

Genomvariabilität bei lambdoiden *Salmonella*-Phagen

Untersuchungen zum Austausch und zur Vielfalt von Modulen am Beispiel der Lysisgenkassette

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Annette Zimmer
aus Scheuring

Juli 2001

Die Dissertation wurde der Fakultät am 2.7.2001 zur Beurteilung eingereicht.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 4.6.2002

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillinresistenz
bp	Basenpaar(e)
C	ringförmig
ca.	circa
CIA	Chloroform-Isoamyl-Alkohol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
∅	Durchmesser
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. (coli)</i>	<i>Escherichia (coli)</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
gp	Genprodukt
h	Stunde(n)
Hrsg.	Herausgeber
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
L	linear
M	Mol
m	Milli (-gramm, -liter, -mol)
μ	Mikro (-gramm, -liter, -mol)
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Infektionsmultiplizität
n	Nano (-gramm, -liter, -mol)
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblue-tetrazoliumsaz
nt	Nukleotide
OD _{580 nm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
S	superhelikal
<i>S. (typhimurium)</i>	<i>Salmonella (typhimurium)</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
seg	segmentiert
ss	einzelsträngig
syn	synonym
Tab.	Tabelle
TMD	Transmembrandomäne
U	Einheit
u. a.	unter anderem
Upm	Umdrehunge(n) pro Minute
VF	Verdünnungsflüssigkeit
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
X-Phosphat	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Phagentaxonomie und ihre Probleme	1
1.2.	Die lambdaoide Familie	5
1.2.1.	Der Begriff der lambdaoiden Familie	5
1.2.2.	Die Phagen λ und P22: Unterschiede und Gemeinsamkeiten	6
1.2.3.	Die Genomstruktur lambdaoider Phagen	14
1.3.	Die Evolution der lambdaoiden Phagen	18
1.3.1.	Die Theorie der modularen Evolution	18
1.3.2.	Die Bedeutung der Modultheorie für die Phagenevolution	20
1.4.	Die Ziele dieser Arbeit	24
2.	Material und Methoden	27
2.1.	Bakterienstämme	27
2.1.1.	Laborstämme	27
2.1.2.	<i>Salmonella</i> -Naturisolate	28
2.2.	Bakteriophagen	29
2.2.1.	Labor-Phagen	29
2.2.2.	Phagen aus Naturisolaten	29
2.2.	Vektoren	30
2.4.	Plasmide	30
2.5.	Oligonukleotide	32
2.6.	Enzyme	33
2.7.	Chemikalien	33
2.8.	Sonstiges	34
2.9.	Medien	35
2.10.	Puffer und Lösungen	36
2.11.	Phagenisolierung und Vermehrung	38
2.11.1.	Einzelplaque-Isolierung	38
2.11.2.	Flüssiglysate	38
2.11.3.	Plattenlysate	39
2.11.4.	Titerbestimmung	39
2.11.5.	Konzentrierung von Phagen durch Ultrazentrifugation	40
2.11.6.	Vermehrung und Konzentrierung von λ -Phagen durch Induktion	40
2.11.7.	Lysogenisierung	41
2.12.	Isolierung und Bearbeitung von Nukleinsäuren	41
2.12.1.	Isolierung von Phagen-DNA	41
2.12.2.	Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly [<i>Birnboim und Doly, 1979</i>]	42
2.12.3.	Plasmidpräparation über Ionenaustauscher	42
2.12.4.	DNA-Spaltung	43
2.13.	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	43
2.14.	Agarosegelelektrophorese	43
2.15.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	44
2.16.	Hybridisierungen	44
2.16.1.	Nichtradioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin-11-dUtp	44
2.16.2.	Transfer von DNA auf Nylonmembran (Southern-Blot nach Smith [<i>Smith, 1980</i>])	44
2.16.3.	Dot-Blot	45
2.16.4.	Plaque-Lift	45
2.16.5.	Hybridisierung	45
2.17.	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	46
2.18.	Klonierung von PCR-Produkten	46
2.19.	DNA-Sequenzierung	46
2.20.	Strukturanalysen	46

3.	Entstehung neuer Modulkombinationen unter Laborbedingungen	47
3.A.	Ergebnisse	49
3.A.1.	Charakterisierung der beteiligten Phagen	49
3.A.1.1.	Hybridisierungsexperimente zum Vergleich des Genoms von G119 mit den Genomen von ES18 und P22	49
3.A.1.2.	Vermehrungsfähigkeit von ES18 und P22 auf <i>Salmonella typhimurium</i> 119	57
3.A.1.3.	Lysogenisierung von DB21 mit G119	58
3.A.1.4.	Isolierung der Klarplaquemutante PGV1	58
3.A.2.	Untersuchungen zur Rolle des Antirepressors bei der Superinfektion einer lysogenen Wirtszelle	60
3.A.2.1.	Rekombinantenhäufigkeit bei Superinfektion von <i>Salmonella typhimurium</i> 119(G119) mit ES18 (MOI = 0,01 / 0,5)	60
3.A.2.2.	Rekombinantenhäufigkeit bei Superinfektion von DB21(G119) mit P22-H1 (MOI = 0,01 / 0,5)	63
3.A.2.3.	Genomstruktur der G119/P22-H1-Rekombinanten (MOI = 0,01 / 0,5)	64
3.A.3.	Untersuchungen zur Entstehung rekombinanter Phagen-nachkommen bei der Superinfektion einer lysogenen Bakterienzelle durch temperente Bakteriophagen und ihre Klarplaquemutanten	71
3.A.3.1.	Rekombinantenhäufigkeit bei Superinfektion von <i>Salmonella typhimurium</i> 119(G119) mit ES18 bzw. PGV1 (MOI 3)	71
3.A.3.2.	Rekombinantenhäufigkeit bei Superinfektion von DB21(PS119) mit P22-H1 bzw. P22-H5 (MOI 3)	71
3.A.3.3.	Genomstruktur der G119/P22-H1- und G119/P22-H5-Rekombinanten (MOI 3)	72
3.A.4.	Zusammenfassende Darstellung der Hybridisierungsergebnisse aus 3.A.2 und 3.A.3	72
3.B.	Diskussion	74
•	Häufigkeit der Rekombinanten	76
•	Einfluß der <i>Multiplicity of Infection</i> (MOI)	78
•	Einfluß des Antirepressors von P22	78
•	Einfluß der rekombinanten Nachkommenphagen an der Neukombination von Modulen in den nachfolgenden Generationen	79
•	Modulkombinationen in unterschiedlichen Phagengenerationen	80
4.	Evolution auf Modulebene in einer natürlichen Phagenpopulation	84
4.A.	Ergebnisse	85
4.A.1.	Module der Lysisgenkassette in einer natürlichen Population lambdoider <i>Salmonella</i> -Phagen	85
4.A.1.1.	Lysisgene lambdoider Bakteriophagen	85
4.A.2.	Untersuchung der Lysisgene von 46 Phagen aus Naturisolaten von <i>Salmonella typhimurium</i>	95
4.A.2.1.	Identifizierung der Lysisgene des Phagen PS34	97
4.A.2.2.	Homologien des sequenzierten 6,7 kb-Bereiches von PS34 zu P22, λ und Phage 21	102
4.A.2.3.	Überprüfung der Lysisgene der restlichen 45 Phagen mit Hybridisierungssonden aus den Lysisgenen des Phagen PS34	107
4.A.2.4.	Identifizierung der Lysisgene des Phagen PS3	107
4.A.2.5.	Homologien des sequenzierten 3,5 kb-Bereiches von PS3 zu P22, λ und Phage 21	112
4.A.2.6.	Sequenzanalyse der Gene 15_{P22} , 15_{λ} , 15_{ES18} , $15_{Phage21}$, 15_{PS3} und 15_{PS34}	115
4.A.3.	Strukturanalyse der Gene 13_{PS3} und 13_{PS34}	117
4.A.4.	Funktionalitätstest der Genprodukte 13 der Phagen PS3 und PS34	120

4.A.4.1.	Klonierung der Hologene 13 der Phagen PS3 und PS34	120
4.A.4.2.	Komplementationstest	124
4.A.5.	Modulkombinationen innerhalb der Lysisgenkassette lambdoider Bakteriophagen	127
4.B.	Diskussion	129
4.B.1.	Die Lysisgenkassette der lambdoiden Bakteriophagen	130
•	Die Allele des Gens 13 der lambdoiden Bakteriophagen	130
•	Die Allele des Gens 19 der lambdoiden Bakteriophagen	131
•	Die Allele des Gens 15 der lambdoiden Bakteriophagen	131
•	Modulkombinationen innerhalb der Lysisgenkassette	133
4.B.2.	Die Modultheorie von Botstein am Beispiel der Lysisgenkassette lambdoider Bakteriophagen	138
•	Der Modulbegriff	138
•	Die Linker-Hypothese	139
4.B.3.	Wieviele verschiedene lambdoide Bakteriophagen können theoretisch existieren?	143
5.	Evolution auf Nukleotidebene bei lambdoiden Bacteriophagen	146
5.A.	Ergebnisse	150
5.A.1.	Sequenzanalyse der Gene 3 lambdoider Bakteriophagen	150
5.B.	Diskussion	153
6.	Zusammenfassung	159
7.	Literaturverzeichnis	162

1. Einleitung

1.1. Die Phagentaxonomie und ihre Probleme

"Was ist ein Bakteriophage?" – Die Beantwortung dieser Frage erscheint zunächst sehr einfach, bei näherer Betrachtung beinhaltet sie jedoch eine Reihe weiterer Fragen.

Eine grundlegende Definition eines *Bakteriophagen* ist schnell gefunden. Der Begriff "Bakteriophage" oder "Phage" wurde 1917 von D'Hérelle eingeführt und bedeutet nichts anderes als "Bakterienfresser", abgeleitet von dem griechischen Wort "φάγειν" für "fressen, verzehren" [D'Hérelle, 1917].

In der 258. Auflage des medizinischen Standardlexikons Pschyrembel kann man unter dem Stichwort "Bakteriophagen" nachlesen: "...syn. Phagen; Viren*, die sich in Bakterien* vermehren.". Schlägt man als nächstes unter dem Stichwort "Viren" nach, so findet man Folgendes: "... Sammelbezeichnung für biologische Strukturen (...) mit folgenden gemeinsamen Merkmalen: 1. enthalten als genetische Information nur entweder DNA oder RNA; 2. verfügen nicht über die für Wachstum und Teilung erforderlichen Enzyme, sondern bedürfen dazu (meist spezifischer) Wirtszellen (...), auf die sie häufig pathogen wirken. ..." [Pschyrembel, 1998].

Bis hierher eine eindeutige Definition, die jedoch aufgrund der Vielzahl der heute bekannten Bakteriophagen bei weitem nicht zur genauen Beschreibung eines Phagen ausreicht. Die zu Beginn gestellte Frage muß aus heutiger Sicht lauten: **"Wie charakterisiere ich einen Bakteriophagen, insbesondere einen neuen Bakteriophagen?"** In den Anfangsjahren der Phagenforschung stellte dies noch kein großes Problem dar. Für D'Hérelle existierte im Jahre 1921 nur ein einziger Phage mit vielen "Rassen", das *Bacteriophagum intestinale* [D'Hérelle, 1921].

Seitdem sind etwa 4500 Phagen elektronenmikroskopisch untersucht worden. Man kennt ca. 1500 Phagen, die zur Einordnung bakterieller Erreger in einzelne Subspezies herangezogen werden (Lysotypie). Nicht zu vergessen sind auch zahlreiche defekte Phagen, sowie eine ganze Reihe von Phagen, die im Rahmen ökologischer Untersuchungen charakterisiert wurden [Ackermann, 1991; Ackermann, 1996]. Nach der Zahl der Beschreibungen stellen die Bakteriophagen heute zahlenmäßig die größte aller Virusgruppen dar.

Bereits 1930 fanden erste Versuche statt, ein einheitliches Nomenklatur- und Taxonomie-system für Viren aufzustellen [Matthews, 1985]. Heute ist das *International Committee on*

Taxonomy of Viruses (ICTV) für das allgemein gültige taxonomische System von Viren verantwortlich. Dieses geht hauptsächlich auf eine klassische Arbeit von Bradley aus dem Jahre 1967 zurück, in der die Phagen in sechs Grundtypen eingeteilt wurden [Bradley, 1967]. Ackermann und Eisenstark nahmen im Jahre 1974 aufgrund neu entdeckter Phagentypen eine weitere Aufgliederung des Bradley'schen Originalschemas vor [Ackermann und Eisenstark, 1974]. Heute unterteilt man die Phagen in 4 Gruppen, 12 Familien und 12 Gattungen. Bei der Einteilung spielen vor allem folgende Kriterien eine Rolle: Art der Nukleinsäure, Beschaffenheit und Größe des Phagenschwanzes, Kapsid-Symmetrie und Vorhandensein oder Fehlen einer Lipoproteinhülle. Aber auch Wirtsbereich, Infektionsstrategie, Morphogenese sowie Sensitivität gegenüber chemischen und physikalischen Agentien werden bei der Einordnung eines Phagen berücksichtigt [Ackermann, 1983]. **Tab. 1.1.** zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften der heutigen Phagenfamilien und -gattungen.

Nach Ackermann ist Taxonomie "*Ordnung, Vergleich, Verallgemeinerung und Vereinfachung*". Den Sinn der Phagentaxonomie sieht er darin, "*Ordnung in ein Chaos von Tausenden von Isolaten zu bringen und daraus allgemeine Erkenntnisse und ein Bestimmungssystem abzuleiten*" [Ackermann, 1991]. Ob das mit Hilfe des derzeit bestehenden Taxonomiesystems gelingen wird, ist allerdings fraglich. Die Probleme der Phagentaxonomie werden in den folgenden Ausführungen verdeutlicht:

Die höchste taxonomische Einheit ist die Gruppe, es folgen die Familie, die Gattung und schließlich die Art. Nicht alle Familien werden jedoch in Gattungen eingeteilt. Die größte Phagengruppe (ca. 96 % aller Phagen) stellen mit den drei Familien *Myoviridae*, *Siphoviridae* und *Podoviridae* die geschwänzten Phagen dar [Ackermann, 1996]. Umso erstaunlicher ist es, daß bis heute für diese umfangreichste Gruppe noch keine Aufstellung von Gattungen vorgenommen wurde, da man sich nicht auf ein geeignetes Kriterium einigen konnte. Stattdessen wird diskutiert, die drei Familien nach einem Vorschlag von Lwoff [Lwoff, 1966] zu einer Ordnung zusammenzufassen oder aber sie zu einer Familie mit drei Unterfamilien abzuwerten [Ackermann, 1991].

Die Definition der Phagen-Art bereitet ebenfalls große Schwierigkeiten [Ackermann et al., 1992]. Viele Virologen sind der Meinung, daß die "biologische Artdefinition" von Mayr [Mayr, 1940; Mayr, 1982] nicht auf Viren angewendet werden kann, da bei diesen die geforderte reproduktive Isolation nicht gegeben ist. Bevorzugt wird das *polythetische* Konzept, das eine Art als Gruppe von Individuen mit einem Set unterschiedlicher Eigenschaften ansieht, die vollständig oder nur teilweise in den einzelnen Vertretern vorhanden sein müssen [Beckner, 1959].

Morphologie	Nukleinsäure	Familie	Gattung	Besonderheiten	Beispiel	Anzahl der Vertreter
geschwänzt	DNA, ds, L	Myoviridae	-	kontraktiler Schwanz	T4	1073
		Siphoviridae	-	langer, nicht kontraktiler Schwanz	λ	2708
		Podoviridae	-	kurzer Schwanz	T7, P22	608
isometrisch	DNA, ss, C	Microviridae	Microvirus	auffällige Kapsomere	φX174	40
			Spiromicrovirus		SV4	5
	DNA, ds, C, S	Corticoviridae	Corticovirus	mehrschichtiges Kapsid, Lipidhülle	PM2	3?
	DNA, ds, L	Tectiviridae	Tectivirus	doppeltes Kapsid, Lipide, Pseudoschwanz	PRD1	14
	RNA, ss, L	Leviviridae	Levivirus		MS2	37
			Allolevivirus		Qβ	1
filamentös	RNA, ds, L, seg	Cystoviridae	Cystovirus	Lipidhülle	φ6	1
	DNA, ss, C	Inoviridae	Inovirus	lange Filamente	fd	32
			Plectovirus	kurze Stäbchen	L51	15
pleomorph	DNA, ds, L	Lipothrixviridae	Lipothrixvirus	Lipidhülle	TTV1	4
	DNA, ds, C, S	Plasmaviridae	Plasmavirus	Lipidhülle, kein Kapsid	MVL2	6
		Fuselloviridae	Fusellovirus	zitronenförmig	SSV1	4

Tab.1.1.1.: Wichtige Eigenschaften und Häufigkeit von Phagenfamilien und Gattungen [modifiziert nach Ackermann, 1991]
 ds – doppelsträngig, ss – einzelsträngig, C – ringförmig, L – linear, S – superhelikal, seg – segmentiert

Auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bakteriophagen gehören zur großen Gruppe der geschwänzten Phagen. Zwei prominente Vertreter, die Phagen P22 und Lambda (λ), stehen, wie in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich dargestellt wird, in engem verwandtschaftlichen Verhältnis zueinander. Ihre Homologien reichen bei einzelnen Genen bis zur Sequenzebene hinab und sie können, zumindest unter Laborbedingungen, Teile ihres Genoms untereinander austauschen. Dennoch wurden sie alleine aufgrund unterschiedlicher morphologischer Merkmale verschiedenen Familien zugeordnet: P22 gehört zur Familie der *Podoviridae* (doppelsträngige lineare DNA, kurzer Schwanz), λ hingegen zur Familie der *Siphoviridae* (doppelsträngige lineare DNA, langer, nicht kontraktiler Schwanz) [Maurin et al., 1984]. Spätestens hier muß man sich fragen, ob es überhaupt sinnvoll ist, die für höhere Organismen gültige und bewährte Klassifizierung auf Phagen und Viren zu übertragen.

