit den Phagen P22 und ES18 zusätzlich durch die Ergebnisse des Immunitätstests lysogener Bakterienstämme. Wie bereits im Ergebnisteil (2.7., Seite 80) beschrieben besitzen Vertreter der Lambdoidengruppe das *immC*-System zum Schutz lysogener Zellen vor einer Überinfektion mit homoimmunen Phagen. *immC* trägt das Gen für den C2-Repressor, der in der Regulation des Wechsels von der lysogenen zur lytischen Vermehrung eine Schlüsselrolle einnimmt. Bei P22 wird die Aufrechterhaltung der Lysogenie sowie die Vermittlung der Immunität lysogener Zellen zusätzlich durch eine zweite Immunitätsregion, *immI*, reguliert. Wie bereits aufgrund der Hybridisierungsergebnisse zu erwarten war, ist der C2-Repressor von P22 nicht in der Lage, die Vermehrung der Phagen 7D, PS79 und A12 zu unterdrücken. Ebenso verhindern die Repressoren der Phagen 7D und PS79, die für die Aufrechterhaltung der Lysogenie verantwortlichen sind nicht die erfolgreiche Infektion von P22. 7D- und PS79-Lysogene sind jedoch vor einer Infektion mit dem Phagen, den sie als Prophagen tragen, geschützt. Ob die Superinfektion der lysogenen Zellen mit dem gleichen Phagen ausschließlich durch die Repressoren der Prophagen verhindert wird ist nicht geklärt.

Neben der repressorvermittelten Immunität sind verschiedene phagenkodierte Resistenzmechanismen bekannt, die eine Infektion lysogener Zellen durch weitere Phagen des gleichen oder auch eines anderen Typs verhindern. So wurden z.B. von Prophagen kodierte Proteine identifiziert, die zu einer Veränderung der Zelloberfläche eines lysogenen Stammes führen und die Adsorption eines Phagen an seinen Rezeptor verhindern (Susskind und Botstein, 1978; Susskind et al., 1971). Dieser Mechanismus wird als

lysogene Konversion bezeichnet. Einen weiteren Mechanismus zum Ausschluß der Vermehrung von superinfizierenden Phagen stellen die sogenannten *superinfection exclusion*-Systeme dar. So blockiert etwa das sieA-System von P22 den Transfer der DNA superinfizierender Phagen durch die innere Membran in das Zytoplasma. Im Gegensatz zum sieB-System, das die Infektion einer P22-lysogenen Zelle mit weiteren P22-verwandten Phagen verhindert, eliminiert dieses System auch die DNA anderer Bakterienviren sowie DNA aus transduzierenden Partikeln (Susskind et al., 1971). Unter Umständen wäre die Einbringung solcher *superinfection exclusion*-Systeme in gentechnisch veränderte Organismen ein geeigneter Ansatz, um deren Infektion durch Bakteriophagen und damit den Transfer von Fremdgenen durch Transduktion zu verhindern.

Auch der Tatsache, daß PS79-Lysogene vor der Infektion von ES18 geschützt sind, kann eine Veränderung der Zellen durch lysogene Konversion zugrunde liegen. Eine regulatorische Wirkung des Repressors von PS79 auf ES18 kann aufgrund der DNA-Hybridisierungsergebnisse als eher unwahrscheinlich angesehen werden. Wie aus verschiedenen Studien bekannt ist, sind einige Prophagen in der Lage, ihren Wirtszellen durch eine phageninduzierte Veränderung der LPS-Schicht einen Selektionsvorteil zu verschaffen. So führt z.B. die Lysogenisierung von *Salmonella choleraesuis* mit dem Phagen P14 zu einer Veränderung der O-Antigen-Polysaccharidketten, die eine erhöhte Serumresistenz und Virulenz des lysogenen Stammes zur Folge hat (Nnalue et al., 1990). Eine Konversion der LPS-Schicht, die eine Adsorption des Phagen ES18 an LB5000(PS79) verhindert, könnte dieselbe Auswirkungen haben und Vorteile für PS79-lysogene Zellen bei der Infektion ihrer Wirte bringen. Da die lysogene Vermehrung eines temperenten Phagen unabdingbar an das Überleben seiner Wirtszelle gebunden ist, führt diese Strategie natürlich auch zu einem Selektionsvorteil für den Bakteriophagen. Eine andere Erklärung wäre eine strukturelle Veränderung des ES18-Rezeptors, des Ferrichrom-Bindungsprotein Sid K. Der Coliphage T5 bindet an das TonA-Protein, das bei *E. coli* dieselbe Funktion wie Sid K bei *Salmonella* erfüllt. Bei T5-lysogenen Zellen wird der T5-Rezeptor so verändert, daß superinfizierende Phagen mit derselben Rezeptorspezifität nicht mehr an die Zellen adsorbieren können (Klaus et al., 1992).

3.4. Molekulargenetische Charakterisierung

Ein wichtiger Punkt bei der Untersuchung verschiedener Phagen einer Organismengruppe ist die Analyse der DNA-Restriktionsmuster. Erste Hinweise auf die Nichtverwandtschaft der Phagen untereinander sowie mit dem prominenten *Salmonella*-Phagen P22 brachte der Restriktionsmustervergleich von aus Phagenköpfen isolierter *EcoRI*-geschnittener DNA (vgl. Abbildung 12., Seite 84). Zwischen diesen Mustern konnten keine Ähnlichkeiten festgestellt werden. Bestätigt wurde dies durch die Hybridisierung

gen von Gesamt-Phagen-DNA gegen *Southern Blots* derselben Phagen ("jeder gegen jeden"). Aus den Restriktionsmustern gespaltener Gesamt-Phagen-DNA bzw. klonierter DNA-Fragmente wurden die Größen der für 7D mit ca. 42000 bp, für PS79 mit 46200 bp und für A12 mit 44600 bp ermittelt. Alle drei Phagen sind in der Lage, generell zu transduzieren. Es ist daher zu erwarten, daß die Phagen-DNA, ausgehend von einer *pac site*, nach dem sogenannten *headful*-Prinzip verpackt wird. Eine für diesen Verpackungsmodus typische unterrepräsentierte Bande im Restriktionsmuster der Phagen-DNA konnte bei PS79 und A12, nicht jedoch bei 7D detektiert werden. Daß die DNA von 7D keine *cos site* besitzt, konnte experimentell gezeigt werden. Es stellt sich daher die Frage, wie das Genom des Phagen vor der Integration in das Genom der Wirtszelle zirkularisiert.

Das Fehlen einer unterrepräsentierten Bande könnte bei 7D dadurch hervorgerufen werden, daß die Verpackung an mehreren Stellen des Genoms initiiert werden kann. Die bei der Spaltung mit Restriktionsenzymen entstehenden Startfragmente der jeweils ersten Verpackung wären im folgenden in so geringen Mengen vorhanden, daß sie bei der Analyse der Restriktionsmuster nicht detektierbar wären. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, daß der Verpackungsstartpunkt von 7D zwar in einem bestimmten, jedoch ausgedehnten Bereich des Genoms liegt. Im Fall des generell transduzierenden Phagen ES18, bei dem ebenfalls kein *pac*-Restriktionsfragment in submolarem Verhältnis detektierbar ist, weisen jüngste Untersuchungen darauf hin, daß der Verpackungsstartpunkt über einen Bereich von ca. 2000 bp streut (Casjens, persönliche Mitteilung). Dies hat zur Folge, daß die Startbande so diffus ist, daß sie im Restriktionsmuster unentdeckt bleibt.

Wie weitere Experimente zeigten, integriert 7D nach Zirkularisierung der DNA durch homologe Rekombination zwischen den *attachmen sites* des Phagen- und des Bakteriengenoms. Die Integration erfolgt in einem nichtkodierenden Bereich des *Salmonella*-Chromosoms. Dadurch verhindert der Phage die Schädigung seiner Wirtszelle. Da die 7D *attP*-Region innerhalb der vegetativen Karte lokalisiert ist, führt die Integration zu einer Änderung der Genreihenfolge im integrierten Prophagen. Es ist anzunehmen, daß diese Umstrukturierung des Genoms Einfluß auf die Regulation der Phagengene hat und wie etwa bei Lambda zur Stabilisierung des Prophagenstatus notwendig ist.

Nicht eindeutig geklärt werden konnte die Frage, ob der PS79-Prophage in das Genom von LB5000 integriert oder als extrachromosomale Replikationseinheit vorliegt. Die Ergebnisse der Untersuchung der genomischen DNA von LB5000(PS79) weisen darauf hin, daß PS79 nicht in das Wirtschromosom integriert. Der eindeutige Beweis durch Isolierung extrachromosomaler Phagen-DNA konnte jedoch nicht erbracht werden. Die Hybridisierung extrachromosomaler DNA mit Phagen-DNA zeigen zwar, daß Cosmid-DNA-Präparationen PS79-DNA enthalten, es kann aber nicht ausgeschlossen werden,

daß es sich dabei um Verunreinigungen handelt, die durch freie Phagen verursacht werden.

Als besonders problematisch erwies sich die molekulargenetische Charakterisierung des Phagen A12. Eine mehrere Enzyme umfassende Restriktionskartierung, wie sie bei 7D und PS79 durchgeführt wurde, war aufgrund der Nichtklonierbarkeit großer Teile des Genoms nicht möglich. Hinweise auf die Ursache dieses Phänomens lieferten Versuche, die klonierten Fragmente zu sequenzieren. Nach Informationen des Göttinger Sequenzierlabors SEQLAB bilden die in Vektoren inserierten DNA-Fragmente Sekundärstrukturen aus, die eine Sequenzierung erheblich erschweren, in einigen Fällen sogar gänzlich verhindern. Es muß davon ausgegangen werden, daß die Ausbildung von Sekundärstrukturen auch die Hauptursache für die Nichtklonierbarkeit des Genoms von A12 darstellt. Die Expression schädlichen Phagengene für die mit Ligationsansätzen transformierten Zellen kann als Ursache nahezu ausgeschlossen werden, da auch *Shotgun*-Klonierungsansätze, bei denen die Phagen-DNA mit dem Enzym *EcoRV* in Fragmente mit geringer Größe gespalten wurde, erfolglos blieben.

4. Abschließende Betrachtung über phagenbedingte Gentransduktion in der Natur

Wie durch Arbeiten von Schicklmaier und Schmieger (1995) gezeigt werden konnte, stellt Lysogenie in der Natur zumindest bei *Salmonella* eher die Regel als eine Ausnahme dar. Für die überwiegende Mehrheit der im Rahmen dieser Studien isolierten Bakteriophagen konnte außerdem die Fähigkeit, generell zu transduzieren, nachgewiesen werden. Eine Studie mit Isolaten der Spezies *E. coli* zeigte, daß die Situation bei *Salmonella* und ihren Phagen mit der bei der gentechnisch weitaus bedeutenderen Spezies *E. coli* vergleichbar ist, wenngleich die ermittelten Zahlen für die Lysogenie sowie für das Vorkommen transduzierender Bakteriophagen geringer waren (Schicklmaier et al., 1998). Dies zeigt, daß die bei *Salmonella*-Phagen erworbenen Erkenntnisse durchaus auf andere Bakterienspezies übertragbar sind.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Rolle der Transduktion beim horizontalen Gentransfer im Vergleich zu den Mechanismen der Transformation und der Konjugation bei weitem unterschätzt wird. Dies gilt nicht nur für die Evolution der Bakterien, sondern stellt insbesondere im Rahmen der Sicherheitsforschung bei der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen ein Problem dar. Die Hoffnungen, nichttransduzierbare Vektoren zu konstruieren, scheinen in Anbetracht der Vielzahl an Bakteriophagen und der damit nahezu ins Unermeßliche steigenden Variationen der Strategien, DNA zu verpacken und auf Empfängerzellen zu übertragen, gering (vgl. 3.1.). Die einzige Beschränkung dieses Transfersystems scheint in der allgemein engen Wirtslimitierung von Phagen zu liegen. Zwar sind durchaus Bakterienviren mit großem Wirtsbereich bekannt, doch handelt es sich bei keinem dieser Vertreter um einen transdu-

zierenden Phagen. Auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *Salmonella*-Phagen zeichnen sich durch einen engen Wirtsbereich aus.

Abbildung 24 stellt die möglichen Verbreitungswege genetischer Information von gentechnisch veränderten Organismen auf die natürliche Bakterienpopulation eines Habitats durch Transduktion dar. Um zu überprüfen, welchem dieser Übertragungswege in der Natur die größte Bedeutung zukommt, sind umfangreiche Studien unter naturnahen Bedingungen (Mikrokosmosexperimente) notwendig.

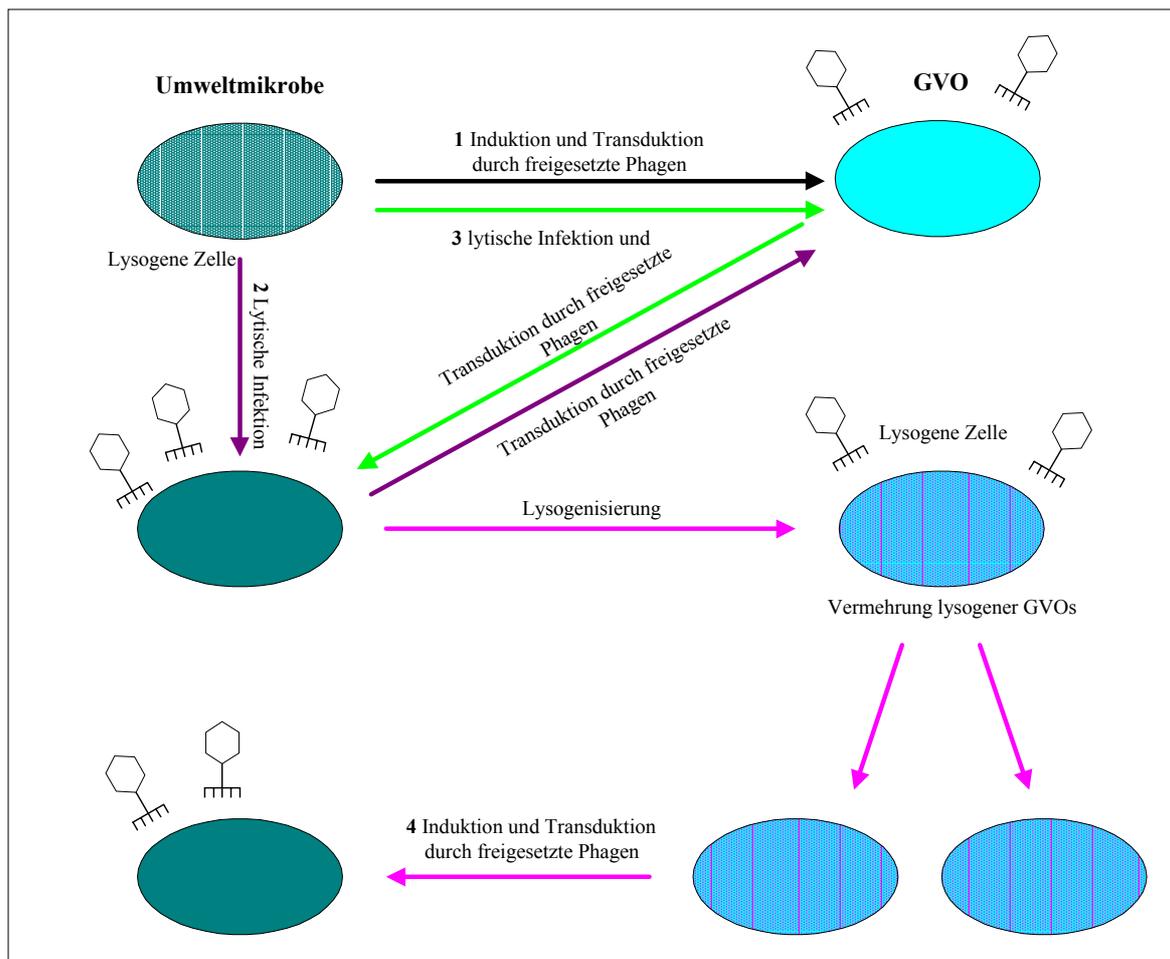


Abb. 24: Transduktionswege zwischen gentechnisch veränderten Organismen und Bakterien in ihrer Umgebung.

Im Rahmen der Arbeit wurden bereits Vorstudien zu solchen Experimenten unter Laborbedingungen gemacht. Das Prinzip bestand in der Kokultivierung potentieller Spender- und Empfängerstämme, von denen entweder einer oder beide lysogen für den transduzierenden Phagen P22 waren. Zur Unterscheidung der Transduktionspartner wurden diese mit chromosomalen transposonkodierten Resistenzmarkern (Tn5, Tn10) versehen. Die Übertragung der Selektionsmarker wurde in Abhängigkeit von der Ko-

kultivierungsdauer anhand des Auftretens von Doppelresistenten ermittelt. In Versuchen, in denen ausschließlich lysogene Stämme verwendet wurden, konnte die Richtung des Transfers durch einen zusätzlichen chromosomalen Resistenzmarker gegen Streptomycin, den nur einer der beiden Stämme trug, bestimmt werden.