Neben den oben beschriebenen Problemen kämpfen die Phagentaxonomien zusätzlich mit Schwierigkeiten, die auf die Phagen selbst und die Methoden, mit deren Hilfe sie charakterisiert wurden, zurückgehen. Außerdem sind die einzelnen Phagentaxonomien von sehr unterschiedlicher Größe, zudem wurden sie mit sehr unterschiedlicher Intensität untersucht. Einigkeit auf dem Gebiet der Phagentaxonomie besteht seit ihren Anfängen nur darin, daß sie in ihrer heutigen Form keinerlei Aussage hinsichtlich Evolution und Phylogenie der Phagen zuläßt [Matthews, 1985].

Hat man es dennoch nach einigen Schwierigkeiten unter Berücksichtigung aller oben beschriebenen Kriterien geschafft, einen neuen Phagen in das heute allgemein gültige Taxonomiesystem einzuordnen, so muß man feststellen, daß die Frage nach der Charakterisierung eines Bakteriophagen nunmehr lauten muß **"Handelt es sich um einen neuen oder um einen bereits bekannten Bakteriophagen?"**. Auch in Bezug auf die Mehrfachbeschreibung einzelner Phagen existieren durchaus grundlegend unterschiedliche Meinungen. Nach Klaus et al. sind wiederholte Beschreibungen einzelner Phagen und synonyme Bezeichnungen häufig, da sich die Phagenforschung ohne einheitliche Nomenklatur, ohne standardisierte Methoden und ohne Sammlung von Referenzstämmen entwickelt hat [Klaus et al., 1992]. Casjens schreibt jedoch, daß man kaum einmal ein Naturisolat findet, das sich nicht in irgendeinem Kriterium von den bereits isolierten Phagen unterscheidet [Casjens et al., 1992a].

Hier stellt sich nun die Frage, wieviele gemeinsame Merkmale zwei Phagen besitzen müssen, um wirklich als identisch angesehen zu werden. Man steht vor dem Problem, den neuen Phagen von ähnlichen, bereits beschriebenen Phagen in der betreffenden Bakteriengattung eindeutig abzugrenzen:

- Ist der Phage, der in allen biologischen Kriterien mit einem bereits beschriebenen Phagen übereinstimmt, dessen DNA aber ein anderes Restriktionsmuster aufweist, tatsächlich ein neuer Phage?
- Sind Phagen mit gleichen Restriktionsmustern automatisch identisch?
- Gehört ein Phage tatsächlich aufgrund seiner Morphologie einer bestimmten Familie an, auch wenn er nachweislich einige Gene von Phagen aus anderen Familien besitzt (vgl. Abschnitt 1.2.3.: Phage ES18)?

Letztendlich muß eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt werden, bevor die schwierige Frage, ob es sich tatsächlich um einen neuen oder um einen bereits bekannten Bakteriophagen handelt, beantwortet werden kann.

1.2. Die lambdoide Familie

1.2.1. Der Begriff der lambdoiden Familie

Aufgrund der beschriebenen Problematik hat sich für einen Teil der geschwänzten Phagen ein neuer Begriff etabliert, der Begriff der lambdoiden Familie (abgeleitet von dem prominentesten Mitglied λ).

Diese Bezeichnung wird jedoch nicht im Sinne einer taxonomischen Familie verwendet, sondern umfaßt eine große Anzahl ähnlicher temperenter Phagen, die alle die gleiche Genomorganisation und den gleichen Lebenszyklus besitzen. Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bakteriophagen sind Mitglieder der lambdoiden Familie.

Die temperenten Bakteriophagen haben je nach dem physiologischen Zustand der Wirtszelle, der MOI (*Multiplicity Of Infection*, Verhältnis Phagen : Bakterien) und äußeren Bedingungen die Möglichkeit, eines von zwei grundlegend verschiedenen Entwicklungsprogrammen zu durchlaufen: den lytischen Zyklus oder die Lysogenie. Die Entscheidung hierzu wird während der frühen Infektionsphase getroffen. Im lytischen Zyklus kommt es dann unmittelbar zur Replikation des Phagengenoms, zur Synthese neuer Kopf- und Schwanzproteine und zum Zusammenbau neuer Phagenpartikel. Etwa 45 Minuten nach der Infektion werden ca. 100 Phagennachkommen durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt. Im Gegensatz dazu wird bei der Lysogenie die vegetative Phagenentwicklung unterdrückt. Die Phagen-DNA wird dann in den meisten Fällen in das Wirtschromosom integriert, gemeinsam mit diesem repliziert und

an die Nachkommenzellen weitergegeben, genauso wie die chromosomalen Gene des Bakteriums. Das in die Wirtszelle integrierte, reprimierte Phagengenom wird als Prophage bezeichnet, die Zelle, die den Prophagen beherbergt, als lysogen.

Den temperenten Phagen stehen die virulenten Phagen gegenüber, die nicht zwischen den beiden beschriebenen Entwicklungswegen wählen können, sondern in jedem Fall sofort nach der Infektion des Bakteriums mit dem lytischen Zyklus beginnen.

Für einige Mitglieder der lambdoiden Familie wurde gezeigt, daß sie miteinander in genetischem Austausch stehen und Gene oder Gengruppen untereinander auswechseln können [Campbell und Botstein, 1983].

Campbell und Botstein fordern als Zugehörigkeitskriterium für die lambdaoide Familie die Fähigkeit zum Austausch genetischer Information mit Lambda durch homologe Rekombination. Diese Bedingung erfüllen nicht nur Phagen, die als natürlichen Wirt *Escherichia coli* besitzen (wie λ selbst), sondern auch Phagen, deren natürlicher Wirt *Salmonella typhimurium* ist (wie z. B. P22) [Campbell und Botstein, 1983]. Die Fähigkeit der beiden Phagen λ und P22, ihre Replikations- und Rekombinationsgene sowie ihre Immunitäts- und späten Kontrollgene untereinander auszutauschen, konnte von verschiedenen Autoren unter bestimmten Laborbedingungen (vgl. Abschnitt 1.2.3.) gezeigt werden [Backhaus und Petri, 1984; Botstein und Herskowitz, 1974; Hilliker und Botstein, 1976].

Die Lambdoiden gliedern sich in zwei große Gruppen, die nach einem Vorschlag von Schicklmaier und Schmieger [Schicklmaier und Schmieger, 1997] als **λ -Ast** (z. B. λ , Phage $\Phi 80$, Phage 21, Phage 434) und **P22-Ast** (z. B. P22, Phage L, Phage LP7, Phage ES18) der Familie bezeichnet werden. Auf die zwei bekanntesten Vertreter der lambdoiden Familie, die stellvertretend für die beiden Äste stehen, wird im Folgenden kurz eingegangen.

1.2.2. Die Phagen λ und P22: Unterschiede und Gemeinsamkeiten

Einen Überblick über die wichtigsten Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Phagen P22 und λ zeigt **Tab. 1.2.** Die für beide Phagen unterschiedlichen Bezeichnungen für

	Lambda	P22
Gruppe	geschwänzte Phagen	geschwänzte Phagen
Familie	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>
Morphologie und DNA-Struktur	ikosaederförmiger Kopf ($\varnothing = 54\text{nm}$) flexibler, 150nm langer Schwanz ds DNA Genomgröße 48.502bp	ikosaederförmiger Kopf ($\varnothing = 60\text{nm}$) kurzer, 20nm langer Schwanz ds DNA Genomgröße 41.727bp
Wirt	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
Lebensform	temperent Entscheidung zwischen Lyse und Lyso-genie während Infektion des Wirtes Integration der Prophagen-DNA über zirkulare DNA-Zwischenstufe	temperent Entscheidung zwischen Lyse und Lyso-genie während Infektion des Wirtes Integration der Prophagen-DNA über zirkulare DNA-Zwischenstufe
Verpackungsmechanismus	Verpackung von linearer, ds DNA über cos-sites (identische Monomere)	Verpackung von linearer, ds DNA über pac-sites ("headful"-Mechanismus) terminale Redundanz (ca. 5%) zirkuläre Permutation
Transduktion	speziell	generell, speziell
Immunitätsregionen	ImmC	ImmC ImmI
Genomaufbau	Module in fester Anordnung	Module in fester Anordnung

Tab. 1.2.: Gemeinsamkeiten und **Unterschiede** der Phagen Lambda und P22

die wichtigsten analogen Gene sind in **Tab. 1.3.** dargestellt. Im Folgenden werden für die einzelnen Gene und Genprodukte die Bezeichnungen von P22 verwendet, wenn nicht explizit von Genen des Phagen λ die Rede ist.

Der temperente Phage λ ist das prominenteste Mitglied der Lambdoiden. Er repräsentiert den λ -Ast der Familie, der sich in *Escherichia coli* etabliert hat. 1946 von Lederberg und Tatum entdeckt [Lederberg, 1951], zählt er heute, nach mehr als 50 Jahren intensiver Forschung, zu den am besten untersuchten Bakteriophagen. Wir verdanken ihm einen Großteil unseres Wissens über die Regulation der Genexpression bei Prokaryonten. Übersichten hierzu findet man bei Friedman [Friedman, 1988] und Ptashne [Ptashne, 1989]. Lambda besitzt einen ikosaederförmigen Kopf mit einem Durchmesser von 54 nm und einen flexiblen 150 nm langen Schwanz. Es handelt sich um ein Virus mit doppelsträngiger DNA von 48.502 Basenpaaren (bp), deren Sequenz vollständig bekannt ist [Sanger et al., 1982].

Auch der Phage P22 ist ein temperenter Phage. Er repräsentiert den P22-Ast der lambdoiden Familie, der sich in *Salmonella typhimurium* etabliert hat. Er ist heute wohl der bekannteste und am besten untersuchte Vertreter dieses Astes der Lambdoiden. Erstmals

Genbezeichnung bei λ	Funktion	analoges Gen bei P22
<i>Nu1</i> <i>A</i> <i>W</i> <i>B</i> <i>C</i> <i>Nu3</i> <i>D</i> <i>E</i> <i>FI</i> <i>FII</i> <i>Z</i> <i>U</i>	Kopfsynthese DNA-Verpackung DNA-Injektion Kopf-Vorstufe Haupt-Kapsidprotein	3 2 7, 16, 20 1 8 5 5 7, 16, 20
<i>V</i> <i>G</i> <i>T</i> <i>M</i> <i>L</i> <i>K</i> <i>I</i> <i>J</i>	Schwanz-Synthese Haupt-Schwanzprotein Wirtsbereich, Schwanzspitze	9
<i>int</i> <i>xis</i>	Integration, Exzision Exzision	<i>int</i> <i>xis</i>
<i>exo</i> <i>bet</i>	homologe Rekombination	<i>erf</i> <i>erf</i>
<i>O</i> <i>P</i>	DNA-Replikation	18 12
<i>S</i> <i>R</i> <i>Rz</i>	Lyse Holin Endolysin	13 19 15
<i>gam</i> <i>kil</i> <i>cIII</i> <i>ssb</i> <i>ral</i> <i>sieB</i> <i>N</i> <i>cl</i> <i>cro</i> <i>cII</i> <i>Q</i>	Modulation der Wirts-RecBCD-Nuklease Zelltod nach Prophageninduktion Errichtung der Lysogenie ssDNA-Bindungsprotein Modulation der <i>EcoK-EcoB</i> -spezifischen Restriktion-Modifikation Superinfektionsausschluß Antiterminator (frühe Transkription) Repressor (Erhaltung der Lysogenie) Repressor-Antagonist (frühe Transkriptionskontrolle) Errichtung der Lysogenie Antiterminator (späte Transkription)	<i>abc1, abc2</i> <i>c3</i> <i>ral</i> <i>sieB</i> 24 <i>c2</i> <i>cro</i> <i>c1</i> 23

Tab. 1.3.: Funktion einiger Gene des Phagen λ und analoge Gene in P22
(modifiziert nach [Klaus et al., 1992])

beschrieben wurde er 1952 im Zusammenhang mit der Entdeckung der generellen Transduktion von Zinder und Lederberg [Zinder und Lederberg, 1952]. P22 ist ebenfalls ein doppelsträngiges DNA-Virus. Hinsichtlich seiner Genomgröße von 41.727 bp ähnelt er dem Phagen λ , auch sein Genom wurde vollständig sequenziert. Morphologisch gleicht er λ nur

in Bezug auf seinen ikosaederförmigen Kopf mit einem Durchmesser von 60 nm [Anderson, 1960]. Im Unterschied zu λ besitzt er jedoch nur eine kurze Schwanz- oder Basisplattenstruktur, die einen dünnen 20 nm langen Fortsatz trägt [Suskind und Botstein, 1978]. Während bei λ am Aufbau der komplexen Schwanzkonstruktion elf verschiedene Genprodukte beteiligt sind, ist die hexagonale Basisplatte von P22 aus Kopien eines einzigen Genprodukts zusammengesetzt [Katsura, 1983; Israel et al., 1967; Botstein et al., 1973].

Bei beiden Phagen erfolgt die Replikation der DNA über einen "rolling-circle"-Mechanismus, hierbei entsteht ein konkatemeres Molekül. Dieses muß vor der Verpackung als lineares doppelsträngiges Monomer durch spezifische Nukleasen geschnitten werden. Hierbei bestehen zwischen den beiden Phagen P22 und λ grundlegende Unterschiede. Bei λ werden zwei versetzte Schnitte an den exakt definierten *cos-sites* gesetzt. Dadurch entstehen identische Monomere des Phagen-Genoms mit 12 Nukleotiden langen, komplementären 5'-Einzelstrang-Enden [Sanger et al., 1982]. Demgegenüber startet die Verpackung der DNA von P22 an den sogenannten *pac-sites* über einen "headful"-Mechanismus [King et al. 1973]. In Folge dessen entstehen terminal-redundante Enden [ca. 5%]; das schrittweise Vorranschreiten dieses Mechanismus ohne weitere Berücksichtigung der *pac-sites* ist verantwortlich für die Entstehung der zirkulären Permutation.

Die dargestellten Unterschiede in den Verpackungsmechanismen der beiden Phagen sind auch für ihre grundlegend verschiedenen Transduktionsmechanismen verantwortlich.

λ besitzt die Fähigkeit zur speziellen Transduktion. Dabei wird durch fehlerhaftes Ausschneiden des in das Wirtschromosom integrierten Prophagen an den *att-sites* irrtümlich ein Stück Wirts-DNA mit verpackt [Campbell, 1962]. Bei Infektion des nächsten Wirtes gelangt die bakterielle DNA gemeinsam mit der defekten Phagen-DNA in die Zelle und kann durch Rekombination in das Wirtschromosom integriert werden. Bei der speziellen Transduktion können immer nur Gene, die unmittelbar neben dem integrierten Prophagen liegen, übertragen werden. Bei λ sind dies die Gene *gal* und *bio* [Weisberg, 1987].

Bei P22 findet man den Mechanismus der allgemeinen Transduktion [Zinder und Lederberg, 1952]. Hierbei kann prinzipiell jedes chromosomale bakterielle und jedes plasmidcodierte Gen in ein Phagenpartikel verpackt werden. Der Grund hierfür liegt in der relativ geringen Sequenzspezifität des Genproduktes 3 (gp3) des Phagen P22, das für die Erkennung der *pac-sites* verantwortlich ist. Dadurch kommt es zu einem Fehler in der DNA-Verpackung, da sowohl auf Plasmiden als auch auf dem Bakterienchromosom *pac*-ähnliche Signale registriert werden. Auf dem Chromosom von *Salmonella typhimurium* existieren mindestens 6 bis 10 *pac*-ähnliche Sequenzen, die versehentlich erkannt und geschnitten werden können

[Schmieger, 1982; Vogel und Schmieger, 1986]. Durch das schrittweise Voranschreiten der Verpackung kann theoretisch jedes bakterielle Gen anstelle der Phagen-DNA in den Phagenkopf gelangen. Die Häufigkeit, mit der ein chromosomaler Marker durch P22 übertragen wird, hängt von seiner Entfernung zu den *pac-sites* auf dem Wirtschromosom ab sowie von der Ähnlichkeit der Basensequenz zur echten *pac-site* des Phagen [Margolin, 1987]. Nach Infektion des nächsten Wirtes kann auch bei der generellen Transduktion die bakterielle DNA durch Rekombination in das Wirtsgenom transferiert werden.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den beiden Phagen λ und P22 besteht im Bereich ihrer Immunitätsregionen. Die Signale und Genprodukte der Immunitätsregionen der temperenten Phagen spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des lysogenen Zustandes, sondern auch als Schutz gegen überinfizierende Phagen.

Die Aufrechterhaltung der Lysogenie einer Zelle wird durch phagenkodierte Repressormoleküle vermittelt, die durch Bindung an Operatoren der Prophagen-DNA die Transkription viraler Gene blockieren. Diese Repressoren binden außerdem an die Operatoren superinfizierender Phagen, die die gleichen Operatorregionen besitzen wie der in das Wirtschromosom integrierte Prophage. Aus diesem Grund sind lysogene Zellen sowohl immun gegen Superinfektion durch den gleichen Phagen als auch durch andere Phagen, die aber die gleichen Immunitätsregionen besitzen (homoimmun). Sie sind jedoch weiterhin empfindlich gegen Infektionen durch heteroimmune Phagen mit anderen Immunitätsregionen. Der Bereich der Genome von P22 und λ , in denen die für die Immunität und Aufrechterhaltung der Lysogenie essentiellen Operatorregionen und die Gene für die Synthese der Repressormoleküle liegen, wird als **ImmC**-Region bezeichnet (**Abb. 1.1.**). Der Aufbau, die Funktion und die Kontrolle dieses Immunitätssystems sind bei beiden Phagen sehr ähnlich. Da die Bezeichnungen der Gene und ihrer Produkte variieren, wird im Folgenden die Nomenklatur von P22 verwendet. In der ImmC-Region von P22 liegt das Gen für den c2-Repressor, der eine Schlüsselfunktion bei der Entscheidung zwischen Lyse und Lysogenie ausübt. Durch Bindung des c2-Proteins an die beiden Operatorregionen O_R und O_L wird die Transkription der "frühen" Gene von den Promotoren P_R und P_L aus verhindert (P_R : Gene *cro*, 18, 12 und 23; P_L : Gene 24, *c3*, *erf* und *int*). Die Expression dieser Gene (außer *c3* und *int*) ist für die vegetative Entwicklung des Phagen unerlässlich.

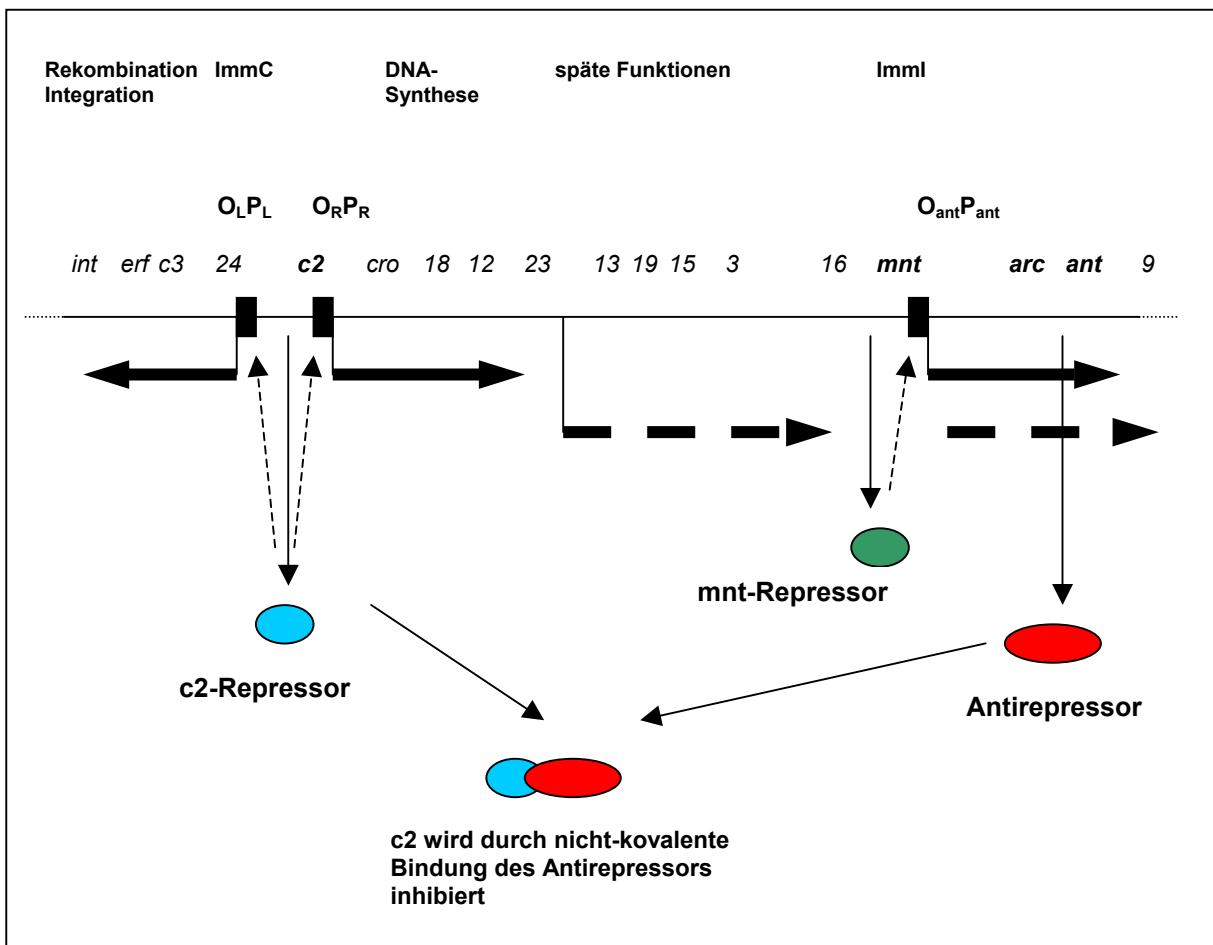


Abb. 1.1.: Immunitätssysteme von P22 und ihre Regulation, modifiziert nach [Suskind und Youderian, 1983]
 —————> Transkription - - - - -> Repression

Besitzt ein Phage einen Defekt im *c2*-Gen, so kann er keinen funktionsfähigen *c2*-Repressor mehr bilden. Er ist nicht länger in der Lage, den lysogenen Entwicklungszyklus zu durchlaufen, sondern kann nur noch den lytischen Weg einschlagen. Der temperente Wildtyp bildet auf der Agarplatte trübe Plaques, da immer nur ein Teil der Zellen lysiert wird, während sich in dem anderen Teil der Phage als Prophage etabliert. Ein Phage, der keinen Repressor mehr herstellen kann, bildet, genau wie virulente Phagen, auf der Platte klare Plaques, da alle Zellen lysiert werden. Man bezeichnet einen solchen Phagen deshalb auch als **Klarplaque-Mutante** (*c2*⁻). Es handelt sich jedoch weiterhin um einen temperenten Bakteriophagen, da der Phage sich, außer dem Defekt im Repressorgen, genotypisch nicht verändert hat.

Der Phage P22 zeichnet sich unter den lambdoiden Phagen durch den Besitz einer weiteren Immunitätsregion aus, der **Imml**-Region. λ besitzt diesen Bereich nicht. Die Imml-Region ist

nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der Lysogenie, spielt aber eine wichtige Rolle für die Immunität ihres Besitzers. In ihr liegt das *ant*-Gen, das für die Ausbildung eines Antirepressors kodiert. Dieser dient als Gegenspieler des c2-Repressors in der ImmC-Region, indem er diesen durch nicht-kovalente Bindung inhibiert und somit inaktiviert [Suskind und Youderian, 1983]. Durch seinen Antirepressor ist P22 in der Lage, sich in einer lysogenen Zelle, die einen homoimmunen Prophagen besitzt, erfolgreich zu vermehren. Gleichzeitig induziert der Antirepressor durch Ausschaltung des c2-Repressors die lytische Entwicklung jedes, zu P22 homoimmunen, Prophagen [Poteete, 1988]. Der Antirepressor ist aber nicht spezifisch für homoimmune Phagen; er inaktiviert außerdem auch die Repressoren einer Reihe verwandter heteroimmuner Phagen, wie z. B. vom Phagen L [Bezdek und Amati, 1967] oder von λ [Suskind und Botstein, 1975]. Außer dem *ant*-Gen liegen in der ImmI-Region die Gene *mnt* (*mnt* = *maintenance*) und *arc* (*arc* = *antirepressor control*). Das *arc*-Gen kodiert für die Ausbildung des nur kurzzeitig aktiven *arc*-Repressors, der sehr früh im Infektionsverlauf synthetisiert wird. Er ist verantwortlich für die Repression seiner eigenen Synthese, aber auch für die Kontrolle des Antirepressors in der frühen Infektionsphase. Diese Regulation ist essentiell, da eine Überproduktion des Antirepressors die lysogene Phagenentwicklung stört. Im späteren Infektionsverlauf wird die Repression des Antirepressors vom Genprodukt des *mnt*-Gens übernommen. Letzteres kodiert für die Synthese des *mnt*-Repressors, der durch Bindung an seinen eigenen Operator (O_{mnt}) die Synthese des Antirepressors vom Promotor P_{ant} aus blockiert und seine eigene Transkription von Promotor P_{mnt} aus stimuliert. Zur Aufrechterhaltung der Lysogenie muß also, beim Vorhandensein der Immunitätsregionen ImmC **und** ImmI, ein ausreichender Spiegel der beiden Repressormoleküle *mnt* und c2 in der Zelle vorhanden sein.

Zum Schutz der Wirtszelle vor Fremdeingriffen durch überinfizierende Phagen stehen sowohl dem P22- als auch dem λ -Prophagen als weitere Schutzmechanismen die sogenannten **sie**-Systeme (*superinfection-exclusion*) **sieA** (P22) und **sieB** (P22, λ) zur Verfügung. Das *sieA*-System von P22 besitzt im Gegensatz zum *sieB*-System kein Analogon in λ . Diese zusätzlichen Schutzmechanismen wirken auf einer der Phagenadsorption nachgeschalteten Ebene. Beide Systeme arbeiten völlig unabhängig voneinander. Man vermutet, daß das Genprodukt des unspezifisch wirkenden *sieA*-Systems von P22 den Eintritt der DNA eines superinfizierenden Phagen verhindert, indem es den Transfer der DNA durch die innere Membran ins Zytoplasma der Wirtszelle blockiert [Hofer et al., 1995]. Auch der genaue Mechanismus des, spezifisch gegen heteroimmune Phagen gerichteten, *sieB*-Systems ist noch unbekannt. Das *sieB*-Gen kodiert wahrscheinlich für ein Membranprotein, das die lytische Entwicklung eines überinfizierenden Phagen verhindert.

P22 selbst ist gegen sein eigenes sieB-System unempfindlich, da das *sieB*-Gen gleichzeitig für ein zweites, verkürztes Polypeptid *esc* (*escape*) kodiert. Letzteres führt zur Inhibition der Produktion des gp sieB [Ranade und Poteete, 1993].

Im Genom von λ ist das *sieB*-Gen an analoger Position zu finden. Durch das sieB-Protein von λ werden die gleichen *Salmonella*-Phagen von einer Superinfektion ausgeschlossen wie durch das sieB-Protein von P22. Trotzdem weisen die beiden Gene keinerlei Homologien auf Sequenzebene auf. Dennoch ist P22 in der Lage, mit Hilfe seines *esc*-Proteins das sieB-System des Phagen λ zu umgehen [Ranade und Poteete, 1993].

Die dargestellten, grundlegenden Unterschiede zwischen den beiden Phagen λ und P22 legen zunächst den Schluß nahe, daß diese beiden Vertreter der beiden Äste der lambdoiden Familie im Grunde genommen wenig Ähnlichkeiten besitzen. Wieso werden zwei Phagen, die so unterschiedliche Eigenschaften besitzen, dennoch im Begriff der lambdoiden Familie zusammengefaßt?

Zwischen den Vertretern des λ -Astes der Familie und den Vertretern des P22-Astes bestehen (außer den bereits genannten Gemeinsamkeiten der Phagen P22 und λ) folgende zusätzliche Übereinstimmungen:

- Alle temperenten Phagen, also auch alle Mitglieder der lambdoiden Familie, treffen ihre Entscheidung zwischen lysogenem und lytischem Infektionsweg während der Infektion des Wirtes.
- Wenn eine Integration ihrer Prophagen-DNA in das Wirtschromosom erfolgt, dann geschieht dies über eine zirkuläre DNA-Zwischenstufe.
- Alle lambdoiden Phagen besitzen ein gleichartiges Steuersystem aus positiven und negativen Regulatoren. Diese ermöglichen die Transkriptionskontrolle von Operons, die immer in der gleichen Art und Weise organisiert sind. Die Regulatorspezifität kann bei den einzelnen Mitgliedern der lambdoiden Familie sehr unterschiedlich sein; alle besitzen jedoch Repressoren, Operatoren und positive Regulatoren, die auf die gleiche Art und Weise funktionieren [Campbell und Botstein, 1983].
- Das wichtigste gemeinsame Merkmal jedoch, das alle lambdoiden Bakteriophagen auszeichnet, ist ihre ähnliche Genomstruktur. Hierbei können die Gene in unterschiedliche funktionelle Bereiche eingeteilt werden, die man als Module bezeichnet. Nicht nur die Module selbst, sondern auch die Gene innerhalb der Module besitzen immer die gleiche Anordnung und Transkriptionsrichtung. Dennoch können sich die Gene hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenz voneinander unterscheiden. Auch die Genprodukte besitzen häufig andere Spezifitäten.

1.2.3. Die Genomstruktur lambdoider Phagen

Einige Mitglieder der lambdoiden Familie, zu denen auch P22 zählt, besitzen keine definierten vegetativen DNA-Enden. Man beschreibt aber vereinbarungsgemäß die Gene nach der Anordnung im vegetativen Phagen (vgl. **Abb. 1.2.**). Die Karte der λ -DNA beginnt und endet mit den *cos-sites*. Die Genomkarte von P22 trägt die funktionell vergleichbare *pac-site* am linken Ende. Dies entspricht dem ersten bei der Verpackung nach dem *headful*-Mechanismus entstehenden Monomer.

In **Abb. 1.2.** ist der allgemeine Genomaufbau der Lambdoiden am Beispiel von P22 und λ dargestellt.

Beginnend am linken Ende findet man zunächst die Bereiche, in denen die Gene für die Morphogenese und die Verpackung des Phagen liegen. Es folgt eine nicht-essentielle Region, an die sich die Bereiche für die sequenz-spezifische und die allgemeine Rekombination anschließen. Nach den darauffolgenden Genen für die frühe Kontrolle und die DNA-Replikation folgt erneut eine nicht-essentielle Region. Schließlich kommen die Gene für die späte Kontrolle und die Lyse sowie eine weitere nicht-essentielle Region (**Abb. 1.2.**).

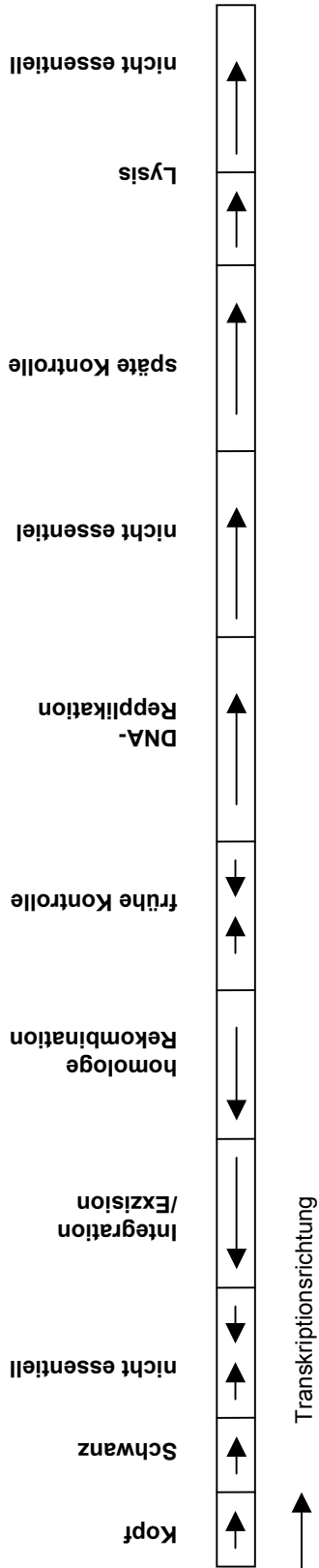
Der einzige wesentliche Unterschied in der genetischen Organisation der beiden Phagen liegt in der zweiten Immunitätsregion *ImmI*, die P22 zusätzlich zur *ImmC*-Region besitzt.

Die Tatsache, daß alle lambdoiden Phagen den gleichen Genomaufbau besitzen, erleichtert es ihnen, untereinander Gene oder Gengruppen auszutauschen, so daß es zur Entstehung neuer, funktionsfähiger Phagen kommen kann.

Bemerkenswert ist, daß sich die Übereinstimmung auf der Genomebene teilweise auch in beträchtlichem Umfang auf der DNA-Sequenzebene wiederfindet [*Skalka und Hanson, 1972*].

Wie bereits erwähnt, können bei den einzelnen Phagen der lambdoiden Familie die Gene innerhalb der einzelnen Module sehr verschieden sein, obwohl ihre Genprodukte analoge Funktionen erfüllen. Beispiele hierfür findet man in vielen Bereichen des Genoms:

A) Allgemeiner Genomaufbau lambdoider Phagen, modifiziert nach [Casjens et al., 1992a]



B) Vergleich der Genome von P22 und λ

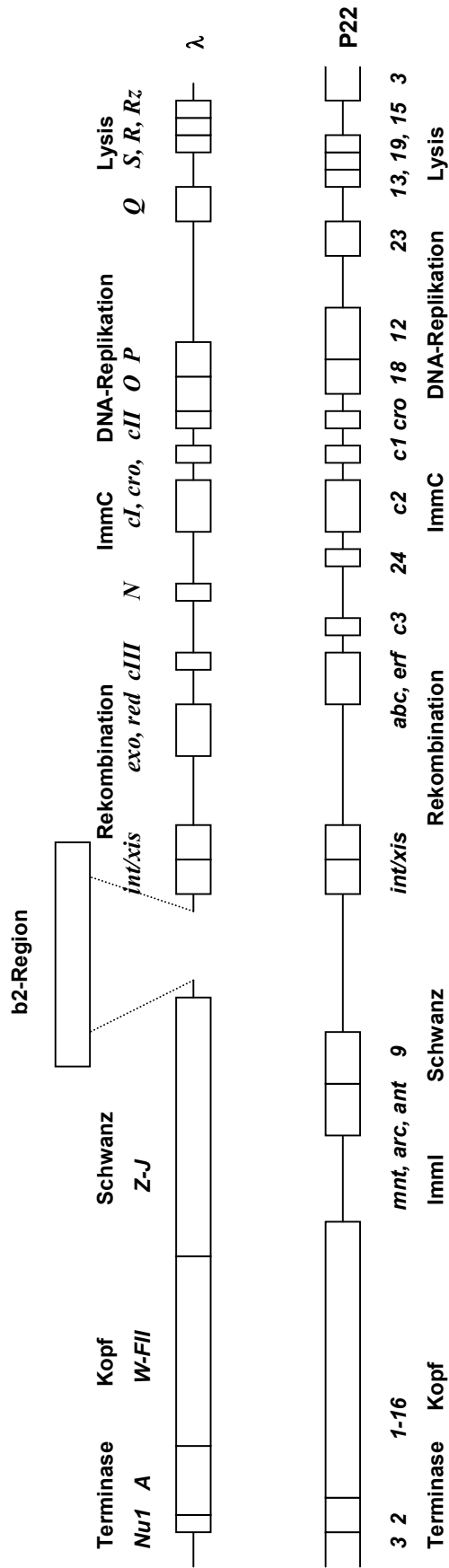


Abb. 1.2.: Allgemeiner Genomaufbau lambdoider Bakteriophagen am Beispiel von P22 und λ

- So besitzen z. B. die Gene und Genprodukte für die Morphogenese (Kopf-, Schwanz- und Verpackungsgene und -proteine) von λ und P22 keinerlei Ähnlichkeit zueinander. Ein Beispiel hierfür findet sich in der zuvor bereits beschriebenen Schwanzstruktur, die beim Phagen λ eine wesentlich komplexere Struktur aufweist. Für die meisten der 11 Gene, die bei λ an ihrem Aufbau beteiligt sind, existiert in P22 kein entsprechendes Gen.
- Die Immunitätsregionen der Phagen λ und 21, die beide zum λ -Ast der Familie gehören (vgl. Seite 6) spielen im Lebenszyklus der Phagen dieselbe Rolle. Sie liegen, relativ zu den übrigen Genen, an den gleichen Regionen im Genom, und ihre interne genetische Struktur (Lage von *N*, *ci*, *cro*, *cII* und Promotor-sites) ist identisch. Auf Nukleotidebene weisen sie jedoch keinerlei Sequenzhomologie auf. Auch die Eigenschaften aller Erkennungsproteine und der dazugehörigen Erkennungsstellen sind völlig verschieden.
- λ und der Phage 434 (λ -Ast der Familie, vgl. Seite 6) besitzen völlig verschiedene *ci*- und *cro*-Proteine mit den dazugehörigen Operator-sites, haben aber identische Integrase-Proteine und *att*-sites.
- Demgegenüber haben die Phagen P22 und 21, die zu unterschiedlichen Ästen der Lambdoiden gehören, absolut identische *c2*-Proteine, unterscheiden sich aber in vielen anderen Funktionen, einschließlich der Integrase [Campbell und Botstein, 1983].