Dabei zeigte sich, daß die Übertragung der Markergene mit Abstand am häufigsten und schnellsten auf folgendem Weg erfolgt: Aus Lysogenen freigesetzte Phagen vermehren sich in den Zellen des nichtlysogenen Stammes und übertragen DNA der Wirtszelle auf die lysogenen Zellen. Transduktanten konnten bereits nach vier bis sechs Stunden nachgewiesen werden, und dies nahezu unabhängig von der Anfangsdichte der Zellkultur sowie von variierten Verhältnissen von Spendern und Empfängern. Bei der Kokultivierung zweier lysogener Stämme traten Transduktanten erst nach vier Tagen auf. Unter diesen Voraussetzungen konnte Transduktion nur durch transduzierende Partikel erfolgen, die spontan aus einem der Stämme freigesetzt wurden (vgl. Abbildung 24, Weg 4). Experimente, bei denen die Kokultivierung unter Mangelbedingungen durchgeführt wurden, wie sie für die meisten natürlichen Habitate typisch sind, zeigten nur unwesentliche Unterschiede zu denen, die unter Verwendung von Vollmedien durchgeführt wurden. Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, daß freie Phagen aus der Umgebung, die sich in phagensensitiven GVOs explosionsartig vermehren können, eine größere Gefahr darstellen als Prophagen, die die GVOs tragen.

Bei der Fülle von Informationen, die heute über die einzelnen Mechanismen der Übertragung von genetischem Material zwischen Bakterienzellen vorliegen, darf jedoch nicht vergessen werden, daß es sich dabei um isolierte Betrachtungen einzelner Transfersysteme handelt. Derzeit liegen, soweit bekannt, keine Studien vor, die sich mit den tatsächlichen Gentransferereignissen in der Natur beschäftigen. Bei der Komplexität der Zusammensetzung und der Überlebensstrategien mikrobiologischer Lebensgemeinschaften darf angenommen werden, daß selbst unter enormem technischen Aufwand nur Einblicke in die Beziehungen der Organismen natürlicher Habitate möglich sind.

Zusammenfassung

Die Rolle der Transduktion beim horizontalen Gentransfer ist bislang wenig untersucht. Die Bedeutung, die diesem Mechanismus beim Austausch von genetischem Material in der Natur zukommt, kann nur geklärt werden, wenn möglichst umfassende Informationen über das Vorkommen von transduzierenden Bakteriophagen verfügbar sind. Zur Erforschung des Ausmaßes des phagenvermittelten Gentransfers war es notwendig, Methoden zu entwickeln, die nicht auf die Verfügbarkeit kultivierbarer Indikatorbakterien zum Nachweis von Phagen sowie Spender- und Empfängerstämme zum Nachweis der Transduktion angewiesen sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur indikatorunabhängigen Identifizierung transduzierender Bakteriophagen entwickelt. In Phagenpartikel verpackte DNA wurde als Template für die PCR-Amplifikation von bakterieller 16S rDNA eingesetzt. Dabei wurden PCR-Primer verwendet, die eine Amplifikation der 16S rRNA-Gene der meisten Eubakteria ermöglichen. Die Sequenzierung der klonierten Amplifikationsprodukte ermöglichte die retrospektive Identifizierung der Wirtsbakterien. Zur Etablierung dieser Methode wurde der generell transduzierende *Salmonella*-Phage P22 eingesetzt.

Erste Anwendungen auf verschiedene Umweltproben zeigten, daß dieser Ansatz den Nachweis generell transduzierender Bakteriophagen ohne Isolierung und Kultivierung der Wirtszellen ermöglicht. Daher ist es auch möglich, Phagen, die am Gentransfer beteiligt sind, ohne Selektion durch die derzeit kultivierbaren Wirte zu detektieren.

Schon in den ersten Testanwendungen konnten Phagen von 26 verschiedenen Gram-negativen Bakterienspezies nachgewiesen werden, bei denen bisher keine transduzierenden Viren bekannt waren. Die Untersuchung einer Moorquellwasserprobe brachte Informationen über Phagen mit bisher unbekanntem Wirtszellen.

Die hier vorgestellte Methode kann als Prototyp des indikatorunabhängigen Nachweises generell transduzierender Phagen für prinzipiell alle Bakterienarten gelten. Unter Einsatz verschiedener 16S rDNA-Primerpaare ist der Suche nach transduzierenden Partikeln in der Umwelt nahezu keine Grenze gesetzt. Dieser Ansatz erlaubt sowohl die Überprüfung einer Probe auf das Vorkommen transduzierender Phagen mit unterschiedlichen Wirtsspezifitäten als auch die gezielte Suche nach am DNA-Transfer beteiligten Phagen spezieller Vertreter der Prokaryonten.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der bisher unbekanntem *Salmonella*-Phagen 7D, PS79 und A12. Es konnte gezeigt werden, daß diese nicht mit P22 sowie anderen prominenten Bakterienviren verwandt sind und daher drei neue Phagenfamilien repräsentieren. Mikrobiologische Untersuchungen erbrachten, daß es sich dabei um zwei temperente und einen virulenten generell transduzierenden Phagen handelt. Bezüglich ihrer morphologischen und Nukleinsäure-Merkmale zählen sie zur Familie der *Caudovirales*. Die Phagen wurden in Hinsicht auf ihr Wirtsspektrum sowie

auf phagenvermittelte Schutzmechanismen lysogener Zellen untersucht. Im Rahmen der molekulargenetischen Analyse konnte die Größe der Phagengenome ermittelt werden und für 7D und PS79 konnten Restriktionskarten für acht bzw. sieben Enzyme erstellt werden. Der Phage A12 entzog sich, wahrscheinlich aufgrund ausgeprägter DNA-Sekundärstrukturen, einer ausführlichen Restriktionskartierung, so daß diese auf ein Enzym beschränkt werden mußte. Untersuchungen PS79-lysogener Zellen weisen darauf hin, daß der Prophage als extrachromosomale Replikationseinheit vorliegt. Für den Phagen 7D wurde die Integration durch ortsspezifische Rekombination sowie der Integrationsort auf dem Chromosom von *Salmonella* nachgewiesen. Die Charakterisierung der Phagen 7D, PS79 und A12 erbrachte neue Informationen über die Vielfalt generell transduzierender Bakteriophagen bei *Salmonella*.

Insgesamt zeigen die erzielten Ergebnisse deutlich, daß der horizontale Transfer genetischen Materials durch Transduktion, insbesondere im Hinblick auf die Sicherheitsforschung im Zusammenhang mit der Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen, nicht länger als vernachlässigbarer Faktor eingestuft werden kann.

Anhang

Positionen kartierter Restriktionsschnittstellen in Genom von 7D

<i>EcoRV</i>		<i>EcoRI</i>		<i>DraI</i>	
Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)
2400		3200		1600	
3700	1300	5900	2700	6000	4400
4650	950	9400	1300	7050	1050
9950	4900	18000	3500	12450	5400
11150	1600	20600	8600	20900	8450
13350	2200	28600	2600	31450	10550
16950	3600	32400	8000	35850	4400
17850	900	36200	3800		2500
19850	1100	37550	1350		
20350	1400	37900	350		
27500	2400		3800		
24950	2200				
27050	2100				
31550	4500				
31950	400				
32650	700				
32850	200				
35350	2500				
36200	850				
	3900				

<i>PstI</i>		<i>HindIII</i>		<i>XhoI</i>	
Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)
2900		1100		14100	
6200	3300	9000	7900	20400	6300
12500	6300	22300	13300	28700	8300
13000	500	30950	8650	39500	10800
13550	550		3500		150
15850	2300				
	15100				

<i>SmaI</i>		<i>MluI</i>	
Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)
3800		34700	
21400	17600		500
	14600		

Positionen kartierter Restriktionsschnittstellen in Genom von PS79

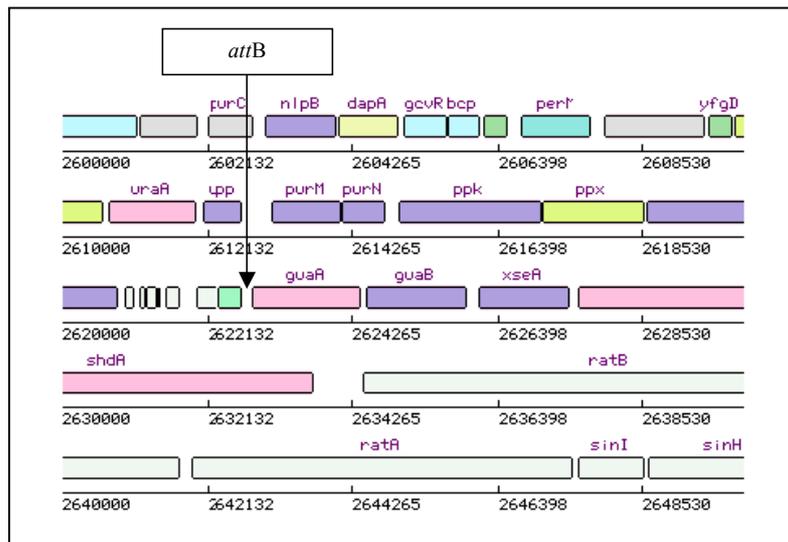
<i>EcoRV</i>		<i>NruI</i>		<i>StuI</i>	
Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)
3400	<i>pac</i> -Fragment	4700	<i>pac</i> -Fragment	4900	
3700	300	5800	1100	7300	2400
4500	800	9800	4000	11800	4500
6950	2450	11650	1850	17000	5200
8450	1500	12150	500	34700	17700
8690	240	12450	300	35100	400
11290	2600	15450	3000		900
15790	4500	20950	5500		
19790	4000	26750	5800		
23790	4000	29150	2400		
26240	2450	34950	5800		
28440	2200	35450	500		
30040	1600	36400	950		
30740	700	36950	550		
32540	1800	38450	1500		
32840	300	41650	3200		
33940	1100	42050	400		
34540	600		4000		
38240	3700				
43840	5600				
	1650				