Die Übereinstimmung in der Genomorganisation der Phagen P22 und λ gab die Anregung zur Konstruktion von Hybridphagen [Gemski et al., 1972; Botstein und Herskowitz, 1974]. Die Tatsache, daß P22 nicht an *Escherichia coli* und umgekehrt λ nicht an *Salmonella typhimurium* adsorbieren kann, stellte zunächst ein Problem dar, das sowohl von Gemski et al. als auch von Botstein und Herskowitz mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen gelöst werden konnte. Gemski et al. kreuzten einen *E. coli* K-12 Hfr-Donorstamm mit einem *Salmonella*-LT7 Rezipientenstamm. Sie erhielten so ein *E. coli*/*Salmonella typhimurium*-Hybrid, das sowohl für P22 als auch für λ sensitiv war, ohne dabei genau definieren zu können, welche Gene von *E. coli* hierbei in den *Salmonella*-Stamm übertragen wurden. Botstein und Herskowitz nutzten die von Roth und Hoppe [Roth und Hoppe, 1972] auf einem F'*lac*⁺*pro*⁺-Episom von *E. coli* nachgewiesene *att*-site für P22 aus und übertrugen dieses in eine *Salmonella typhimurium*-Mutante, die keine chromosomale *att*-site mehr besaß. Anschließend wurde die *Salmonella*-Mutante mit einem temperatur-sensitiven P22 infiziert, der seine Prophagen-DNA in das F'-Plasmid integrierte. Über Konjugation konnte das P22-haltige F'-Plasmid nun in *E. coli* übertragen werden. Der Stamm wurde dann mit λ infiziert und P22 durch eine Temperaturerhöhung induziert. Beide Gruppen konnten so unabhängig vonein-

ander zeigen, daß durch homologe Rekombination verschiedene funktionelle Bereiche zwischen den Phagen P22 und λ ausgetauscht werden können, so daß wieder funktions- und vermehrungsfähige Hybridphagen entstehen.

In der Folge wurden eine ganze Reihe von lebensfähigen Hybriden zwischen λ und anderen Mitgliedern der lambdoiden Familie, die damals nur durch ihre Morphologie, DNA-Struktur und regulatorischen Eigenschaften definiert wurden, mittels DNA-Heteroduplexanalysen untersucht [Davidson und Szybalski, 1971; Simon et al. 1971; Fiandt et al., 1971]. Dabei konnte die Existenz von (oft nur kurzen) homologen Bereichen zwischen nicht-homologen Bereichen nachgewiesen werden.

Szybalski und Szybalski faßten 1974 die Ergebnisse der bis dahin durchgeführten Studien zusammen. Sie führten den Begriff des Moduls ein und postulierten, daß die modulare Konstruktion der Mitglieder der lambdoiden Familie die Grundlage für ihre Evolution darstellt [Szybalski und Szybalski, 1974].

Ein Austausch verschiedener Genombereiche konnte z. B. für die Immunitätsregionen, die Gene für die frühe Kontrolle und für die DNA-Replikation nachgewiesen werden. Alles deutete darauf hin, daß zwischen den Modulen homologe Bereiche existieren müssen, die einen Austausch über homologe Rekombination ermöglichen.

Intensivere Untersuchungen zahlreicher solcher Hybride [Botstein und Herskowitz, 1974; Friedman und Ponce-Campos, 1975; Hilliker und Botstein, 1976] zeigten nun, daß die homologen Bereiche häufig in Regionen ohne bekannte Funktionen lagen.

DNA-Sequenzanalysen bestätigten schließlich scharfe Übergänge zwischen homologen und heterologen Bereichen, auf die bereits die ersten Heteroduplexanalysen hindeuteten [Benedik et al., 1983; Backhaus und Petri, 1984; Franklin, 1985].

Ein natürlicher Hybridphage der lambdoiden Familie scheint der temperente Phage ES18 zu sein. Man vermutet, daß er durch homologe Rekombination zwischen P22 und einem anderen Vertreter der lambdoiden Gruppe entstanden ist [Huber, 1989]. Es handelt sich bei dem Phagen ES18, genau wie bei P22, um einen doppelsträngigen, generell transduzierenden DNA-Phagen, der denselben natürlichen Wirt wie P22, *Salmonella typhimurium*, infiziert. Die rechte Hälfte seines Genoms könnte ursprünglich von P22 stammen [Schicklmaier und Schmieger, 1997]: Im Bereich der frühen Gene, der ImmC-Region und der Lysisgene finden sich starke Ähnlichkeiten zu P22. Die linke Hälfte seines Genoms muß der

Phage ES18 von einem anderen, noch unbekanntem Vertreter der Lambdoiden haben, sie weist keinerlei Ähnlichkeit zu P22 auf.

Morphologisch ähnelt ES18 mit seinem 200 nm langen Schwanz eher dem Phagen λ . Auch hinsichtlich seiner Genomgröße von ca. 46.150 bp ist er eher mit λ vergleichbar.

Es stellt sich nun die Frage, wie der Phagen ES18 taxonomisch einzuordnen ist. Nach den heute gültigen taxonomischen Richtlinien müßte man ihn zur selben Familie wie λ , den *Siphoviridae*, zählen. Diese Zuordnung ist jedoch mehr als fragwürdig, da wie bereits beschrieben etwa die Hälfte seines Genoms sequenzidentisch oder in hohem Maße ähnlich zu P22 ist, der zu den *Podoviridae* gehört. Legt man also statt der gültigen Taxonomieregeln den Begriff der lambdoiden Familie bei der Einordnung des Phagen ES18 zugrunde, gehört er trotz unterschiedlicher Morphologie zum P22-Ast.

1.3. Die Evolution der lambdoiden Phagen

1.3.1. Die Theorie der modularen Evolution

In den siebziger Jahren zeichnete sich immer deutlicher ab, daß die lambdoiden Phagen in einer Art und Weise miteinander zusammenhängen, die sich nicht einfach nur durch das herkömmliche Evolutionsprinzip anhand von Stammbäumen linearer Abstammung erklären läßt. Im Jahre 1980 entwickelte Botstein, aufbauend auf den Ergebnissen von Szybalski und Szybalski [Szybalski und Szybalski, 1974], schließlich eine neue Evolutionstheorie, die diese Zusammenhänge berücksichtigt und eine plausible Erklärung für die Genomorganisation lambdoider Phagen liefert – **die Theorie der modularen Evolution der Bakteriophagen**. Da diese Modellvorstellung für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung ist, werden in den folgenden Abschnitten ihre wichtigsten Aussagen und ihre Bedeutung für die Phagen-evolution detailliert dargestellt [Botstein, 1980]:

- Das Produkt der Evolution ist nicht ein bestimmtes Virus, sondern eine Familie austauschbarer genetischer Elemente oder Module, von denen jedes eine bestimmte biologische Funktion erfüllt.
- Jedes in der Natur vorkommende Virus ist eine vorteilhafte Modulkombination, selektiert auf die optimale Funktion in einer bestimmten ökologischen Nische.
- Der Austausch von Modulen mit gleichen biologischen Funktionen erfolgt über Rekombination zwischen Phagen, die lediglich durch den gleichartigen modularen Aufbau ihres

Genoms miteinander verwandt sind. Dabei können sich die Individuen innerhalb einer sich vermehrenden Population in sehr vielen Merkmalen voneinander unterscheiden. Hierzu gehören auch Morphologie und Wirtsspektrum der einzelnen Phagen.

Botstein fordert für ein funktionelles Modul zweierlei: Erstens muß eine effektive Ausführung seiner biologischen Funktion gewährleistet sein. Zweitens muß ein Modul seine Austauschfähigkeit beibehalten, sowohl in Bezug auf seine Fähigkeit, in andere Genome platziert zu werden, als auch in Bezug auf seine funktionelle Kompatibilität mit einer Reihe anderer Modulkombinationen.

Der Austausch von Teilen des Genoms setzt das Vorhandensein von flankierenden, homologen Sequenzen zwischen den Modulen voraus. Bereits die von Szybalski und Szybalski durchgeführten Heteroduplexanalysen deuteten auf die Existenz derartiger homologer Sequenzen hin [Szybalski und Szybalski, 1974]. Nur so kann gewährleistet werden, daß ein Modul nach homologer Rekombination wieder in der richtigen Orientierung am richtigen Zielort landet, damit die entsprechende Regulation gewährleistet wird und auch die neue Modulkombination wieder zu einem vermehrungs- und funktionsfähigen Phagen führt. Der Einbau von neuen Modulen erfolgt sozusagen nach einem "Steckerprinzip" mit unterschiedlichen Adaptern an beiden Enden des Steckers. So passen die Module immer nur in einer bestimmten Richtung in die Ziel-DNA hinein. Dies wiederum ist die Voraussetzung für die Gewährleistung einer sinnvollen Genregulation, die auf der Transkriptionsebene stattfindet. Auch Experimente mit P22/ λ -Hybriden weisen auf die Existenz derartiger Steckerelemente hin [Backhaus und Petri, 1984]. Botstein postulierte, daß die Adapter nur in nicht-codierenden Bereichen zwischen den einzelnen Modulen liegen. Mittlerweile liegen aber Ergebnisse vor, die beweisen, daß auch Mikrohomologien in Sequenzen innerhalb von Genen als Austauschelemente genutzt werden können [Schicklmaier, 1995].

In der Modultheorie von Botstein werden Module als austauschbare genetische Elemente definiert, die eine funktionelle Einheit darstellen. Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß Module sehr unterschiedliche Ausdehnungen haben können. Zunächst einmal kann es sich bei einer solchen funktionellen Einheit um ganze Gengruppen handeln, die aufgrund der Funktion ihrer Genprodukte nicht voneinander getrennt werden können [Casjens und Hendrix, 1974]. Ein Beispiel hierfür findet sich in den Genprodukten der Kopf- und Schwanzregionen von P22 und λ , die so genau aufeinander abgestimmt sind, daß ein Austausch einzelner Produkte (Subfunktionen) nicht möglich ist [Campbell und Botstein, 1983]. Die Tatsache, daß auch einzelne Gene ein Modul darstellen können, wurde von verschiedenen Autoren gezeigt [Schicklmaier, 1995; Neve et al., 1998]. Bereits Botstein verwies hierzu in seiner

Modultheorie auf die Endolysingene der lambdaoiden Phagen [Botstein, 1980]. Heute weiß man, daß die kleinste Moduleinheit nicht von einzelnen Genen gebildet wird. Sogar einzelne Domänen eines Gens können ein Modul darstellen. Sequenzvergleiche der Gene 15 der Phagen P22, λ und HK97 liefern Hinweise für intragenische Rekombinationsereignisse [Casjens et al., 1992a]. Dies korreliert mit dem Nachweis von Mikrohomologien innerhalb einzelner Gene, die als Austauschelemente fungieren können [Schicklmaier, 1995].

Auch bei tierischen Viren deuten Heteroduplexanalysen auf eine modulare Genomzusammensetzung hin. Botstein geht deshalb soweit, seine Theorie des modularen Genomaufbaus auf Viren höherer Organismen auszudehnen, und postuliert für diese ebenfalls eine Evolution auf der Grundlage von austauschbaren Modulen.

1.3.2. Die Bedeutung der Modultheorie für die Phagenevolution

Die meisten Betrachtungen über Phagenevolution, die im Laufe der Jahre entwickelt wurden, gehen zunächst auf die Abstammung der Phagen im Allgemeinen zurück. Die älteren Hypothesen lassen sich nach Adams in zwei große Gruppen einteilen, die Kurations- und die Degenerations-Hypothesen [Adams, 1959]. Die Vertreter der Kurations-Hypothesen betrachteten Viren als direkte Abkömmlinge primitiver Vorformen. Die Anhänger der Degenerations-Hypothesen gingen davon aus, daß die Entwicklung der Viren durch schrittweisen Verlust von Funktionen aus komplexeren Organismen erfolgte. Luria et al. diskutierten im Jahre 1978 zwei verschiedene Abstammungsmöglichkeiten der Viren, die ebenfalls als Variationen der Degenerations-Hypothesen angesehen werden müssen: Zum einen wäre es möglich, daß die Viren nichts anderes als zurückgebildete Abkömmlinge zellulärer Parasiten sind, zum anderen wäre aber auch eine Evolution des viralen Genoms aus genetischen Elementen des Wirtes denkbar [Luria et al., 1978]. Zumindest im Falle der großen DNA-Phagen (wie λ und P22) hat sich heute die Ansicht durchgesetzt, daß ihre Genome chimären Ursprungs sind und auf Teile von Bakterienchromosomen, Plasmiden und Transposons zurückgehen [Campbell, 1988]. So könnte z. B. bei λ die Originregion vom bakteriellen Replikationsorigin, die Integrationsgene von einem Transposon und die Lysegene von Wirtsgenen, die die Synthese von Zellwandbestandteilen betreffen, abstammen.

Es gibt keinen Zweifel darüber, daß den Phagen im Verlauf der Evolution das gleiche breite Spektrum an molekulargenetischen Mechanismen zur Verfügung stand (und auch heute

noch steht) wie allen anderen Organismen, das ihnen eine Adaption an veränderte Umweltbedingungen ermöglicht(e): Austausch, Addition, Insertion oder Deletion einzelner Nukleotide, Rekombination, Genduplikationen und Rearrangements sind nur einige davon.

Welche Arten von Evolutionsmechanismen beeinflussen die lambdaoide Familie hauptsächlich?

Als wesentliche Triebkraft der Phagenevolution werden Rekombinationsmechanismen angesehen. Hierzu zählen die *site*-spezifische, die illegitime und die homologe Rekombination. Bei letzterer unterscheidet man bei den Phagen zwischen zwei verschiedenen Möglichkeiten:

- die homologe Rekombination im herkömmlichen Sinne, zwischen Regionen mit ausgeprägter Sequenzübereinstimmung, über größere Bereiche hinweg
- die Rekombination über kurze homologe Sequenzen (Mikrohomologien), die z. B. in konservierten Genomteilen, wie Promotor- oder Terminatorsignalen, zu finden sind [Casjens *et al.*, 1992a; Campbell, 1994].

Nach der Modultheorie von Botstein findet die Phagenevolution nur in geringerem Maß auf der Ebene eines intakten Phagen statt, sondern vor allem auf der Ebene der Module. Natürlich findet auch bei Phagen eine Evolution auf Sequenzebene statt, und die Module unterliegen ebenfalls mutativen Einflüssen. Die Evolution auf der Ebene ganzer Module ermöglicht den Phagen jedoch einen leichten und kontinuierlichen Zugang zu einer großen Anzahl verschiedener Gene und Genprodukte [Botstein, 1980]. Dadurch sind sie in der Lage, sich schnell und effizient an neue Umweltbedingungen anzupassen.

Die Module des lambdaoiden Genoms gehören alle einem gemeinsamen Genpool an. Dabei stellt jeder Vertreter der lambdaoiden Gruppe eine andere eigene Kombination der vorhandenen Module dar.

Die zu Beginn dieser Einleitung gestellte Frage, ob ein zu charakterisierender Phage einen neuen oder einen bereits bekannten Bakteriophagen darstellt, kann nun mit Hilfe der Modultheorie beantwortet werden. Es handelt sich mit größter Wahrscheinlichkeit um einen neuen, bisher noch nicht isolierten, Phagen. Man muß sich nach der Modultheorie heute sogar fragen: **„Ist es überhaupt möglich, einen völlig identischen Phagen ein zweites Mal aus unterschiedlichen Isolaten aus der Natur zu isolieren?“**

Der Modultheorie zufolge ist ein Phage lediglich ein funktionsfähiges Aggregat verschiedener Module, das sich ständig neu aus dem Genpool der Familie zusammensetzt. Deshalb ist es

nach dem heutigen Wissensstand sehr unwahrscheinlich, daß es jemals gelingt, einen völlig identischen Phagen ein zweites Mal aus **verschiedenen** Naturisolaten zu isolieren.

Auch der Phage λ wurde bis heute nur ein einziges Mal aus der Natur isoliert [Casjens *et al.*, 1992a], und es ist Zufall, daß gerade diese Modulkombination zu **dem** Standardphagen der Phagengenetik wurde. Das Gleiche gilt auch für P22.

An dieser Stelle müssen zwei Einschränkungen gemacht werden:

1. Aus ein- und demselben Isolat ist es natürlich möglich, den gleichen Phagen mehrmals zu isolieren, da jeder lysogene Klon weitgehend identische Phagen entläßt.
2. Wenn ein temperenter Phage sich in der Wirtszelle als Prophage etabliert, so wird sein Genom zum Bestandteil des Bakterienchromosoms und zusammen mit diesem in unveränderter Form an die Nachkommenzellen des Bakteriums weitergegeben. Ist dies der Fall, so findet man in jeder dieser Zellen den selben Prophagen. Kommt es aber irgendwann zur Lyse des Wirtes durch Induktion und Vermehrung des Prophagen, so werden die Phagennachkommen freigesetzt und können an den zuvor beschriebenen Rekombinationsvorgängen teilnehmen.

Die oben gestellte Frage bezieht sich also in dieser Form nur auf freie Phagen in unterschiedlichen Naturisolaten und nicht auf Prophagen Genome, die als Teil des Wirtschromosoms repliziert und auf die Nachfahren des Bakteriums übertragen werden.

Der Genpool der lambdoiden Familie setzt sich jedoch nicht nur aus den Modulen der freien Phagen und der intakten Prophagen zusammen. Auch defekte Prophagen (kryptische Prophagen) tragen einen Teil zur großen Variabilität der Familie bei.

E. coli K12 besitzt auf seinem Chromosom, zusätzlich zum Phagen λ , vier defekte Prophagen: DPL12 (früher *qsr'*), Rac, e14 und Kim. Wie die intakten lambdoiden Phagen bestehen auch die kryptischen Prophagen aus Sequenzen, die homolog zu λ sind, unterbrochen von heterologen (aber funktionell identischen) Segmenten [Campbell, 1994]. Hybridisierungen mit λ -Sonden deuten darauf hin, daß die Chromosomen vieler natürlicher *E. coli*-Stämme λ -verwandte Segmente besitzen [Anilionis und Riley, 1980; Riley und Anilionis, 1980].

Defekte Prophagen stellen nach Strathern und Herskowitz "genetischen Abfall" dar, der sich in der Wirtszelle als Folge einer vorangegangenen Virusinfektion angesammelt hat und sich momentan in einem Prozeß des Abbaus und des Verlustes befindet [Strathern und Herskowitz, 1975]. Eine alternative Interpretation besagt, daß die Prophagen, unabhängig davon, wie sie ursprünglich in die Zelle hineingelangt sind, nunmehr irgendeine Funktion für den Wirt ausführen. Somit können sie als fest in das Wirtschromosom integrierte Virusmodule angesehen werden. In mindestens zwei Fällen konnte im Labor gezeigt werden, daß Gene

aus defekten Prophagen von Bedeutung für ihren Wirt sind: In *recBC*-Mutanten von *E. coli* konnte eine Derepression der Rekombinationsfunktionen des λ -Prophagen gezeigt werden [Kaiser und Murray, 1980]. Highton et al. konnte in *ompC*-Mutanten von *E. coli* die Expression des normalerweise stillen *nmpc*-Gens (genaue Funktion noch unbekannt) von DPL12 nachweisen [Highton et al., 1985]. Es gilt als sicher, daß solche Vorgänge auch in der Natur ablaufen [Campbell, 1988].

Natürliche Rekombinanten können also sowohl durch Mischinfektion einer Bakterienzelle durch zwei Phagen oder nach Superinfektion einer lysogenen bzw. einer defekt-lysogenen Zelle durch einen Phagen (heteroimmun oder homoimmun mit Antirepressor) entstehen. In der Natur ist letzteres wesentlich häufiger zu finden [Campbell, 1988].

Nicht zu unterschätzen ist auch die Rolle des Wirtschromosoms selbst für den Genpool der lambdoiden Familie. Vermutlich haben sich die Phagen im Laufe der Evolution Gene des Wirtes angeeignet und "für ihre eigenen Zwecke genutzt" [Casjens et al., 1992a]. Es existieren einige Beispiele, die die große Ähnlichkeit zwischen Phagen- und Wirtsgenen belegen: Die λ *cl*- und *cro*-Gene sind eng mit dem *lexA*-Gen von *E. coli* verwandt, das Gen 12 von P22 ähnelt in seiner Sequenz dem *dnaB*-Gen von *E. coli* und gp 12 führt auch die Funktion von gp *dnaB* aus [Backhaus und Petri, 1984]. Beispiele für die enge Beziehung zwischen Phagen- und Wirtsgenen findet man auch außerhalb der lambdoiden Familie. So weist z. B. das Lysisgen des *Streptococcus*-Phagen HB3 große Ähnlichkeit mit dem *lytA*-Gen seines Wirtes auf, dem man eine Funktion bei der Zellwand-Synthese oder -Reparatur zuschreibt [Romero et al., 1990]. Die Entscheidung, ob es sich tatsächlich um ein Gen des Wirtschromosoms oder um ein Gen eines defekten Prophagen handelt, ist oft nur schwer zu treffen.

Mit der Verbreitung von Bakteriophagen in Naturisolaten der Gattung *Salmonella* und ihrer näheren Charakterisierung befaßt sich eine Arbeit von Schicklmaier [Schicklmaier, 1995]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abb. 1.3.** dargestellt. Hierbei zeigt sich ein enormes, für den Austausch von Modulen zur Verfügung stehendes Variationspotential.

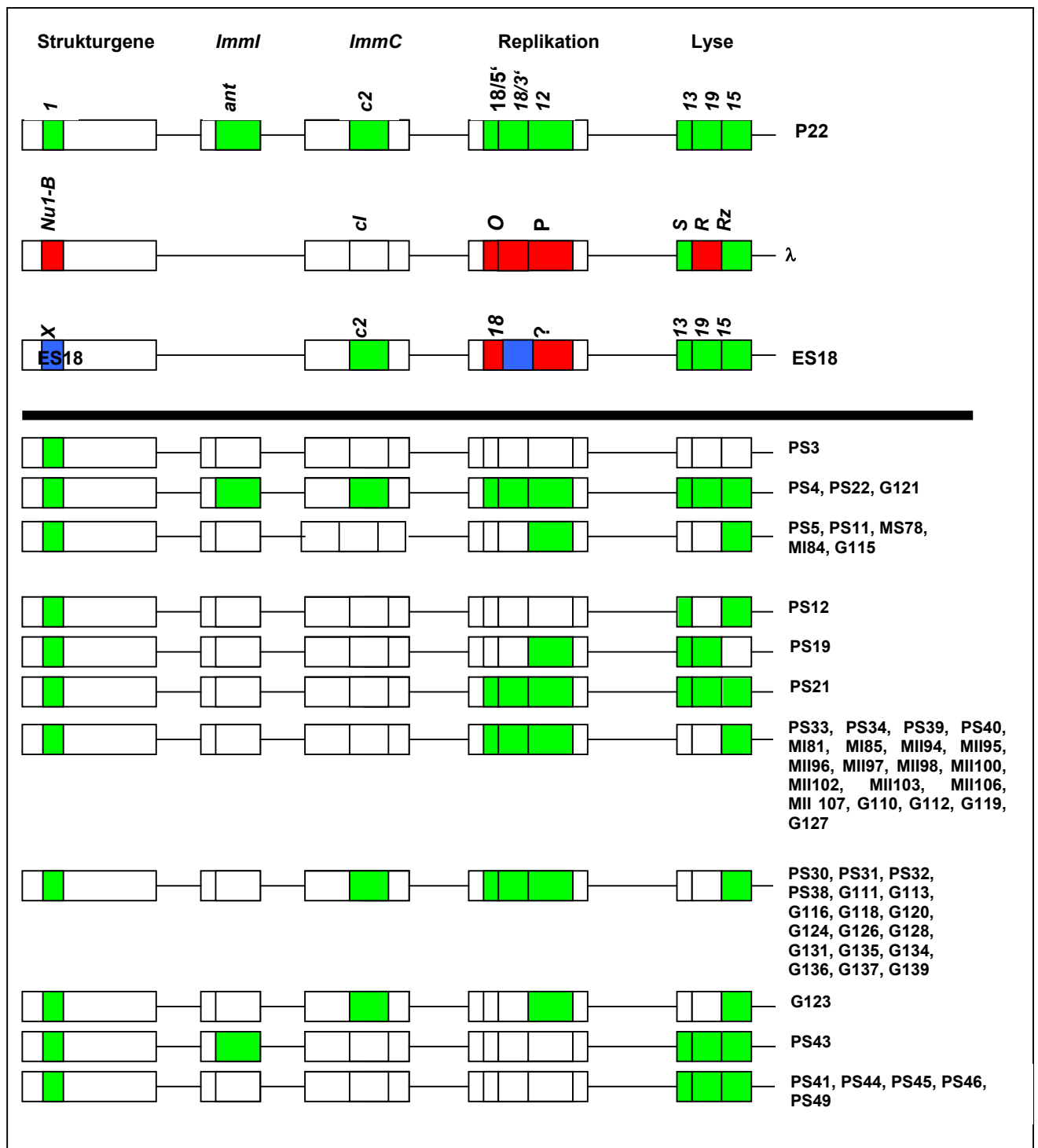


Abb. 1.3.: Charakterisierung lambdoider Bakteriophagen in Naturisolaten von *Salmonella* Ergebnisse von [Schicklmaier, 1995]
Dargestellt sind die Ähnlichkeiten der untersuchten Phagen mit P22, λ und ES18 aufgrund von Hybridisierungsanalysen aus verschiedenen Genombereichen.

1.4. Die Ziele dieser Arbeit

Im Verlauf der Evolution der lambdoiden Phagen wurde die Anordnung der Gene wesentlich stärker konserviert als die Nukleotidsequenzen der einzelnen Gene. Für die funktionellen Einheiten des Genoms, die Module, haben sich jedoch andere "Allele" mit unterschiedlichen Funktionsweisen entwickelt. Der modulare Allelbegriff, der in dieser Arbeit für die verschiedenen Modulvarianten verwendet wird, darf auf keinen Fall mit dem klassischen Allelbegriff gleichgesetzt werden. Der Allelbegriff im herkömmlichen Sinn bezieht sich immer auf eine Variante eines bestimmten Gens und darf niemals auf Gengruppen erweitert werden oder sich nur auf Teile von Genen beziehen. Der modulare Allelbegriff wird dagegen für Funktionseinheiten verwendet und kann deshalb auch für Gengruppen bzw. Teile von Genen benutzt werden. Diese modularen Allele können nun ausgetauscht werden, um immer neue Phagenkombinationen zu schaffen. Damit besitzen die lambdoiden Phagen einen sehr effizienten Mechanismus zur Adaption an veränderte Umweltbedingungen.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der Evolutionsmechanismen leisten, die zur Entstehung der erstaunlichen Vielfalt der lambdoiden Phagen geführt haben. Dazu wird die Bedeutung der Neukombination von Modulen für die Evolution der lambdoiden Familie untersucht. In der Natur entstehen neue Modulkombinationen am häufigsten durch Superinfektion einer lysogenen Zelle mit einem zweiten, zum Prophagen des Wirtes heteroimmunen Phagen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird durch Simulation einer solchen Situation unter Laborbedingungen die Häufigkeit, mit der zwei Phagen Segmente ihres Genoms austauschen, untersucht. Dabei werden folgende Aspekte berücksichtigt:

- unterschiedliche Lebensformen temperenter Bakteriophagen und ihrer Klarplaquemutanten
- unterschiedliche Immunitätssituationen
- bevorzugter Austausch bestimmter Genombereiche.

Das Verhalten eines Phagen unter Laborbedingungen muß nicht unbedingt mit seinem Verhalten in seiner natürlichen Umgebung korrelieren. Hier spielen oft umweltbedingte Faktoren, die im Labor nicht berücksichtigt werden können, eine große Rolle. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird aus diesem Grund die Neukombination von Modulen innerhalb einer natürlichen Population der lambdoiden Phagen untersucht. Dazu dient eine Phagenkollektion aus Naturisolaten von *Salmonella*. Für ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zur Entste-

hung der enormen Variabilität der lambdoiden Phagen geführt haben, sind Fragen nach der Anzahl der verschiedenen modularen Allele in einer natürlichen Population und nach der Häufigkeit, mit der diese Allele im Verlauf der Evolution tatsächlich ausgetauscht wurden, von zentraler Bedeutung.

Diese Fragen werden am Beispiel einer Modul-Kassette des Genoms der lambdoiden *Salmonella*-Phagen untersucht: der Lysisgenkassette. In diesem Zusammenhang wird die Anwendbarkeit der Modultheorie von Botstein in ihrer ursprünglichen Form auf den Genpool der lambdoiden Phagen diskutiert.

Nachdem die Existenz völlig identischer freier Phagen in unterschiedlichen Naturisolaten angezweifelt werden muß, wird am Ende dieser Arbeit eine weitere Frage gestellt "**Wieviele verschiedene (lambdoide) Bakteriophagen können theoretisch existieren?**". Mit der Untersuchung der Anzahl der verschiedenen modularen Allele und ihrer Kombinationsmöglichkeiten innerhalb **einer** funktionellen Einheit des Genoms der lambdoiden Phagen macht die vorliegende Arbeit einen ersten Schritt zur Beantwortung dieser Frage.

2. Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben, werden Standardmethoden (Maniatis et al., 1982) angewendet.

2.1. Bakterienstämme

2.1.1. Laborstämme

Art	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, hsdR17, relA1, thi, supE44, Δ(lac proAB), F'(traD36, proAB⁺, lacI^f, lacZΔM15)</i>	[Yanish-Perron et al., 1985]
	JM83	<i>ara, Δ(lac proAB), rpsL, (φ80 lacZΔM15)</i>	[Yanish-Perron et al., 1985]
	NM538	<i>gal, lacY, metB, hsdR, supF</i>	[Frischauf et al., 1983]
	LE392	<i>supE44, supF58, hsdR514, galk2, galT22, metB1, trpR55, lacY1</i>	Gibco BRL
	POP2135	<i>endA1, thi, hsdR, malT, cl857, λ_{PR}, malPQ</i>	O. Raibaud, Pasteur-Institute, Paris
	RM80	<i>(λ_{cl857}-Sam7)</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	DB21	prototropher Wildtyp von LT2, enthält den kryptischen Prophagen Fels 1	Laborkollektion
	DB21(ES18)	Wildtyp, lysogen für ES18	Laborkollektion
	DB21(P22sie)	Wildtyp, lysogen für P22 (<i>sieA, sieB, ts12.1, ts2.1</i>)	Laborkollektion
	DB21(G119)	Wildtyp, lysogen für G119	diese Arbeit

2.1.2. *Salmonella*-Naturisolate

Stamm	Kurz- bezeichnung	Quelle	Herkunft	Datum
<i>Salmonella typhimurium</i>	SARA 3	Pferd	Rhode Island	1987
	SARA 4	Hase	Indiana	1986
	SARA 5		Mongolei	
	SARA 10	Opposum	Kalifornien	1987
	SARA 12	Pferd	Louisiana	1987
	SARA 21	Reiher	Oregon	
<i>Salmonella saintpaul</i>	SARA 22	Mensch	Massachusetts	
<i>Salmonella heidelberg</i>	SARA 30	Huhn	Pennsylvania	1987
	SARA 31	Schwein	Maryland	1987
	SARA 32	Hund	Texas	1986
	SARA 33	Mensch	Mexiko	
	SARA 34		Israel	
	SARA 38	Truthahn	Arizona	1987
	SARA 39	Mensch	North Carolina	
	SARA 40		USA	
<i>Salmonella paratyphi B</i>	SARA 41	Mensch	Frankreich	1976
	SARA 43	Mensch	Afrika	1982
	SARA 44	Mensch	Mittlerer Osten	vor 1965
	SARA 45	Kuh	Frankreich	1988
	SARA 46	Mensch	Europa	1981
<i>Salmonella typhimurium/M</i>	SARA 49	Abwasser	Großbritannien	vor 1965
	78	Mensch	Deutschland	1992
	81	Mensch	Deutschland	1993
	84	Mensch	Deutschland	1993
	85	Mensch	Deutschland	1993
	94	Mensch	Deutschland	1993
	95	Mensch	Deutschland	1993
	96	Mensch	Deutschland	1993
	97	Mensch	Deutschland	1993
	98	Mensch	Deutschland	1993
	100	Mensch	Deutschland	1994
	102	Mensch	Deutschland	1993
	103	Mensch	Deutschland	1994
<i>Salmonella typhimurium Copenhagen</i>	106	Mensch	Deutschland	1994
	107	Mensch	Deutschland	1994
	110	Pferd		1990
	111	Pferd		1990
	112	Pferd		1990
	113	Pferd		1991
	115	Pferd		1991
116	Pferd		1992	
118	Pferd		1993	

Stamm	Kurz- bezeichnung	Quelle	Herkunft	Datum
<i>Salmonella typhimurium Copenhagen</i>	119	Pferd		1993
	120	Pferd		1994
	121	Katze		1990
	123	Katze		1992
	124	Katze		1992
	126	Katze		1994
	127	Hund		1990
	128	Hund		1991
	131	Hund		1993
	134	Rind		1991
	135	Rind		1992
	136	Rind		1993
	137	Rind		1994
	138	Rind		1994

2.2. Bakteriophagen

2.2.1. Labor-Phagen

Name	Genotyp	Referenz
P22-H1	Wildtyp	[Zinder und Lederberg, 1952]
P22-H5	c2 ⁻ , Klarplaque-Mutante von P22-H1	
ES18	c ⁺	[Kuo und Stocker, 1970]
λSam7	Sam7, Amber-Mutante von λ	

2.2.2. Phagen aus Naturisolaten

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakteriophagen wurden erstmals in vorangegangenen Arbeiten von Schicklmaier et al. isoliert [Schicklmaier, 1995; Schicklmaier unveröffentlicht].