<i>HindIII</i>		<i>SalI</i>		<i>Xho I</i>	
Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)
2500	<i>pac</i> -Fragment	7650		6000	
7800	5300	19500	11850	16250	10250
11700	3900	25400	5900	25100	8850
2600	14300	27650	2250	27850	2750
39500	13500		4750		7750
40300	800				
43100	2800				
	2700				

<i>NdeI</i>	
Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)
6500	
25300	18800
	18400

Positionen kartierter Restriktionsschnittstellen in Genom von A12

<i>SalI</i>		<i>HindIII</i>		<i>EcoRI</i>	
Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)	Position der Schnittstelle	Fragmentgröße (bp)
16000		18000		19400	
20400	4400	23200	5200	23800	4400
25400	5000	24500	1300	29000	5200
27900	2500	33500	9000	31500	2500
32400	4500	39000	5500	36000	4500
41400	9000	42900	3900		8600
41900	500		1700		
	2700				

Integrationsstelle des Phagen 7D in das Chromosom von *S. typhimurium* LT2

Sequenzvergleich: p4EV/p7D1500att

Obere Sequenz: p4EV

Untere Sequenz: p7D1500att

1	GATATCGCGA	TCGATAACGG	CCTGTTTCAT	TGCCCGGGTA	CTGTCAGCCA	GAATGACGTG	60
	S						
1	GATATCGCGA	TCGATAACGG	CCTGTTTCAT	TGCCCGGGTA	CTGTCAGCCA	GAATGACGTG	60
61	CTTCATATAG	CTGTCCGGTAT	GTACCGCGAA	TGTCTCAGCC	CCATGGATCT	TTTTGATACC	120
61	CTTCATATAG	CTGTCCGGTAT	GTACCGCGAA	TGTCTCAGCC	CCATGGATCT	TTTTGATACC	120
121	GTCACGTTTA	GCCGCAGCTG	GCGACTGTCC	TGCCCTCAGC	AGTTTCTTTG	CAGCAATGAG	180
121	GTCACGTTTA	GCCGCAGCTG	GCGACTGTCC	TGCCCTCAGC	AGTTTCTTTG	CAGCAATGAG	180
181	TTCTTCACGT	GCTTCCGCCA	GACTGATACC	GTCACGACCA	TACTGACCGA	TGACAAGCGT	240
181	TTCTTCACGT	GCTTCCGCCA	GACTGATACC	GTCACGACCA	TACTGACCGA	TGACAAGCGT	240
241	TTCCCTGCGA	CCGTTGATTC	TGTAGTCGTA	CCGGAACGAG	ACAGAGCCGG	AGGTAAGCAC	300
241	TTCCCTGCGA	CCGTTGATTC	TGTAGTCGTA	CCGGAACGAG	ACAGAGCCGG	AGGTAAGCAC	300
301	AGCGACATAC	AGCCCCTCAC	GGTCAGAAAC	CTTATACAGT	TTGTCCTGCG	GCTTGAGGTT	360
301	AGCGACATAC	AGCCCCTCAC	GGTCAGAAAC	CTTATACAGT	TTGTCCTGCG	GCTTGAGGTT	360
361	TTTTAATTTG	GTATCAGTAA	GCACAATTCA	CCCGTAAAGC	ATCCATGGTT	TGACGGTATG	420
361	TTTTAATTTG	GTATCAGTAA	GCACAATTCA	CCCGTAAAGC	ATCCATGGTT	TGACGGTATG	420
421	AAGAGTATAC	CTTTAGGGTA	ATACCGTCAC	CTGTACCGGC	AAAAAATGTG	AGATAGATTG	480
421	AAGAGTATAC	CTTTAGGGTA	ATACCGTCAC	CTGTACCGGC	AAAAAATGTG	AGATAGATTG	480
481	AATAGATATG	ATGTGATATA	AAGAAAAACC	CTCTGTAAAA	ACAGAGGGTT	GACTIONGTA	540
481	AATAGATATG	ATGTGATATA	AAGAAAAACC	CTCTGTAAAA	ACAGAGGGTT	GACTIONGTA	540
541	TTGAATAGAA	ATGATTAGCT	GTGAGTTAGC	TGTAAATCAT	TCCCACTCAA	TTATTTACGA	600
						M	
541	TTGAATAGAA	ATGATTAGCT	GTGAGTTAGC	TGTAAATCAT	TCCCACTCAA	TGGTAGCCGG	600
601	TACTCATAAC	TAATTGACTG	ATAACAACCT	TATGAAAAAT	GATTTTTACC	ATACCGTTTT	660
601	CGGTTTACCG	CTGATGTCAT	ACACCACACG	GGAAATCCCG	TTGACTTCAT	TGATGATGCG	660
661	ATATACCGTC	ACCGGTTAAC	AGTACCCCGT	TTTTTCAGTG	CGTCATACTG	CTGCTCACAG	720
661	GTTGGAAACG	CGACCGAGGA	AGTCATACGG	CAGGTGCGCC	CAGTGTGCGG	TCATAAAGTC	720

Literatur

Ackermann HW, Eisenstark A.

The present state of phage taxonomy.
Intervirology. 1974, 3(4): 201-19.

Ackermann HW.

Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review.
Arch. Virol. 2001, 146(5): 843-57.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH.

Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.
Microbiol. Rev. 1995 Mar, 59(1): 143-69.

Arber W, Wauters-Willems D.

Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. XII. The two restriction and modification systems of strain 15T.
Mol. Gen. Genet. 1970, 108(3): 203-17.

Avery OT, MacLeod CM, McCarthy M.

Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation in pneumococcal types.
J. Exp. Med. 1944, 79: 137-159.

Baker J, Limberger R, Schneider SJ, Campbell A.

Recombination and modular exchange in the genesis of new lambdoid phages.
New Biol. 1991 Mar, 3(3): 297-308.

Bale MJ, Day MJ, Fry JC.

Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon.
Appl. Environ. Microbiol. 1988 Nov, 54(11): 2756-8.

Bale MJ, Fry JC, Day MJ.

Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones.
J. Gen. Microbiol. 1987 Nov, 133 (Pt 11): 3099-107.

Balis E, Vatopoulos AC, Kanelopoulou M, Mainas E, Hatzoudis G, Kontogianni V, Malamou-Lada H, Kitsou-Kiriakopoulou S, Kalapothaki V.

Indications of in vivo transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora.
J. Clin. Microbiol. 1996 Apr, 34(4): 977-9.

Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, Jenni B.

Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence.
Appl. Environ. Microbiol. 1996 Oct, 62(10): 3673-8.

Belogurov AA, Yussifov TN, Kotova VU, Zavilgelsky GB.

The novel gene(s) ARD of plasmid pKM101: alleviation of EcoK restriction.
Mol. Gen. Genet. 1985, 198(3): 509-13.

Benson NR, Roth J.

A *Salmonella* phage-P22 mutant defective in abortive transduction.
Genetics. 1997 Jan, 145(1): 17-27.

Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, Haldal M.

High abundance of viruses found in aquatic environments.
Nature. 1989 Aug 10, 340(6233): 467-8.

Bertani G, Weigle JJ.

Host controlled variation in bacterial viruses.
J. Bacteriol. 1953, 65: 113-21.

Bertani G.

Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 1951, 62: 591-600.

Beumer J, Hannecart-Pokorni E, Godard C.

Bacteriophage receptors.
Bull de l' Institute Pasteur. 1987, 82: 172-53.

Bianchi ME, Radding CM.

Insertions, deletions and mismatches in heteroduplex DNA made by recA protein.
Cell. 1983 Dec, 35(2 Pt 1): 511-20.

Birnboim HC, Doly J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24, 7(6): 1513-23.

Björklöf K, Suoniemi A, Haahtela K, Romantschuk M.

High frequency of conjugation versus plasmid segregation of RP1 in epiphytic *Pseudomonas syringae* populations.
Microbiology. 1995 Oct, 141 (Pt 10): 2719-27.

Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW.

Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene. 1977, 2(2): 95-113.

Bond PL, Hugenholtz P, Keller J, Blackall LL.

Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors.
Appl. Environ. Microbiol. 1995 May, 61(5): 1910-6.

Botstein D.

A theory of modular evolution for bacteriophages.
Ann. NY Acad. Sci. 1980, 354: 484-91.

Botstein K, Lew KK, Jarvik V, Swanson CA.

Role of antirepressor in the bipartite control of repression and immunity by bacteriophage P22.
J Mol. Biol. 1975 Feb 5, 91(4): 439-62.

Boyd EF, Nelson K, Wang FS, Whittam TS, Selander RK.

Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (mdh) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1994 Feb 15, 91(4): 1280-4.

Bradley DE.

Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins.
Bacteriol. Rev. 1967 Dec, 31(4): 230-314.

Bratoeva MP, John JF Jr.

In vivo R-plasmid transfer in a patient with a mixed infection of *shigella* dysentery.
Epidemiol. Infect. 1994 Apr, 112(2): 247-52.

Buchan P.

Emergency medical flights.
P N G Med J. 1983 Sep-Dec, 26(3-4): 172-3.

Bullas LR, Ryu JI.

Salmonella typhimurium LT2 strains which are r- m+ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification.
J. Bacteriol. 1983 Oct, 156(1): 471-4.

Bundock P, Hooykaas PJ.

Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1996 Dec 24, 93(26): 15272-5.

Campbell A, Botstein D.

Evolution of the lambdoid phages. In: Lambda II. pp. 365-80. 1983.
Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Campbell A.

Episomes.
Adv. Genet. 1962, 11: 101-45.

Christensen BB, Sternberg C, Andersen JB, Eberl L, Moller S, Givskov M, Molin S.

Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community.
Appl. Environ. Microbiol. 1998 Jun, 64(6): 2247-55.

Clewell DB, Flannagan SE, Jaworski DD.

Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons.
Trends Microbiol. 1995 Jun, 3(6): 229-36.

Condit RC.

F factor-mediated inhibition of bacteriophage T7 growth: increased membrane permeability and decreased ATP levels following T7 infection of male *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. 1975 Oct 15, 98(1): 45-59.

Dahlberg C, Bergstrom M, Hermansson M.

In Situ Detection of High Levels of Horizontal Plasmid Transfer in Marine Bacterial Communities.
Appl. Environ. Microbiol. 1998 Jul 1, 64(7): 2670-5.

DasGupta C, Radding CM.

Polar branch migration promoted by recA protein: effect of mismatched base pairs.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1982 Feb, 79(3): 762-6.

Davies J.

Origins and evolution of antibiotic resistance.
Microbiologia. 1996 Mar, 12(1): 9-16.

Davison J, Brunel F, Kaniga K, Chevalier N.

Recombinant DNA vectors for *Pseudomonas*: Biotransformations, Pathogenesis and Evolving Biotechnology, (S. Silver, A. Chakrabarty, B. Iglewski, Eds.) 242-51 Am. Soc. Microbiol., 1990, Washington, DC.

DiGiovanni GD, Neilson JW, Pepper IL, Sinclair NA.

Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients.
Appl. Environ. Microbiol. 1996 Jul, 62(7): 2521-6.

Dojka MA, Harris JK, Pace NR.

Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria.
Appl. Environ. Microbiol. 2000 Apr, 66(4): 1617-21.

Doskóčil J, Storchová H, Stokrova J, Forstová J, Meyer J.

Correlation of physical maps and some genetic functions in the genomes of the kappa-theta phage family of *Bacillus licheniformis*.
Mol. Gen. Genet. 1988 Oct, 214(2): 343-7.

Drexler H.

Transduction by bacteriophage T1.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1970, 66(4): 1083-8.

Dunny GM, Leonard BA, Hedberg PJ.

Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication.
J. Bacteriol. 1995 Feb, 177(4): 871-6.

Ebel-Tsipis J, Fox MS, Botstein D.

Generalized transduction by bacteriophage P22 in *Salmonella typhimurium*. II. Mechanism of integration of transducing DNA.
J. Mol. Biol. 1972 Nov 14, 71(2): 449-69.

Elford WJ, Andrewes CH.

The sizes of different bacteriophages.
Brit. J. Exptl. Pathol. 1932, 13: 446ff.

England LS, Lee H, Trevors J.

Persistence of *Pseudomonas aureofaciens* strains and DNA in soil.
Soil. Biol. Biochem. 1997, 29: 1521-27.

Feiss M, Backer A.

DNA packaging and cutting. Lambda II. pp. 305-30. 1983.
Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Feng DF, Cho G, Doolittle RF.

Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1997 Nov 25, 94(24): 13028-33.

Feng G, Tsui HC, Winkler ME.

Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells.
J. Bacteriol. 1996 Apr, 178(8): 2388-96.

Fields KL.

Comparison of the action of colicins E1 and K on *Escherichia coli* with the effects of abortive infection by virulent bacteriophages.
J. Bacteriol. 1969 Jan, 97(1): 78-82.

Frischer ME, Williams HG, Bennison B, Drake GR, Balkwill DL, Paul JH.

The naturally transformable marine bacterium WJT-1C formally identified as "*Vibrio*" is a pseudomonad. Curr. Microbiol. 1996 Nov, 33(5): 287-91.

Frost LS, Ippen-Ihler K, Skurray RA.

Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor.
Microbiol. Rev. 1994 Jun, 58(2): 162-210.

Furth M, Wickner S.

Lambda DNA replication. In: Lambda II. pp. 145-74. 1983.
Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, New York, USA.

Gallert M.

Formation of covalent circles of lambda DNA by *E. coli* extracts.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1967, 57: 148.

Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R.

Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA
sequence analysis.
Appl. Environ. Microbiol. 1997 Jul, 63(7): 2802-13.

Goodman AE, Hild KC, Marshall KC, Hermansson M.

Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions
Appl. Environ. Microbiol. 1993: 59 1035-40.

Götz A, Pukall R, Smit E, Tietze E, Prager R, Tschape H, van Elsas JD, Smalla K.

Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR.
Appl. Environ. Microbiol. 1996 Jul, 62(7): 2621-8.

Götz A, Smalla K.

Manure enhances plasmid mobilization and survival in *Pseudomonas putida* introduced into the
field soil
Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63 1980-86.

Griffith F.

The significance of *pneumococcal* types.
J. Hyg. 1928, 27: 113-59.

Gruzza M, Fons M, Ouriet MF, Duval-Iflah Y, Ducluzeau R.

Study of gene transfer in vitro and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus*
lactis strains to various strains belonging to human intestinal flora.
Microb. Releases. 1994 Jul, 2(4): 183-9.

Gruzza M, Langella P, Duval-Iflah Y, Ducluzeau R.

Gene transfer from engineered *Lactococcus lactis* strains to *Enterococcus faecalis* in the
digestive tract of gnotobiotic mice.
Microb. Releases. 1993 Dec, 2(3): 121-5.

Guiney DG Jr.

Promiscuous transfer of drug resistance in gram-negative bacteria.
J. Infect. Dis. 1984 Mar, 149(3): 320-9.

Haggård-Ljungquist E, Halling C, Calendar R.

DNA sequences of the tail fiber genes of bacteriophage P2: evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages.
J. Bacteriol. 1992 Mar, 174(5): 1462-77.

Hanks MC, Newman B, Oliver IR, Masters M.

Packaging of transducing DNA by bacteriophage P1.
Mol. Gen. Genet. 1988 Nov, 214(3): 523-32.

Hansen MC, Tolker-Nielsen T, Giskov M, Molin S.

Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region.
FEMS Microbiol. Ecol. 1998, 26: 141-9.

Harris RS, Feng G, Ross KJ, Sidhu R, Thulin C, Longerich S, Szigety SK, Hastings PJ, Winkler ME, Rosenberg SM.

Mismatch repair is diminished during stationary-phase mutation.
Mutat. Res. 1999 Jul, 437(1): 51-60.

Havarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA.

An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1995 Nov 21, 92(24): 11140-4.

Heinemann JA, Sprague GF Jr.

Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast.
Nature. 1989 Jul 20, 340(6230): 205-9.

Heinemann JA.

Genetics of gene transfer between species.
Trends Genet. 1991 Jun, 7(6): 181-5.

Hershey AD, Burgi E.

Complementary structure of interacting sites at the ends of lambda DNA molecules.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1965, 53: 325.

Highton PJ, Chang Y, Myers RJ.