Phage	natürlicher Wirt	Phage	natürlicher Wirt
PS3	SARA 3	PS38	SARA 38
PS4	SARA 4	PS39	SARA 39
PS5	SARA 5	PS40	SARA 40
PS10	SARA 10	PS41	SARA 41
PS12	SARA 12	PS43	SARA 43
PS21	SARA 21	PS44	SARA 44
PS22	SARA 22	PS45	SARA 45
PS30	SARA 30	PS46	SARA 46
PS31	SARA 31	PS49	SARA 49

Phage	natürlicher Wirt	Phage	natürlicher Wirt
PS32	SARA 32	MI78	78
PS33	SARA 33	MI81	81
PS34	SARA 34	MI84	84
MI85	85	G116	116
MII94	94	G118	118
MII95	95	G119	119
MII96	96	G120	120
MII97	97	G121	121
MII98	98	G123	123
MII100	100	G124	124
MII102	102	G126	126
MII103	103	G127	127
MII106	106	G128	128
MII107	107	G131	131
G110	110	G134	134
G111	111	G135	135
G112	112	G136	136
G113	113	G137	137
G115	115	G139	139

2.3. Vektoren

Name	Größe	Marker	Referenz
pIC19H	2,7 kb	Amp ^R	[Marsh et al., 1984]
pIC20H	2,7 kb	Amp ^R	[Marsh et al., 1984]
pPLcAT10	2,7 kb	Amp ^R	[Stanssens et al., 1985]

2.4. Plasmide

Name	Insertgröße [bp]	Insert
pAA1/1	266	TaqI-Fragmente aus Shotgunklonierung des 6 kb- <i>EcoRI</i> -Fragmentes von PS34 in pIC20H (die Plasmide enthalten teilweise multiple Inserts aufgrund einer unvollständigen enzymatischen Spaltung)
pAA1/2	989	
pAA1/3	72	
pAA1/4	330	
pAA1/5	304	
pAA1/6	ca. 1.600	
pAA1/7	ca. 1.100	
pAA1/8	ca.400	
pAA1/9	>508	
pAA1/10	356	
pAA1/12	>962	
pAA1/13	> 1.016	
pAA1/14	ca. 1.100	

Name	Insertgröße [bp]	Insert	
pAA1/15	ca. 2.000		
pAA1/16	541		
pAA1/17	342		
pAA1/18	ca. 1.100		
pAA1/20	ca. 600		
pAA1/21	ca. 500		
pAA1/22	ca. 1.100		
pAA1/23	ca. 250		
pAA1/24	ca. 500		
pAA1/25	> 1.038		
pAA1/26	ca. 1.000		
pAA5/1	ca. 340		<i>Hpa</i> I-Fragmente aus Shotgunklonierung des 6 kb- <i>Eco</i> RI-Fragmentes von PS34 in pIC19H (die Plasmide enthalten teilweise multiple Inserts aufgrund einer unvollständigen enzymatischen Spaltung)
pAA5/2	ca. 1.100		
pAA5/3	288		
pAA5/4	541		
pAA5/5	595		
pAA5/6	> 542		
pAA5/7	ca. 340		
pAA5/8	118		
pAA5/9	ca. 450		
pAA5/10	ca. 400		
pAA5/11	ca. 450		
pAA5/12	ca. 300		
pAA5/13	ca. 350		
pAA5/14	ca. 350		
pAA5/15	ca. 1.500		
pAA5/16	ca. 900		
pAA34/1	> 800	<i>Hpa</i> I-Fragmente aus Shotgunklonierung des 4,5 kb <i>Cl</i> I-Fragmentes von PS3 in pIC20H (die Plasmide enthalten teilweise multiple Inserts aufgrund einer unvollständigen enzymatischen Spaltung)	
pAA34/4	239		
pAA34/5	46		
pAA34/6	1.173		
pAA34/7	871		
pAA34/8	691		
pAA34/9	543		
pAA34/10	96		
pAA34/11	757		
pAA34/12	905		
pAA35/13	628		<i>Taq</i> I-Fragmente aus Shotgunklonierung des 4,5 kb <i>Cl</i> I-Fragmentes von PS3 in pIC20H (die Plasmide enthalten teilweise multiple Inserts aufgrund einer unvollständigen enzymatischen Spaltung)
pAA35/15	487		
pAA35/16	ca. 700		
pAA35/17	ca. 900		
pAA35/18	ca. 1.600		
pAA35/19	ca. 1.500		
pAA35/20	ca. 350		
pAA35/21	ca. 400		
pAA35/22	ca. 1.300		
pAA35/23	ca. 400		
pAA35/24	ca. 350		
pAA47/1	207	Gen 13 _{PS34}	
pAA50/1	318	Gen13 _{PS3}	

2.5. Oligonukleotide

Primer	Nukleotidsequenz
P22/13-5'	5'-TAG GCT TTT AGT CTC TCA CCT TCT-3'
P22/13-3'	5'-GGT AAG ACA TGA AAA AGA TGC CAG-3'
P22/19-5'	5'-CAT TGG GGT TGG GCA TA-3'
P22/19-3'	5'-CTG CTG CTG CCT GGT AA-3'
λ /Gen R up	5'-CGT ACC GTT CCG CCC GC-3'
λ /Gen R down	5'-CTG ACC GTT CCG CCC GC-3'
P22/ant-5'	5'-GCA GTT AAC ACC TCT TAC GTG C-3'
P22/ant-3'	5'-TCA GTA GCG ATG TAA TGA AGG T-3'
ES18/15-5'	5'-TTA TCT GCA TCA TCG TC-3'
ES18/15-3'	5'-GGT GGC GTT GAC GAG CA-3'
λ /P-5'	5'-CAT CGC CGC ACA GAT GG-3'
λ /P-3'	5'-TAC ACT TGC TCC TTT CA-3'
P22/18C-5'	5'-GAT GCG ATG AAG GTT CT-3'
P22/18C-3'	5'-GTG TTC CCT CAC GAA TTC-3'
P22/18N-5'	5'-GTC ATG CTT TCT GGG CTT AC-3'
P22/18N-3'	5'-CGG TAA ATT CCT TTT TAC-3'
λ /OC-5'neu	5'-TGG CGA ATC CTC TGA CC-3'
λ /OC-3'	5'-TAG ATC CAC CCC GTA AA-3'
ES18/18C-5'	5'-TGT CGA AAG TGT TCG GAC-3'
ES18/18C-3'	5'-GGT AGC TCG ATG GTA AC-3'
P22/sieA-5'	5'-TGC AGA TTG CGT GGT TG-3'
P22/sieA-3'	5'-ATC CAT TCG CTT CTC CG-3'
P22/sieB-5'	5'-ATG CCG GTA AGC GTA AA-3'
P22/sieB-3'	5'-CTT CCC GGC AAA TCT CA-3'
P22/nutL-5'	5'-ATC TCG TTT GGT ATT TGT TCG-3'
P22/nutL-3'	5'-CGG TTC AGA TTG GTA AAG AGC-3'
P22/23-5'	5'-GGC TGC TAT GGG AAT GG-3'
P22/23-3'	5'-TTT GAA CAG CCG AAG CC-3'
34.1.R	5'-GCA TCT ACA CAC CAT TCA GTT A-3'
34.1.F	5'-CAA AGA AGC CAG GTA TCA CGC CAT-3'
34.2.R	5'-AAG AGA GTC AGA AGC CGT AGC CCG-3'
34.2.F	5'-AGA TGC AAA GGT GTC GGC TAT TCA-3'
34.3.R	5'-TTA GAG CCC AGT CAT TCA GGG AGA-3'
34.3.F	5'-GGT TCA TCA CTT AAA GGT AAC TAC-3'
34.4.R	5'-CCC GTA GAT AGG CTT TGT AAT GGA-3'
34.4.F	5'-GAC GCG ATT CTT GAT AAC CTG AGC-3'
34/13-R1	5'-GAT ATT TCG TAG TGC CGG TGA CAT-3'
34/13-F1	5'-GCA TGT ACC GTA TGG ACA AAA TCA-3'
34/19-R1	5'-CTC ATT GCT GCC CCC ACA AAC AGA-3'
34/19-F1	5'-CAA TGT CAC CGG CAG TAC GAA ATA-3'
PAZ3-R1	5'-TAC TGC GGG CCT CCC AGA ATC-3'
PAZ3-R2	5'-GTC GCC AGG ATA AGT GGT TAC-3'
PAZ3-R3	5'-TGT CTT TCC ATC AGT CCG CCA-3'
PAZ3-R4	5'-CTC CTT TGT GTA TCT GGC AT-3'
PAZ3-R5	5'-TCA TCC CTG TAA GAC GCT CC-3'
PAZ13/34-R7	5'-TAG CCC CGA AGC TTA TCG CCG C-3'

Primer	Nukleotidsequenz
PAZ34/13-F6	5'-CTA TGA AGG TCT AGA GCA TGT A-3'
Gen3-R	5'-ATC TCC CTT ATC AGG TGT CAC G-3'
Gen3-F	5'-ATG GCA GCA CCA AAG GGC AAC C-3'
AZ/ES18-R	5'-CAT AGA CTC GCT CCG AAA T-3'
AZ/ES18-F	5'-TTT GAA GAA AAC TTA AAT A-3'
PAZ3/13-R	5'-CGC TGA GAA AGC TTA AAC TT-3'
PAZ3/13-F	5'-GAG GTG GTC TAG AAA AAC GTA-3'
pPLcAT10-R	5'-TGC CGC ATA GTT AAG CCA-3'
pPLcAT10-F	5'-ATC TCT CAC CTA CCA AAC-3'
M13/pUC universal	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13/pUC revers	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

2.6. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
DNase I, RNase frei	Boehringer, Mannheim
Klenow Polymerase	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Biomol, Hamburg
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim New England Biolabs, Schwalbach Pharmacia LKB, Freiburg Stratagene
Pfu-Polymerase	Stratagene
RNase A	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Pronase P	Sigma, Deisenhofen

2.7. Chemikalien

Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Agar Agar	Merck, Darmstadt
Antibiotika	Sigma, Deisenhofen
Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt

Dig-Easy-Hybridisierungs-Mix	Boehringer, Mannheim
dNTP Labeling Mix	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fab-Fragmente	Boehringer, Mannheim
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Hexanukleotid-Mix	Boehringer, Mannheim
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Klenow-Enzym	Boehringer, Mannheim
Nukleotide	MWG, Ebersberg
NBT	Boehringer, Mannheim
X-Gal	Biomol, Hamburg
X-Phospat	Boehringer, Mannheim
Phenol , sauer	Roth, Karlsruhe
Phenol , neutral, gepuffert mit TE	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe

Nährmedien werden von der Firma Difco, Detroit, USA bezogen. Alle anderen, hier nicht aufgeführten Feinchemikalien stammen von den Firmen Merck, Darmstadt und Roth, Karlsruhe.

2.8. Sonstiges

Hybond TM -N Nylonmembran	Amersham-Buchler, Braunschweig
Porablot NY amp	Macherey-Nagel
Whatman 3MM-Papier	Schleicher und Schüll, Dassel
Sterilfilter FPO30/2 (0,45 µm) und FPO30/3 (0,2 µm)	Schleicher und Schüll, Dassel
1 kb-Marker (DNA-Längenstandard)	Gibco BRL, Eggenstein

2.9. Medien

<u>LB-Medium:</u>	Trypton	10 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

LB-Agar enthält zusätzlich 1,5% Agar, LB-Weichagar enthält zusätzlich 0,8% Agar. Zum Plattieren wird der Weichagar in der Mikrowelle geschmolzen und bei 42°C flüssig gehalten. LB/IPTG/X-Gal-Agar enthält außerdem 0,04 mM IPTG und 20 µg/ml X-Gal. Zur Vermehrung und Konzentration von λ Sam7 werden 0,2% Maltose zugegeben. Zur Selektion ampicillin-resistenter Kolonien werden 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

<u>M9-Agar:</u>	Agar-Agar	15 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

Nach dem Autoklavieren werden folgende sterile Lösungen zugesetzt:

	10xM9-Salze	100 ml
	Glukose (20 %)	10 ml
	MgSO ₄ (1 M)	1 ml
	Thiamin (10 mg/ml, sterilfiltriert)	1 ml
<u>10xM9-Salze:</u>	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	50 g
	oder Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	75 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
	NaCl	5 g
	NH ₄ C	10 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

2.10. Puffer und Lösungen

<u>Alkalische SDS-Lösung (Sol 2)</u>	NaOH	0,2 M
	SDS	1 %
<u>Ammoniumacetat-Lösung</u>	Ammoniumacetat	1 M
	NaOH	0,1 N
<u>Chloroform-Isoamylalkohol (CIA)</u>	im Verhältnis	25 : 1
<u>Denaturierungs-Lösung (Southern-Transfer)</u>	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 N
<u>Gelauftragungspuffer für DNA (10x)</u>	Glycerin	5,8 ml
	EDTA, pH 8 (0,5 M)	4 ml
	Bromphenolblau	0,05 g
	H ₂ O	ad 10 ml
<u>Glukose-EDTA-Tris-Lösung (Sol 1)</u>	Glukose	50 mM
	EDTA, pH 8	20 mM
	Tris-HCl, pH 8	5 mM
unmittelbar vor Gebrauch ansetzen		
<u>HCl-Lösung (Southern-Transfer)</u>	HCL	0,25 M
<u>KAc-Lösung, pH 4,8 (Sol 3)</u>	Kaliumacetat (5 M)	60 ml
	Eisessig	11,5 ml
	H ₂ O	ad 100 ml
<u>Plaquelift-Lösung 1</u>	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
<u>Plaquelift-Lösung 2</u>	Tris-HCl, pH 8	1 M
	NaCl	1,5 M

<u>Sol 1</u>	siehe Glukose-EDTA-Tris-Lösung	
<u>Sol 2</u>	siehe Alkalische SDS-Lösung	
<u>Sol 3</u>	siehe Kac-Lösung, pH 4,8	
<u>SM-Puffer</u>	NaCl	5,8 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
	Tris-HCl, pH 7,5 (1 M)	50 ml
	Gelatine (2 %)	5 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
<u>SSC (20x)</u>	NaCl	175,3 g
	Na-Citrat	88,2 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Der pH-Wert der Lösung wird mit HCl auf 7 eingestellt.		
<u>SDS-Mix</u>	Tris-Hcl, pH 9,6 (1 M)	1 Vol
	SDS (10 %)	1 Vol
	EDTA, pH 7,4 (0,5 M)	2 Vol
Die Lösung muß immer frisch angesetzt werden.		
<u>TBE (10x)</u>	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	9,3 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
<u>TE</u>	Tris-HCl, pH 8	10 mM
	EDTA, pH 8	1 mM
<u>Verdünnungsflüssigkeit (VF)</u>	Bacto-Trypton	1 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

2.11. Phagenisolierung und Vermehrung

2.11.1. Einzelplaque-Isolierung

Von den in dieser Arbeit verwendeten *Salmonella*-Naturisolaten ist bereits durch vorangegangene Arbeiten [Schicklmaier, 1995; Schicklmaier unveröffentlicht] bekannt, daß sie Bakteriophagen freisetzen. Ausgehend von einer Einzelkolonie des jeweiligen Stammes werden stationäre Übernachtskulturen der Stämme in LB-Medium angezogen. Durch Zentrifugieren (2 min bei 15.000 Upm in einer Eppendorffzentrifuge) werden die freigesetzten Phagen (im Überstand) von den Bakterienzellen (im Bodensatz) abgetrennt. Um restliche Bakterien abzutöten, wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Chloroform versetzt und geschüttelt. Die freigesetzten Phagen befinden sich im Überstand. 5 – 10 µl des Überstands werden auf LB-Platten getropft, die mit einem Gemisch aus Weichagar (3 ml) und einem geeigneten Indikatorstämmen (2×10^8 Zellen) überschichtet sind. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C bebrütet.

Vermehren sich die Phagen auf dem Indikator, so erhält man im Tropfareal Plaques, die entweder einzeln liegen oder auch so dicht benachbart sein können, daß der gesamte Tropfbereich lysiert ist. In diesem Fall werden verschiedene Verdünnungsstufen des Überstandes erneut auf den entsprechenden Indikator getropft, um die Plaques zu vereinzeln.

Einzelplaques werden mit einer Pasteurpipette ausgestochen und in ein Eppendorffgefäß mit 1 ml Verdünnungsflüssigkeit oder SM-Puffer und 50 µl Chloroform aufbewahrt.

2.11.2. Flüssiglysate

Steht als Ausgangsmaterial für ein Flüssiglysat nur der ausgestochene Einzelplaque zur Verfügung, muß zunächst eine ausreichende Menge an Phagen gewonnen werden, um damit im Anschluß größere Kulturansätze infizieren zu können. Dies kann entweder durch direkte Infektion eines kleinen Volumens des Wirtsstammes (2 – 5 ml) mit dem Einzelplaque oder mit ca. 100 µl der Verdünnungsflüssigkeit, in der der Phage konserviert wird, erfolgen.

Ist eine ausreichende Phagenmenge zur Infektion eines größeren Kulturansatzes vorhanden, werden 50 ml LB-Medium mit 1/100 Volumen einer Übernachtskultur des Wirtsstammes beimpft und aerob bei 37°C bis zum Erreichen einer bestimmten OD_{580nm} inkubiert. Bei Trübplaque-Phagen soll die OD_{580nm} bei 0,15 – 0,2 liegen (d.h. bei ca. $1 - 1,5 \times 10^8$ Zellen/ml), bei Klarplaque-Phagen bei 0,25 (d.h. bei ca. 2×10^8 Zellen/ml).

Zur Infektion wählt man bei Trübplaque-Phagen eine niedrige MOI (**m**ultiplicity **o**f **i**nfection) von 0,1 – 0,3, um eine Lysogenisierung der Kultur zu vermeiden. Bei Klarplaque-Phagen hingegen infiziert man mit einer hohen MOI von ≥ 5 , damit in einem Vermehrungszyklus nahezu alle Zellen lysiert werden. Von dieser Regel abweichende MOIs sind bei der Beschreibung der einzelnen Versuche in den jeweiligen Ergebnisteilen angegeben.

Anschließend wird die Kultur bis zum Aufklaren weiter inkubiert: bei Trübplaque-Phagen 150 –180 min, bei Klarplaque-Phagen 90 min, jedoch nicht länger als 200 min bzw. 120 min. Noch intakte Bakterienzellen werden durch Zugabe einiger Tropfen Chloroform lysiert. Durch Zentrifugation (15 min bei 8.000 Upm, Sorvall Superspeed RC2-B, Rotor SS34) werden die Zellreste sedimentiert. Der klare Überstand, der die Phagen enthält, wird sterilfiltriert.

2.11.3. Plattenlysate

Plattenlysate eignen sich gut zur Gewinnung von Lysaten mit hohem Titer und geringem Volumen. Hierzu werden LB-Platten mit einem Gemisch aus Weichagar (3 ml), 100 μ l der VF mit dem konservierten Einzelplaque und 100 μ l einer Übernachtskultur eines Indikators überschichtet und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Menge der zugegebenen Phagen soll zu einer konfluenten Lyse der Indikatorbakterien führen. Die bebrüteten LB-Platten werden mit ca. 5 ml SM oder LB 90 min leicht geschüttelt. Dadurch löst sich der Großteil der Phagen aus dem Agar. Anschließend wird der Überstand mit einer Pipette abgesaugt. Durch Zentrifugation (10 min bei 6.000 Upm) werden Zell- und Agarreste entfernt.

2.11.4. Titerbestimmung

Zur Titerbestimmung wird vom Phagenlysate eine Verdünnungsreihe (10^0 – ca. 10^{-11}) in SM oder VF hergestellt. Jeweils 100 μ l jeder Verdünnung werden mit 100 μ l Indikator und 3 ml Weichagar gemischt und auf LB-Platten plattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag werden die Phagenplaques ausgezählt und der Phagentiter berechnet.