Evidence for the exchange of segments between genomes during the evolution of lambda-like bacteriophages.
Mol. Microbiol. 1990 Aug, 4(8): 1329-40.

Hiraishi A.

High-performance liquid chromatographic analysis of demethylmenaquinone and menaquinone mixtures from bacteria.

J. Appl. Bacteriol. 1988 Feb, 64(2): 103-5.

Hoffmann A, Thimm T, Droge M, Moore ER, Munch JC, Tebbe CC.

Intergeneric transfer of conjugative and mobilizable plasmids harbored by *Escherichia coli* in the gut of the soil microarthropod *Folsomia candida* (Collembola).

Appl. Environ. Microbiol. 1998 Jul, 64(7): 2652-9.

Ikeda H, Tomizawa J.

Prophage P1, and extrachromosomal replication unit.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1968, 33: 791-8.

Jaenecke S, de Lorenzo V, Timmis KN, Diaz E.

A stringently controlled expression system for analysing lateral gene transfer between bacteria.

Mol. Microbiol. 1996 Jul, 21(2): 293-300.

Jiang SC, Paul JH.

Gene transfer by transduction in the marine environment.

Appl. Environ. Microbiol. 1998 Aug, 64(8): 2780-7.

Kapur V, Nelson K, Schlievert PM, Selander RK, Musser JM.

Molecular population genetic evidence of horizontal spread of two alleles of the pyrogenic exotoxin C gene (speC) among pathogenic clones of *Streptococcus pyogenes*.

Infect. Immun. 1992 Sep, 60(9): 3513-7.

Kidambi SP, Ripp S, Miller RV.

Evidence for phage-mediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosas* on the phylloplane.

Appl. Environ. Microbiol. 1994 Feb, 60(2): 496-500.

King G, Murray NE.

Restriction enzymes in cells, not eppendorfs.

Trends Microbiol. 1994 Dec, 2(12): 465-9.

Kinkle BK, Sadowski MJ, Schmidt EL, Koskinen WC.

Plasmids JP4 and r68.45 can be transferred between populations of *Bradyrhizobia* in non-sterile soil.

Appl. Environ. Microbiol. 1991, 59: 1762-66.

Klaus S, Krüger D, Meyer J.

Bakterienviren. 1992.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Kopczynski ED, Bateson MM, Ward DM.

Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms.

Appl. Environ. Microbiol. 1994 Feb, 60(2): 746-8.

Kuo TT, Stocker BA.

ES18, a general transducing phage for smooth and nonsmooth *Salmonella typhimurium*.

Virology. 1970 Nov, 42(3): 621-32.

Lacy GH, Stromberg VK, Cannon NP.

Erwinia amylovora mutants and in planta derived transconjugants resistant to oxytetracycline

Can. J. Microbiol. 1984, 6: 33-39.

Lawrence JG, Ochman H.

Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange.

J. Mol. Evol. 1997 Apr, 44(4): 383-97.

Lawrence JG, Ochman H.

Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1998 Aug 4, 95(16): 9413-7.

Lazar S, Waldor MK.

ToxR-independent expression of cholera toxin from the replicative form of CTXphi.

Infect. Immun. 1998 Jan, 66(1): 394-7.

Lederberg J, Tatum EL.

Gene recombination in *E. coli*.

Nature 1946, 558.

Lennox ES.

Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1 packaging site (*pac*).

Virology 1955 1: 190-206.

Li L, Kato C, Horikoshi K.

Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench.

Mar. Biotechnol. 1999 Jul, 1(4): 391-400.

Licht TR, Christensen BB, Krogfelt KA, Molin S.

Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment.

Microbiology. 1999 Sep, 145 (Pt 9): 2615-22.

Liesack W, Sela S, Bercovier H, Pitulle C, Stackebrandt E.

Complete nucleotide sequence of the *Mycobacterium leprae* 23 S and 5 S rRNA genes plus flanking regions and their potential in designing diagnostic oligonucleotide probes.

FEBS Lett. 1991 Apr 9, 281(1-2): 114-8.

Lilley AK, Bailey MJ.

The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked *Pseudomonas* population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions.
Adv. Appl. Microbiol. 1997, 63: 1577-83.

Lilley AK, Fry JC, Day MJ, Bailey MJ.

In situ transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp in the sugar beet rhizosphere.
Microbiology 1994, 140: 27-33.

Lindqvist BH.

Bacteriophage and gene transfer.
APMIS Suppl. 84, 1998, 106: 15-18.

Lipson SM, Stotzky G.

Interaction between viruses and clay minerals. In: Human Viruses in Sediments, Sludges, and Soil. pp. 197-230. 1987, Rao VC and Melnick (Hrsg.). CRC Press, Boca Raton, FL.

Liu Q, Thorland EC, Sommer SS

Inhibition of PCR amplification by a point mutation downstream of a primer.
BioTechniques 1997, 22: 292-300.

Lorenz MG, Wackernagel W.

Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.
Microbiol. Rev. 1994 Sep, 58(3): 563-602.

Louvrier P, Laguerre G, Amarger N.

Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations isolated directly from soils.
Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62: 4202-05.

Lwoff A.

Lysogeny.
Bacteriol. Rev. 1953, 269ff.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.

Molecular Cloning. 1982, Cold Spring Harbour, New York.

Marcinek H, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A, Gauer M.

Enterococcus faecalis gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants.
Appl. Environ. Microbiol. 1998 Feb, 64(2): 626-32.

Marsh JL, Erfle M, Wykes EJ.

The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation.

Gene. 1984 Dec, 32(3): 481-5.

Masters M.

Generalized transduction. In: "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*" Cellular and molecular biology. 1996, Neidhard FC (Hrsg.). American Society for Microbiology. Washington D.C. USA: 2221-41.

Matheson VG, Forney LJ, Suwa Y, Nakatsu CH, Sewtone AJ, Holben WE.

Evidence for acquisition in nature of a chromosomal 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid/ketoglutarate dioxygenase gene by different *Burkholderia* spp.

Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63: 2266-72.

Matic I, Rayssiguier C, Radman M.

Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species.

Cell. 1995 Feb 10, 80(3): 507-15.

Matic I, Taddei F, Radman M.

Genetic barriers among bacteria.

Trends Microbiol. 1996 Feb, 4(2): 69-72.

McKane M, Milkman R.

Transduction, restriction and recombination patterns in *Escherichia coli*.

Genetics. 1995 Jan, 139(1): 35-43.

Meselson M, Yuan R, Heywood J.

Restriction and modification of DNA.

Annu. Rev. Biochem. 1972, 41: 447-66.

Moreau S, Leret V, Le Marrec C, Varangot H, Ayache M, Bonnassie S, Blanco C, Trautwetter A.

Prophage distribution in coryneform bacteria.

Res. Microbiol. 1995 Jul-Aug, 146(6): 493-505.

Morse ML, Lederberg EM, Lederberg J.

Transduction in *Escherichia coli* K12.

Genetics 1956, 41: 142-56.

Morse ML.

Transduction of certain loci in *Escherichia coli* K12.

Genetics 1954, 39: 984.

Moser E.

Temperente, insbesondere allgemein transduzierende Bakteriophagen in Naturisolaten von *Escherichia coli*. 1997, Dissertationsarbeit.

Nagamine T, Tajima K, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y.

Molecular genetic analysis of rumen microbes and its application.
Nippon Saikingaku Zasshi. 1999 Aug, 54(3): 651-8.

Nakatsu CH, Fulthorpe RR, Holland BA, Peel MC, Wyndham RC.

The phylogenetic distribution of a transposable dioxygenase from the Niagara River watershed.
Mol. Ecol. 1995, 4: 593-603

Nelson K, Selander RK.

Evolutionary genetics of the proline permease gene (putP) and the control region of the proline utilization operon in populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 1992 Nov, 174(21): 6886-95.

Nelson K, Whittam TS, Selander RK.

Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (gapA) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1991 Aug 1, 88(15): 6667-71.

Netherwood T, Gilbert HJ, Parker DS, O'Donnell AG.

Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract.
Appl. Environ. Microbiol. 1999 Nov, 65(11): 5134-8.

Nielsen KM, Bones AM, van Elsas JD.

Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms.
Appl. Environ. Microbiol. 1997a, 63: 3972-77.

Nielsen KM, van Weerelt MD, Berg TN, Bones AM, Hagler AN, van Elsas JD.

Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms.
Appl. Environ. Microbiol. 1997b, 63: 1945-52.

Nielsen KM, Smalla K, van Elsas JD.

Natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms.
Appl. Environ. Microbiol. 2000b, Jan, 66(1): 206-12.

Nielsen KM, van Elsas JD, Smalla K.

Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413(pFG4DeltanptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants.
Appl. Environ. Microbiol. 2000a, Mar, 66(3): 1237-42.

Nijsten R, London N, van den Bogaard A, Stobberingh E.

In-vivo transfer of resistance plasmids in rat, human or pig-derived intestinal flora using a rat model.

J. Antimicrob. Chemother. 1995 Dec, 36(6): 975-85.

Nikolich MP, Hong G, Shoemaker NB, Salyers AA.

Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock.

Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60: 3255-3260.

Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y.

A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. 1980, Nucl. Acids Res. 18, 6169-6170.

Nnalue NA, Newton S, Stocker BA.

Lysogenization of *Salmonella choleraesuis* by phage 14 increases average length of O-antigen chains, serum resistance and intraperitoneal mouse virulence.

Microb. Pathog. 1990 Jun, 8(6): 393-402.

Noller HF.

Structure of ribosomal RNA.

Annu. Rev. Biochem. 1984, 53: 119-62.

Normander B, Christensen BB, Molin S, Kroer N.

Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*).

Appl. Environ. Microbiol. 1998 May, 64(5): 1902-9.

Nußlein K, Maris D, Timmis K, Dwyer DF.

Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* spp. introduced into activated sludge microcosms.

Appl. Environ. Microbiol. 1992, 58: 3380-86.

Ogunseitán OA, Sayler GS, Miller RV.

Application of DNA probes to analysis of bacteriophage distribution patterns in the environment.

Appl. Environ. Microbiol. 1992 Jun, 58(6): 2046-52.

Olsen RH, Siak JS, Gray RH.

Characteristics of PRD1, a plasmid-dependent broad host range DNA bacteriophage.

J. Virol. 1974 Sep, 14(3): 689-99.

Orbach MJ, Jackson EN.

Transfer of chimeric plasmids among *Salmonella typhimurium* strains by P22 transduction.

J. Bacteriol. 1982 Mar, 149(3):985-94.

Oren A, Bratbak G, Haldal M.

Occurrence of virus-like particles in the Dead Sea.
Extremophiles. 1997 Aug, 1(3): 143-9.

Paget E, Simonet P.

On the track of natural transformation in soil.
FEMS Microbiol. 1994, 15: 109-15.

Palmen R, Hellingwerf KJ.

Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus*- a review.
Gene 1997 Jun 11, 192(1): 179-90.

Paul JH, Thurmond JM, Frischer ME.

Gene transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation.
Appl. Environ. Microbiol. 1991a, 57: 1509-15.

Paul JH, Jiang SC, Rose JB.

Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration.
Appl. Environ. Microbiol. 1991b Aug, 57(8): 2197-204.

Paul JH, Thurmond JM, Frischer ME, Cannon JP.

Intergeneric natural plasmid transformation between *E. coli* and a marine *Vibrio* species.
Mol. Ecol. 1992 May, 1(1): 37-46.

Pearson WR, Lipman DJ.

Improved tools for biological sequence comparison.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1988 Apr, 85(8): 2444-8.

Peters M, Heinaru E, Talpsep E, Wand H, Stottmeister U, Heinaru A, Nurk A.

Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheBA, by different indigenous *Pseudomonas* species.
Appl. Environ. Microbiol. 1997 Dec, 63(12): 4899-906.

Pospiech A, Neumann B.

A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria.
Trends Genet. 1995 Jun, 11(6): 217-8.

Rainey PB, Bailey MJ, Thompson IP.

Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent pseudomonads isolated from field-grown sugar beet.
Microbiology. 1994 Sep, 140 (Pt 9): 2315-31.

Rayssiguier C, Thaler DS, Radman M.

The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants.

Nature 1989 Nov 23, 342(6248): 396-401.

Recorbet G, Picard C, Normand P, Simonet P.

Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil.

Appl. Environ. Microbiol. 1993 Dec, 59(12): 4289-94.

Recorbet G, Robert C, Givaudan A, Kudla B, Normand P, Faurie G.

Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis* sacB gene.

Appl. Environ. Microbiol. 1993 May, 59(5): 1361-6.

Ree HK, Zimmermann RA.

Organization and expression of the 16S, 23S and 5S ribosomal RNA genes from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*.

Nucleic Acids Res. 1990 Aug 11, 18(15): 4471-8.

Ripp S, Ogunseitan OA, Miller RV.

Transduction of a freshwater microbial community by a new *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage, UT1.

Mol. Ecol. 1994, 3: 121-26.

Rochelle PA, Day MJ, Fry JC.

Occurrence, transfer and mobilization in epilithic strains of *Acinetobacter* of mercury-resistance plasmids capable of transformation.

J. Gen. Microbiol. 1988 Nov, 134 (Pt 11): 2933-41.

Rolfe B, Holloway BW.

Alterations in host specificity of bacterial deoxyribonucleic acid after an increase in growth temperature of *Pseudomonas aeruginosa*.

J. Bacteriol. 1966 Jul, 92(1): 43-8.

Ronchel MC, Ramos-Diaz MA, Ramos JL.

Retrotransfer of DNA in the rhizosphere.

Environ. Microbiol. 2000 Jun, 2(3): 319-23.

Rosenberg SM, Thulin C, Harris RS.

Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature.

Genetics 1998 Apr, 148(4): 1559-66.

Rudolph C, Wanner G, Huber R.

Natural communities of novel *archaea* and *bacteria* growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology.
Appl. Environ. Microbiol. 2001 May, 67(5): 2336-44.

Salyers AA, Shoemaker NB.

Resistance gene transfer in anaerobes: New insights, new problems.
Clin. Infect. Dis. 1996, 23: 36-43.

Salyers AA, Shoemaker NB, Li LY.

In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize.
J. Bacteriol. 1995 Oct, 177(20): 5727-31.

Sandaa R-A, Enger E.

Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance.
Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60: 4234-38.

Sanderson KE, Roth JR.

Linkage map of *Salmonella typhimurium*. Edition IV.
Microbiol. Rev. 1983, 47: 410.

Sanderson KE, Hessel A, Rudd KE.

Genetic map of *Salmonella typhimurium*, edition VIII.
Microbiol Rev. 1995, 59(2): 241-303.

Sanz JL, Marin I, Ramirez L, Abad JP, Smith CL, Amils R.

Variable rRNA gene copies in extreme *halobacteria*.
Nucleic. Acids Res. 1988 Aug 25, 16(16): 7827-32.

Saye DJ, Ogunseitan OA, Sayler GS, Miller RV.

Transduction of linked chromosomal genes between *Pseudomonas aeruginosa* strains during incubation in situ in a freshwater habitat.
Appl. Environ. Microbiol. 1990, 56: 140-45.

Saye DJ, Ogunseitan O, Sayler GS, Miller RV.

Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment: effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*.
Appl. Environ. Microbiol. 1987 May, 53(5): 987-95.

Schicklmaier P.

Allgemein transduzierende Bakteriophagen bei *Salmonella typhimurium*. 1995,
Dissertationsarbeit.

Schicklmaier P, Moser E, Wieland T, Rabsch W, Schmieger H.

A comparative study on the frequency of prophages among natural isolates of *Salmonella* and *Escherichia coli* with emphasis on generalized transducers.

Antonie Van Leeuwenhoek. 1998 Jan, 73(1): 49-54.

Schicklmaier P, Schmieger H.

Sequence comparison of the genes for immunity, DNA replication, and cell lysis of the P22-related *Salmonella* phages ES18 and L.

Gene. 1997 Aug 11, 195(1): 93-100.

Schicklmaier P, Schmieger H.

Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella typhimurium* complex.

Appl. Environ. Microbiol. 1995 Apr, 61(4): 1637-40.

Schicklmaier P, Wieland T, Schmieger H.

Molecular characterization and module composition of P22-related *Salmonella* phage genomes.

J Biotechnol. 1999 Aug 20, 73(2-3): 185-94.

Schlegel HG.

Allgemeine Mikrobiologie. 1992, Georg Thime Verlag, Stuttgart.

Schmidt C, Schmieger H.

Selective transduction of recombinant plasmids with cloned pac sites by *Salmonella* phage P22.

Mol. Gen. Genet. 1984,196(1):123-8.

Schmidt H, Bielaszewska M, Karch H.

Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157: H7.

Appl. Environ. Microbiol. 1999 Sep, 65(9): 3855-61.

Schmidt TM.

Multiplicity of ribosomal RNS operons in prokaryotic genomes. 1998,

In: Bacterial Genomes; De Bruijn, FJ, Lupsky, JR, Weinstock GM (Hrsg.) Pp 221-29,

International Thompson Publishing, Capman & Hall, New York.

Schmieger H.

Pac sites are indispensable for *in vivo* packaging of DNA by phage P22.

Mol. Gen. Genet. 1984, 195: 252-5.

Schmieger H.

Packaging signals for phage P22 on the chromosome of *Salmonella typhimurium*.

Mol. Gen. Genet. 1982, 187(3): 516-8.