2.11.5. Konzentrierung von Phagen durch Ultrazentrifugation

Das von Zellresten gereinigte Lysat wird 90 min bei 22.000 Upm zentrifugiert (Kontron-Zentrifuge TGA-50, Rotor TST 2838). Das Phagensediment wird über Nacht in 400 µl SM unter Schütteln gelöst. Um freie DNA oder RNA abzubauen, werden je 10 µl DNase und RNase (je 10 mg/ml) zugesetzt.

2.11.6. Vermehrung und Konzentrierung von λ -Phagen durch Induktion

Alle Medien, die zur Vermehrung von λ -Phagen verwendet werden, enthalten 0,2 % Maltose. Der Stamm RM80, der den Phagen λ_{cl857} Sam7 als Prophagen enthält, wird auf 2 LB-Platten ausgestrichen. Hierbei sollen mehrere Kolonien ausplattiert werden, um eine Selektion zugunsten von λ -Revertanten zu verhindern. Eine Platte wird über Nacht bei 30°C bebrütet, die andere bei 42°C. Nur auf der bei der niedrigeren Temperatur bebrüteten Platte darf ein Bakterienwachstum zu sehen sein. Von dieser Platte wird eine Übernachtskultur (5 ml, 30°C, stehend) angelegt. Am nächsten Tag werden 250 ml LB mit dieser Kultur beimpft und bei 30°C kräftig gerührt, bis die Kultur eine Dichte von $OD_{560nm} = 0,5$ erreicht hat. Die Kultur wird für 20 min in ein 45°C-Wasserbad überführt und weiter gerührt, hier erfolgt die Induktion des Prophagen. Anschließend wird die Kultur bei 39°C für weitere 150 min kräftig gerührt. Da der λ_{cl857} Sam7-Phage im Gen S eine Amber-Mutation trägt, erfolgt keine spontane Lyse der Bakterien. Die reifen Phagenpartikel bleiben daher in den Zellen gefangen und können zusammen mit diesen durch Zentrifugation (5°C, 6.000 Upm, 15 min) konzentriert werden. Der zellhaltige Niederschlag wird in 5 ml SM-Puffer resuspendiert, mit 1 ml Chloroform versetzt, gut gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit lysieren die Zellen. Durch Zugabe von DNase (Endkonzentration 0,2 µg/ml) und RNase (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und 10 min Inkubation bei RT wird die freigewordene zelluläre DNA und RNA verdaut. Anschließend wird der Ansatz 15 min bei 20°C bei 8.000 Upm zentrifugiert (Sorvall Superspeed-Zentrifuge RC2-B, Rotor SS34). Der Überstand enthält die reifen Phagenpartikel. Eine Titerbestimmung erfolgt auf einem Suppressorstamm (*E. coli* LE392 oder *E. coli* NM538) als Indikator bei 42°C.

2.11.7. Lysogenisierung

Um einen Phagen als Prophagen in einem Bakterienstamm zu etablieren (Lysogenisierung), wird zunächst der Bakterienstamm mit dem Phagen durch Auftropfen eines Lysats auf LB-Platten (mit einem Gemisch aus Weichagar (3 ml) und dem Bakterienstamm [2×10^8 Zellen]) infiziert. In der Lysezone eines temperenten Phagen befinden sich immer sowohl lysierte Zellfragmente als auch nicht-lysierte Zellen, die den Prophagen besitzen. Aus dem Lyseareal werden mit einer Impföse einige Bakterien entnommen und in einem Verdünnungsausstrich ausplattiert. Aus einer Einzelkolonie wird erneut ein Verdünnungsausstrich hergestellt. Dieser Vorgang wird 3 – 4 x wiederholt. Dadurch erreicht man, daß freie Phagen ausverdünnt werden, man erhält eine Reinkultur an lysogenen Bakterien. Anschließend wird ausgehend von einer Einzelkolonie des Stammes eine stationäre Übernachtskultur in LB-Medium angezogen. Wie in **2.11.1.** beschrieben, werden aus dem Überstand der Kultur die freigesetzten Phagen isoliert. Tropft man diesen Überstand erneut auf den nicht-lysogenen Indikator, so muß nun eine Lyse durch die freigesetzten Phagen erfolgen (Positivkontrolle). Bei Auftropfen des Überstandes auf den lysogenen Indikator hingegen dürfen keine Phagenplaques mehr entstehen (Negativkontrolle). Die Vermehrung der Phagen erfolgt wie in **2.11.2.** bis **2.11.5.** beschrieben.

2.12. Isolierung und Bearbeitung von Nukleinsäuren

2.12.1. Isolierung von Phagen-DNA

Der durch Ultrazentrifugation konzentrierte und anschließend resuspendierte Phagenniederschlag (siehe **2.11.5.**) wird mit 40 µl Pronase P (10 mg/ml) versetzt und gründlich gemischt. Anschließend werden 80 µl SDS-Mix zugegeben und erneut gemischt. Der Ansatz wird eine Stunde bei 30°C und eine Stunde bei 70°C inkubiert. Sofort im Anschluß daran gibt man 100 µl 8 M KAc (ungepuffert, über Whatmann Papier filtriert) dazu und inkubiert weitere 15 min auf Eis. Denaturierte Proteine werden durch Zentrifugation (15 min bei 15.000 Upm in Sigma-Zentrifuge 2K15, Rotor Nr. 12145) bei 4°C abgetrennt. Der Überstand wird abgenommen und das Volumen mit TE auf 1.000 µl erhöht. Zum Öffnen der Phagenköpfe und zur Denaturierung der Proteine wird 1 Vol Phenol/Chloroform zugegeben und der Ansatz 15 – 20 min geschüttelt. Anschließend wird zur Phasentrennung 10 min bei 15.000 Upm (Sigma-Zentrifuge 2K15, Rotor Nr. 12145) zentrifugiert. Der DNA-haltige, wässrige Überstand wird von der gelben, phenolhaltigen Phase und der weißen Interphase getrennt und erneut mit

einem Volumen Phenol versetzt. Diese Behandlung wird so oft wiederholt, bis keine sichtbare Interphase mehr entsteht. Dazu sind in der Regel drei bis vier Phenolbehandlungen erforderlich. Um das Phenol vollständig aus der Probe zu entfernen, wird mit 1 Vol CIA nachgereinigt. Die in der oberen Phase enthaltene DNA wird mit 1/10 Vol 3 M NaAc (ungepuffert) und 1 Vol 100 % Isopropanol ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 4°C (20 min bei 15.000 Upm in einer Sigma Zentrifuge 2K12) wird die DNA sedimentiert. Anschließend wird sie mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem dem Ansatz entsprechenden Volumen H₂O gelöst (ausgehend von einem 40 ml-Lysat in etwa 50 µl).

2.12.2. Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly [*Birnboim und Doly, 1979*]

1,5 ml einer ÜK werden 1 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 100 µl Sol 1 resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Sol 2 erfolgt die Zell-Lyse (hierbei darf nur vorsichtig gemischt werden) und 5 min Inkubation auf Eis. Danach wird der Ansatz mit 150 µl Sol 3 (eiskalt) versetzt, erneut vorsichtig gemischt und nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Hierbei bildet sich ein weißer Niederschlag aus Proteinen und Zellwandbestandteilen. Die Suspension wird 5 min bei 13.000 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Sigma Zentrifuge 2K12) und der plasmidhaltige Überstand mit 2 Vol 100 % EtOH gefällt. Der Niederschlag wird mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE aufgenommen.

2.12.3. Plasmidpräparation über Ionenaustauschersäulen

DNA, die zum Sequenzieren verwendet werden soll, sollte, um einen möglichst hohen Reinheitsgrad zu erreichen, mit kommerziell erhältlichen Ionenaustauschersäulen präpariert werden. Hierbei wird nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, QIAprep Spin Miniprep Kit) verfahren.

2.12.4. DNA-Spaltung

Spaltungen von DNA mit Restriktionsenzymen wird gemäß den Angaben und mit den Puffersystemen der entsprechenden Hersteller (Boehringer, Mannheim, New England Biolabs, Pharmacia LKB, Stratagene) durchgeführt.

2.13. Transformation von *Escherichia coli*

Die Herstellung kompetenter Zellen des *E.coli*-Stamms JM109 sowie die Einführung der Plasmide pIC 19H und pIC20H in die kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgt nach der Methode von Nishimura [Nishimura *et al.*, 1990].

Die Einführung des Plasmids pPLcAT10 in den *E. coli*-Stamm POP2135 sowie die Herstellung kompetenter Zellen von POP2135 erfolgt nach der Methode von Remaut [Remaut *et al.*, 1981].

2.14. Agarosegelelektrophorese

Die elektrische Aufspaltung von DNA-Fragmenten erfolgt in 0,5 – 1,2 % horizontalen Agarosegelen mit 1xTBE als Laufpuffer bei einer Spannung von 70 – 100 Volt. Zum Anfärben der DNA wird dem Gel und dem Laufpuffer 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Molekulargewichtsmarker dienen mit *EcoRI* gespaltene P22-DNA, mit *HindIII* gespaltene λ -DNA sowie der 1 kb-Marker.

Fragmentgrößen der Molekulargewichtsmarker:

P22/ <i>EcoRI</i>		λ / <i>HindIII</i>		1 kb-Marker	
Fragment	Länge [bp]	Fragment	Länge [bp]	Fragment	Länge[bp]
A	19.510	A	23.130	A	12.216
B	9.278	B	9.416	B	11.198
C	7.322	C	6.557	C	10.180
D	4.077	D	4.361	D	9.162
E	2.490	E	2.322	E	8.144
F	1.181	F	2.027	F	7.126
G	1.114	G	564	G	6.108
H	830	H	125	H	5.090
				I	4.072
				J	3.054
				K	2.036
				L	1.636

				M	1.018
				N	517/506
				O	396
				P	344
				Q	298
				R	230
				S	201
				T	154
				U	134
				V	75

2.15. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird der QIAquick Gel Extraktionskit von Qiagen verwendet und dabei nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.16. Hybridisierungen

2.16.1. Nichtradioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin-11-dUTP

Zur Hybridisierung membrangebundener DNA mit Digoxigenin-markierten Sonden wird mit dem „Nonradioactive DNA labelling and detection kit“ von Boehringer, Mannheim, nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.16.2. Transfer von DNA auf Nylonmembran (Southern-Blot nach Smith [Smith, 1980])

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wird über ein Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wird zunächst unter leichtem Schütteln 2 x 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, anschließend 2 x 15 min in Denaturierungs-Lösung und schließlich 2 x 30 min in Ammoniumacetat-Lösung. Alle Schritte erfolgen bei RT. Zum Transfer der DNA wird das Gel mit der Unterseite nach oben auf eine Glasplatte oder Kunststoff-Folie gelegt. Eine Nylonmembran in der Größe des Gels wird mit Ammoniumacetat-Lösung befeuchtet und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Als nächstes folgen drei Lagen Whatmann 3MM-Papier, die ebenfalls in Ammoniumacetat-Lösung getränkt sind, und ein Stapel Papierhandtücher. Diese bewirken, daß die DNA durch den Kapillarstrom der Ammoniumacetat-Lösung auf die Nylonmembran übertragen wird. Der Aufbau wird über Nacht mit 1 – 2 kg beschwert.

Am nächsten Tag wird die Membran luftgetrocknet und die einzelsträngige DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm, 30 s, 120 mJ) auf sie fixiert.

2.16.3. Dot-Blot

Ungeschnittene DNA wird durch 10 min Inkubation bei 95°C und 5 min schnelles Abkühlen auf Eis denaturiert. Gegebenenfalls kann die DNA vor dem Aufkochen mit H₂O oder 2xSSC verdünnt werden. Anschließend werden 1 – 3 µl auf eine Nylonmembran aufgetropft und durch UV-Licht fixiert.

2.16.4. Plaquelift

Für einen Plaquelift sollen die Platten ca. 2 Tage bei 4°C aufbewahrt werden, um ein Ablösen des Indikators zu vermeiden. Die Nylonmembran wird 1 min luftblasenfrei auf die Platten aufgelegt und zur besseren Orientierung mit einer Nadelspitze markiert. Alle folgenden Schritte werden mit der Phagenseite nach oben durchgeführt. Die Membran wird 5 min auf in Plaquelift-Lösung 2 getränktes Whatmann 3MM-Papier gelegt, anschließend 2 min auf trockenes Whatmann 3MM-Papier und schließlich 5 min auf in Plaquelift-Lösung 2 getränktes Whatmann 3MM-Papier. Nach dem Trocknen wird die Membran durch UV-Licht fixiert.

2.16.5. Hybridisierung

Die Hybridisierung, das Waschen der Filter sowie der immunologische Nachweis erfolgen nach den Angaben des Herstellers Boehringer, Mannheim, im "Nonradioactive DNA labelling and detection kit".

2.17. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

In den PCR-Ansätzen wird die DNA in 100 µl Reaktionsvolumen in 30 Zyklen amplifiziert. Die Ansätze enthalten 1xPCR-Puffer, 25 mM/dNTP, 250 ng/Oligonukleotid, ca. 100 ng "Template"-DNA und 1 U Taq- bzw. 5 U Pfu-Polymerase.

2.18. Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgt durch Spaltung der PCR-Produkte sowie der Vektoren, anschließende Ligation und Einführung der Plasmide in geeignete *E. coli*-Stämme. Die genaue Vorgehensweise ist in Teil 4.A.4. ausführlich erläutert.

2.19. DNA-Sequenzierung

Der Großteil der Sequenzen wurde von der Firma TopLab, Martinsried, sequenziert. Für einige Sequenzen stand ein automatischer "Sequencer" zur Verfügung, mit dessen Hilfe nach vorangegangener Dye Terminator Cycle-Sequenzierung mit AmpliTaq FS und Ethanol-Fällung die Sequenzen ermittelt wurden.

2.20. Strukturanalysen

Strukturanalysen wurden mit Hilfe folgender Computerprogramme durchgeführt:

Predict-Protein: <http://dodo.cpmc.columbia.edu/predictprotein/>
[Rost, 1996]

TM-Pred: http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html

TopPred2: <http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/>
Stockholm University, Theoretical Chemistry, Protein Prediction Server

SOSUI: <http://azusa.proteome.bio.tnat.ac.jp/sosui/>
Mitaku Group, Department of Biotechnology,
Tokyo University of Agriculture and Technology

Anmerkung: Da die Kapitel 3, 4 und 5 der vorliegenden Arbeit jeweils in einen Ergebnis- und einen Diskussionsteil gegliedert sind, sind zum besseren Verständnis den einzelnen Kapiteln kurze Einleitungen vorausgestellt.

3. Entstehung neuer Modulkombinationen unter Laborbedingungen

Die Evolution durch Modulaustausch spielt eine entscheidende Rolle für die große Vielfalt aller Bakteriophagen und natürlich auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vertreter der lambdoiden Familie. In der Natur finden die hierzu notwendigen Rekombinationsereignisse vermutlich am häufigsten durch Superinfektion einer lysogenen Zelle durch einen zweiten Phagen statt.

In Teil **3.A.** wurde diese Situation unter Laborbedingungen simuliert.

Als überinfizierende Phagen wurden zwei gut untersuchte Vertreter des P22-Astes der lambdoiden Familie gewählt, die Phagen P22 und ES18.

Diese homoimmunen Phagen besitzen die gleiche ImmC-Region. P22 ist jedoch durch seine zusätzliche Imml-Region in der Lage, einen Antirepressor auszubilden. Dieser befähigt ihn, sich in lysogenen Zellen mit homoimmunem Prophagen zu vermehren. Gleichzeitig werden sowohl homoimmune als auch heteroimmune Prophagen induziert, ihre Replikation wird herbeigeführt und die Wahrscheinlichkeit für ein Rekombinationsereignis erhöht.

Durch die bereits in der Einleitung ausführlich dargestellten unterschiedlichen Immunitätssituationen von ES18 und P22 sollten Rückschlüsse auf die Rolle des Antirepressors für die Entstehung der genetischen Vielfalt der lambdoiden Phagen gezogen werden. Hierzu wurde die Häufigkeit des Auftretens von Austauschereignissen bei der Superinfektion durch P22 und ES18 untersucht (Teil **3.A.2.**).

Gleichzeitig wurde geprüft, wieviele verschiedene "neue" Mitglieder der lambdoiden Familie durch die Rekombination von zwei Phagen entstehen können. Tragen die Rekombinanten zur Erhöhung der Variabilität bei, wenn sie als neue Mitglieder der Population an weiteren Infektionszyklen teilnehmen? Zur Beantwortung dieser Frage wurden die ursprünglichen Kulturen über fünf Generationen hinweg subkultiviert und die entstandenen Rekombinanten mittels Hybridisierungs- und Restriktionsanalysen untersucht.

Während temperente Wildtyp-Phagen nach der Infektion des Wirts die Möglichkeit haben, zwischen dem lytischen und dem lysogenen Entwicklungsprogramm zu wählen, können ihre Klarplaquemutanten nur den lytischen Zyklus durchführen. In Teil **3.A.3.** wurde die Entstehung rekombinanter Phagennachkommen bei der Superinfektion einer lysogenen Zelle durch die

temperenten Wildtypen der Phagen P22 (interne Laborbezeichnung P22-H1) und ES18 mit denen durch ihre entsprechenden Klarplaquemutanten P22-H5 und PGV1 verglichen.

Die Rolle des zahlenmäßigen Verhältnisses von infizierenden Phagen zu lysogenen Wirtszellen bei der Entstehung neuer Modulkombinationen wurde sowohl in **3.A.2.** und **3.A.3.** durch Parallelansätze mit unterschiedlichen MOIs untersucht.

Bei der Auswahl des Prophagen und des Wirtsstamms wurden folgende Kriterien beachtet:

- Um den Austausch möglichst vieler Module nachweisen zu können, sollte der Prophage viele Unterschiede zu den superinfizierenden Phagen besitzen.
- Der Prophage mußte in einem Wirtsstamm etabliert sein, der die anschließende Superinfektion durch die Phagen P22 bzw. ES18 zuließ.
- Der Prophage mußte heteroimmun zu P22 und ES18 sein, damit eine Infektion der lysogenen Zelle durch beide möglich war.

Aus diesen Gründen wurde eine Kollektion von Phagen des P22-Astes der lambdoiden Familie aus Naturisolaten (natürlicher Wirt: *Salmonella typhimurium*; dieses Labor) zur Auswahl eines geeigneten Prophagen herangezogen.