Schmieger H.

Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities.
Mol. Gen. Genet. 1972, 119(1): 75-88.

Scott KP, Flint HJ.

Transfer of plasmids between strains of *Escherichia coli* under rumen conditions.
J. Appl. Bacteriol. 1995 Feb, 78(2): 189-93.

Shen P, Huang HV.

Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology.
Genetics. 1986 Mar, 112(3): 441-57.

Smit E, Wolters A, van Elsas JD.

Self-transmissible mercury resistance plasmids with gene-mobilizing capacity in soil bacterial populations: influence of wheat roots and mercury addition.
Appl. Environ. Microbiol. 1998 Apr, 64(4): 1210-9.

Smith HO, Danner DB, Deich RA.

Genetic transformation.
Annu. Rev. Biochem. 1981, 50: 41-68.

Solomon JM, Grossman AD.

Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria.
Trends. Genet. 1996 Apr, 12(4): 150-5.

Sørensen SJ.

Transfer of plasmid RP4 from *Escherichia coli* K-12 to indigenous bacteria of seawater.
Microb. Releases 1993, 2: 135-41.

Sparling PF.

Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance.
J. Bacteriol. 1966 Nov, 92(5): 1364-71

Steisinger G, Emrich J, Stahl MM.

Chromosome structure in phage T4. III. Terminal redundancy and length determination.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1967, 57: 292-95.

Sternberg N, Hamilton D, Enquist L, Weisberg R.

A simple technique for the isolation of deletion mutants of phage lambda.
Gene. 1979 Dec, 8(1): 35-51.

Stewart GJ, Sinigalliano CD.

Exchange of chromosomal markers by natural transformation between the soil isolate, *Pseudomonas stutzeri* JM300, and the marine isolate, *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell.
Antonie Van Leeuwenhoek 1991, 59: 19-25.

Stocker BA.

Abortive transduction of motility in *Salmonella*: a nonreplicated gene transmitted through many generations to a single descendant.

J. Gen. Microbiol. 1956, 15: 575-98.

Stotzky G, Zeph LR, Devanas MA.

Factors affecting the transfer of genetic information among microorganisms in soil.

Biotechnology. 1991, 15: 95-122.

Strätz M, Mau M, Timmis KN.

System to study horizontal gene exchange among microorganisms without cultivation of recipients.

Mol. Microbiol. 1996 Oct, 22(2): 207-15.

Strotzky G.

Influence of soil colloids on metabolic processes, growth, and adhesion of microbes and viruses.

In: The Interaction of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. pp. 305-428. 1986,

Huang PM and Schnitzer M. (Hrsg.). Soil Science Society of America, Madison, WI.

Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, Scott D, Ronson CW.

Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92: 8985-89.

Sullivan JT, Ronson CW.

Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95: 5145-49.

Susskind MM, Botstein D, Wright A.

Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. III. Failure of superinfecting phage DNA to enter sieA⁺ lysogens.

Virology. 1974, 62: 350-66.

Susskind MM, Botstein D.

Molecular genetics of bacteriophage P22.

Microbiol. Rev. 1978 Jun, 42(2): 385-413.

Susskind MM, Wright A, Botstein D.

Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. II. Genetic evidence for two exclusion systems.

Virology. 1971, 45: 638-52.

Taylor AL

Bacteriophage-induced mutation in *E. coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1963, 50: 1043- 51.

Top E, Mergeay M, Springael D, Verstraete W.

Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples.
Appl. Environ. Microbiol. 1990 Aug, 56(8): 2471-9.

Uetake H, Hagiwara S.

Phenotypic mixing as a mechanism of conversion gene transfer.
Virology. 1972 Jan, 47(1): 48-53.

Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K.

Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis.
Microbiology. 1999 Nov, 145 (Pt 11): 3305-15.

Van der Meer JR, de Vos WM, Harayama S, Zhender AJB.

Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.
Microbiol. Rev. 1992, 56: 677-94.

van Veen JA, van Overbeek LS, van Elsas JD.

Fate and activity of microorganisms introduced into soil.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997, 61: 121-35.

Veal DA, Stokes HW, Grant D.

Genetic exchange in natural communities.
Adv. Microb. Ecol. 1992, 12: 383-430.

Vogel W, Schmieger H.

Selection of bacterial pac sites recognized by *Salmonella* phage P22.
Mol. Gen. Genet. 1986 Dec, 205(3): 563-7.

Walker GC.

Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*.
Microbiol. Rev. 1984 Mar, 48(1): 60-93.

Wang GC, Wang Y.

The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species.
Microbiology. 1996 May, 142 (Pt 5): 1107-14.

Watanabe K, Sato M.

Plasmid-mediated gene transfer between insect-resident bacteria, *Enterobacter cloacae*, and plant-epiphytic bacteria, *Erwinia herbicola*, in guts of silkworm larvae.
Curr. Microbiol. 1998 Nov, 37(5): 352-5.

Watanabe K, Watanabe K, Kodama Y, Syutsubo K, Harayama S.

Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities.
Appl. Environ. Microbiol. 2000 Nov, 66(11): 4803-9.

Weil J, Cunningham R, Martin R 3rd, Mitchell E, Bolling B.

Characteristics of lambda p4, a lambda derivative containing 9 per cent excess DNA.
Virology. 1972 Nov, 50(2): 373-80.

Weisberg RA.

Specialized transduction. In: "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*" Cellular and molecular biology. 1996, Neidhard FC (Hrsg.). American Society for Microbiology. Washington D.C. USA: 2242-48.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ.

16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.
J. Bacteriol. 1991 Jan, 173(2): 697-703.

Williams HG, Day MJ, Fry JC, Stewart GJ.

Natural transformation in river epilithon.
Appl. Environ. Microbiol. 1996 Aug, 62(8): 2994-8.

Wirth R, Muscholl A, Wanner G.

The role of pheromones in bacterial interactions.
Trends Microbiol. 1996 Mar, 4(3): 96-103.

Wyndham RC, Nakatsu C, Peel M, Cashore A, Ng J, Szilagyi F.

Distribution of the catabolic transposon Tn5271 in a groundwater bioremediation system.
Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60: 86-93.

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene. 1985, 33(1): 103-19.

Zeph LR, Onaga MA, Stotzky G.

Transduction of *Escherichia coli* by bacteriophage P1 in soil.
Appl. Environ. Microbiol. 1988 Jul, 54(7): 1731-7.

Zinder ND, Lederberg J.

Genetic exchange in *Salmonella*.
J. Bact. 1952, 64: 679-99.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all denen, die mir während der letzten Jahre zur Seite standen und das Entstehen und die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst Schmieger für die Überlassung des Themas, sein Interesse an dieser Arbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Petra Schicklmaier, die auch nach ihrem Verlassen der Arbeitsgruppe immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Larysa Ivanova danke ich für die tatkräftige Unterstützung, besonders gegen Ende der experimentellen Phase dieser Arbeit, und für das nette Klima in unserer finalen Zweimanngruppe.

Martha Bunk schulde ich besonderen Dank für die Korrektur dieser Arbeit.

Martina Quirling und Gerrit Vollmer danke ich für viele lustige Stunden während ihrer Zeit in der Arbeitsgruppe und besonders dafür, daß sie auch danach dafür gesorgt haben, daß ich nicht ganz vereinsame.

Danken möchte ich auch Sandra Cvetanovič, Martina Müller und Holger Laux, ohne deren Einsatz ein reibungsloser Ablauf unseres geliebten Med.-Praktikums in der Endphase nur schwer möglich gewesen wäre, und nicht zuletzt Anette Zimmer, Brigitte Zavari und Ute Bergmann für das gute Arbeitsklima im Labor.

Herrn Patek danke ich für die Unterstützung bei der Entnahme der Proben aus der Kläranlage "Gut Marienhof", Herrn Glaz für die Bereitstellung der Proben aus Pforzheim und Herrn Dr. Huber für interessante Stunden im Sippenauer Moor und die Unterstützung bei der Sequenzauswertung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und ganz besonders bei Nikolaus bedanken für die unendliche Unterstützung.

Lebenslauf**Michaela Sander**, geb. Britzelmeir

12. November 1968	Geboren in Donauwörth
1975 – 1979	Grundschule Donauwörth
1979 – 1990	Gymnasium Donauwörth
Juni 1990	Allgemeine Hochschulreife
1990 – 1997	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1996 - 1997	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Martinsried Abteilung Neuroimmunologie unter Leitung von Herrn Dr. habil. D. E. Jenne, Titel der Arbeit: "Klonierung und Expression der proteinkodierenden Sequenz des ROSA β geo 22-Gens von Mensch und Maus"
Februar 1997	Diplom in Biologie in den Fächern Anthropologie und Humangenetik, Immunologie, Genetik und Biochemie
seit August 1997	Dissertation am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Schmieger