Die Wahl fiel schließlich auf den Phagen G119, der sich als Prophage in einem Isolat des *Salmonella typhimurium*-Stamms Copenhagen etabliert hat. Dieser Stamm wird im Folgenden nach der laborinternen Bezeichnung als *Salmonella typhimurium* 119 bezeichnet. Bei dem Phagen G119 handelt es sich um einen temperenten, allgemein transduzierenden Bakteriophagen, der zum P22-Ast der lambdoiden Familie gehört und nur wenig Ähnlichkeit zu P22 und ES18 besitzt [Schicklmaier, persönliche Mitteilung].

3.A. Ergebnisse

3.A.1. Charakterisierung der beteiligten Phagen

3.A.1.1. Hybridisierungsexperimente zum Vergleich des Genoms von G119 mit den Genomen von ES18 und P22

Zur Untersuchung des Austauschs von Genomteilen zwischen dem Prophagen G119 und den überinfizierenden Phagen ES18 und P22 wurden zuerst die Genome der Phagen miteinander verglichen. Dazu wurden *Southern-blots* EcoRI-gespaltener DNA des freien Phagen G119 mit unterschiedlichen Sonden der Phagen ES18, P22 und λ hybridisiert. Zur Abdeckung eines möglichst breiten Spektrums stammten die verwendeten Sonden aus unterschiedlichen funktionellen Bereichen der Genome (**Tab. 3.A.1.** und **Abb. 3.A.1.**):

- Die Gene für Morphogenese und Verpackung der Phagen P22, λ und ES18 wurden durch die Sonden S7, S8 und S9 repräsentiert. Mit den Sonden S7 und S8 kann der Kopf eines Phagen dem P22- oder dem λ -Ast der lambdoiden Familie zugeordnet werden. Die Präparation der ES18-Sonde erfolgte lediglich aufgrund ihrer Lage an analoger Stelle im Genom anderer lambdoider Phagen, da von ES18 keine Sequenzdaten aus diesem Bereich vorlagen. Deshalb muß das Ergebnis der Hybridisierung mit S9 vorsichtig bewertet werden.
- Die Sonden Z1, Z2, S3, S11 stammten aus den Lysisregionen der Phagen P22, ES 18 und λ . Auf diesen Bereich wird in Teil 4 im Detail eingegangen.
- Die Replikationsgene wurden durch die Sonden S5, S13 und S14 von P22, S4 und S16 von ES18 sowie S12 und S15 von λ abgedeckt. Die Gene 18_{P22} (S13, S14) und 12_{P22} (S5) stellen die funktionellen Analoga zu den Genen O_λ (S4, S15) und P_λ (S12) dar. Die N-Termini der gp 18_{P22} bzw. O_λ sind für die spezifische Erkennung des *origin of replication* verantwortlich. In dem entsprechenden Genbereich besitzen die Phagen ES18 und λ innerhalb der ersten 454 von insgesamt 738 Nukleotiden beträchtliche Übereinstimmungen (96%), P22 besitzt nur innerhalb der ersten 114 Nukleotide dieser Region Ähnlichkeiten (39%) zu ES18 und λ [Schicklmaier, 1995]. Die 3'-Bereiche der Gene 18_{P22} bzw. O_λ der beiden Phagen, deren Proteine mit dem Genprodukt von 12_{P22} bzw. P_λ interagieren, lassen keinerlei Ähnlichkeiten erkennen.
- Die ImmC-Segmente der Lambdoiden erfüllen im Lebenszyklus der Phagen jeweils gleiche Funktionen. Auch ihre interne Struktur (Anordnung der Gene 24, c2, cro, c1, sowie

Sonde	Gen (Abstammung)	Funktion/ Genprodukt	Größe (bp)	markiertes Fragment	Hybridisierungstemperatur (°C)
Z1	13 (P22)	Lyse/Holin	383	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/13-5'</i> und <i>P22/13-3'</i> *	52
Z2	19 (P22)	Lyse/ Endolysin	259	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/19-5'</i> und <i>P22/19-3'</i>	48
S3	<i>R</i> (λ)	Lyse/ Endolysin	439	PCR-Fragment aus λ mit Primern <i>λ/Gen R up</i> und <i>λ/Gen R down</i>	44
S4	18 (ES18) 5'-Ende	Replikation	172	<i>DraI/Sau96I</i> -Fragment innerhalb des homologen Bereichs im Gen 18 von ES18 und O von λ	38
S5	12 (P22)	Replikation	1475	<i>HindIII</i> -G-Fragment aus P22	45
Z6	<i>ant</i> (P22)	Immunität/ Antirepressor	879	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/ant-5'</i> und <i>P22/ant-3'</i>	44
S7	1 (P22)	Verpackung und Morphologie	1692	<i>PstI</i> -F-Fragment aus P22	44
S8	Strukturgen (λ)	Verpackung und Morphologie	4593	<i>NruI</i> -D-Fragment aus λ	46
S9	Strukturgen (ES18)	potentieller Bereich, Verpackung und Morphologie	1100	<i>EcoRV/PstI</i> -Fragment aus Klon pPS55.12 (die Lage der Strukturgene wurde aufgrund der Analogien zur λ - und P22-Genanordnung geschätzt)	42
S10	<i>c2</i> (ES18)	Immunität/ Repressor	124	<i>TaqI</i> -Fragment aus dem Bereich des <i>c2</i> -Gens von ES18	42
S11	15 (ES18)	Lyse	260	PCR-Fragment aus ES18 mit Primern <i>ES18/15-5'</i> und <i>ES18/15-3'</i>	45
S12	<i>P</i> (λ)	Replikation	691	PCR-Fragment aus λ mit Primern <i>λ/P-5'</i> und <i>λ/P-3'</i>	59
S13	18 (P22) 3'-Ende	Replikation	315	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/18C-5'</i> und <i>P22/18C-3'</i>	55
S14	18 (P22) 5'-Ende	Replikation	312	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/18N-5'</i> und <i>P22/18N-3'</i>	54
S15	O (λ) 3'-Ende	Replikation	409	PCR-Fragment aus λ mit Primern <i>λ/OC-5'neu</i> und <i>λ/OC-3'</i>	59
S16	18 (ES18) 3'-Ende	Replikation	263	PCR-Fragment aus ES18 mit Primern <i>ES18/18C-5'</i> und <i>ES18/18C-3'</i>	57
U17	<i>sieA</i> (P22)	Superinfektions-Ausschluß	401	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/sieA-5'</i> und <i>P22/sieA-3'</i>	42
U18	<i>sieB</i> (P22)	Superinfektions-Ausschluß	419	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/sieB-5'</i> und <i>P22/sieB-3'</i>	42
U19	<i>nutL/nutC</i> (P22)	Anti-termination (späte Transkription)	1162	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/nutL-5'</i> und <i>P22/nutC-3'</i>	42
Z20	23 (P22)	Anti-termination (frühe Transkription)	356	PCR-Fragment aus P22 mit Primern <i>P22/23-5'</i> und <i>P22/23-3'</i>	45

Tab. 3.A.1.:

Hybridisierungssonden zur Analyse des Genoms von G119

Legende: S - isoliert von [Schicklmaier und Schmieger, 1995], U - isoliert von [Sellherr, 1996], Z - isoliert im Rahmen dieser Arbeit.

Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind in Teil 2.5. aufgeführt.

Soweit in der Tabelle keine Angaben hierzu gemacht wurden, wurden die Primer M13/pUC universal und revers verwendet.

die Anordnung von Operator- und Promotorregionen) ist identisch. Selbst bei temperenten Phagen, die nicht zur lambdoiden Familie gehören, sind Ähnlichkeiten auf der Funktionsebene nachgewiesen worden [Miller und Kokjohn, 1987]. Die Immunitätsregionen ImmC und ImmI, deren Funktionen bereits in der Einleitung ausführlich erläutert wurden, wurden durch die Sonden S10 (ES18) und Z6 (P22) repräsentiert.

- Im Bereich der ImmC-Region liegen unter anderem die beiden Erkennungssequenzen für das gp24_{P22}, die sogenannten *nut-sites* *nutL* und *nutR*, die sowohl für das lytische Programm des Phagen als auch zur Etablierung des lysogenen Zustandes benötigt werden. Dieser Bereich wurde durch die Sonde U19 erfaßt.
- Die Sonden U17 und U18 wurden aus Bereichen der Gene *sieA* und *sieB* (*superinfection exclusion*) des Phagen P22 präpariert. Die Produkte dieser Gene sind nicht essentiell. Sie stellen, wie bereits in Teil 1 beschrieben, einen zusätzlichen Schutzmechanismus des P22-Prophagen gegen überinfizierende Phagen dar.
- Außerdem stand eine Sonde (Z20) für das Gen 23_{P22} zur Verfügung, dessen Genprodukt für die Regulation der späten Gene verantwortlich ist.

Die verwendeten Sonden stammten z. T. aus vorangegangenen Arbeiten von Schicklmaier [Schicklmaier, 1995; Schicklmaier und Schmieger, in Vorbereitung] oder Sellherr [Sellherr, 1997], z. T. wurden sie im Rahmen dieser Arbeit präpariert.

Die Hybridisierungen mit den oben beschriebenen Sonden identifizieren den Phagen G119 eindeutig als Mitglied des P22-Astes der lambdoiden Familie (**Abb. 3.A.1.**). Zum Phagen λ zeigt er, außer im Bereich des Gens 15 (siehe unten), keinerlei Ähnlichkeiten. Aus diesem Grund werden im Folgenden die Genbezeichnungen des Phagen P22 für G119 übernommen.

In den folgenden Abschnitten ist, getrennt nach unterschiedlichen funktionellen Bereichen, der Aufbau des Genoms von G119 sowie die Eignung der einzelnen Regionen zur Identifizierung von rekombinanten Nachkommenphagen in den einzelnen Superinfektionsversuchen mit P22 und ES18 beschrieben.

In allen essentiellen Bereichen, in denen keine Homologien zu den bekannten Genen der Phagen P22, ES18 und λ nachgewiesen werden können, muß davon ausgegangen werden, daß G119 andere Modulallele besitzt.

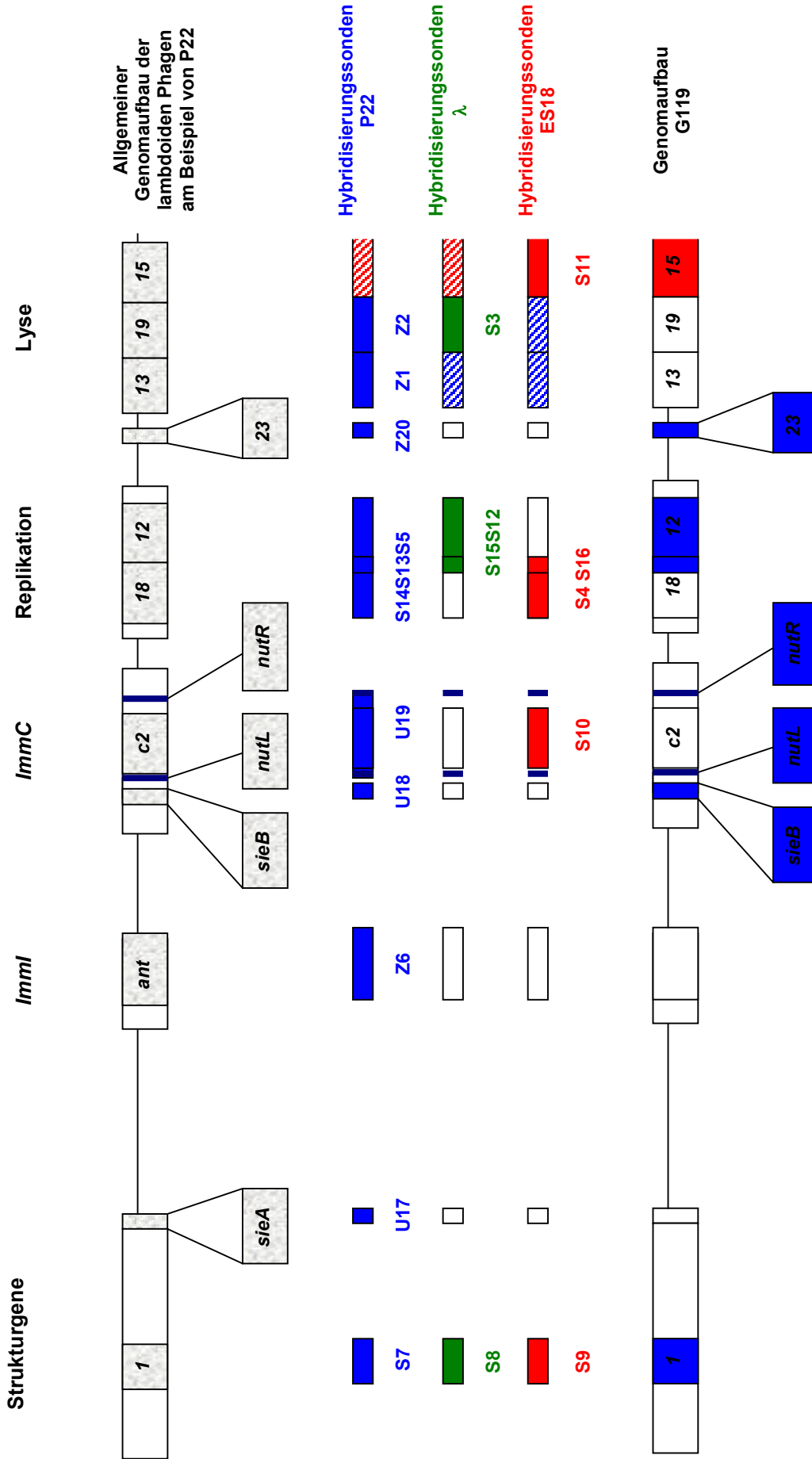


Abb. 3.A.1.1.: Genomaufbau des Phagen G119
 Gezeigt ist die Lage der verwendeten Sonden aus den Genomen von P22, λ und ES18 sowie die Ergebnisse der Hybridisierungen mit G119.
 ■ Allele des Phagen P22 ■ Allele des Phagen λ ■ Allele des Phagen ES18
 Die straffierten Flächen bezeichnen gleiche modulare Allele in den einzelnen Phagen.

-
- Aus dem Bereich der Kopfgene stand jeweils eine Sonde aus den Phagen P22 und ES18 zur Verfügung. Die verwendete P22-Sonde stammte aus dem Bereich des Gens 1. Dieses kodiert für das sogenannte *portal protein*, das Bestandteil des Kopfes ist [Eppeler et al., 1991]. Der Phage ES18 zeigt in diesem Bereich keine nachweisbaren Homologien zu P22 [Schicklmaier, 1995], er verpackt seine DNA jedoch ebenso wie P22 nach dem bereits beschriebenen *headful*-Mechanismus. Es muß davon ausgegangen werden, daß er hier ein anderes, noch nicht charakterisiertes Modul besitzt. Der Phage G119 liefert bei der Hybridisierung ein Signal mit der P22-Sonde (S7). Da die Genprodukte der Kopf- und Verpackungsregion aufgrund ihrer Funktionen spezifisch miteinander oder mit DNA-Sequenzen aus diesem Bereich interagieren, besteht Grund zu der Annahme, daß auch die anderen Gene der Region von G119 den Genen von P22 entsprechen und zusätzlich die gleiche Organisation aufweisen. Die Kopfregion von G119 wurde deshalb nur bei den Superinfektionsexperimenten mit ES18 zur Identifizierung rekombinanter Nachkommen genutzt.

 - Bezüglich seiner Immunität wurde der Phage G119 bereits an Hand biologischer Tests als heteroimmun zu P22 und ES18 eingestuft [Schicklmaier, persönliche Mitteilung]. Dies stellte eine der Grundvoraussetzungen für die Durchführbarkeit der Superinfektionsexperimente dar. Die Hybridisierung mit der Sonde aus dem Bereich des, zwischen den *nut-sites* liegenden, *c2*-Repressors aus der Immunitätsregion ImmC von ES18 bestätigt das Ergebnis der biologischen Untersuchungen. Sowohl in den Superinfektionsexperimenten mit P22 als auch mit ES18 konnte ein Austausch in dieser Region deshalb als Kriterium für Rekombinationen zwischen den beiden Elternphagen herangezogen werden.
 Mit dem Besitz der ImmI-Region als zweiten, zusätzlichen Immunitätsbereich stellt P22 eine Besonderheit unter den lambdoiden Phagen dar. Der Besitz eines Antirepressors wurde bis heute nur bei einigen wenigen lambdoiden Phagen außer P22 beschrieben [Schicklmaier, 1995]. Der Phage G119 besitzt genauso wie der Phage ES18 keinen Antirepressor. Aus diesem Grund konnte die Antirepressorsonde für die Identifizierung und Charakterisierung der P22/G119-Rekombinanten herangezogen werden.

 - Die *nut-sites* der Phagen P22 und ES18 stimmen überein, genauso wie die Sequenzen der dazwischen liegenden Gene *cro*, *c2* und *24*. Der Phage G119 liefert bei den Hybridisierungen mit der Sonde der *nut-sites* von P22 ein Signal. Aus diesem Grund waren die

nut-sites für die Untersuchung von Austauschereignissen bei den Superinfektionsexperimenten mit ES18 bzw. mit P22 nicht geeignet.

- Zur Replikation seines Genoms benötigt der Phage P22 die Genprodukte der beiden Replikationsgene *18* und *12*. Gp 18 bindet als Dimer spezifisch an den innerhalb von Gen *18* gelegenen Replikationsorigin (*ori*) von P22 und gleichzeitig an gp 12. Dabei ist der C-Terminus des Proteins für die Wechselwirkung mit gp 12, der N-Terminus für die Spezifität bei der DNA-Bindung verantwortlich. Beim Phagen ES18 wurde bis heute kein analoges Gen zu Gen *12_{P22}* gefunden [Schmieger, *persönliche Mitteilung*]. Für die verschiedenen Domänen von Gen *18* standen Sonden aus beiden Referenzphagen (P22 und ES18) zur Verfügung, für Gen *12* eine Sonde aus P22. Die Hybridisierungen mit den verwendeten Sonden zeigen, daß G119 Ähnlichkeiten zu Gen *12_{P22}* besitzt. G119 sollte demnach ebenso wie P22 unabhängig von der Helikase DnaB des Wirtes und in der Lage sein, seine eigene Helikase zu kodieren. Die gezeigten Ähnlichkeiten in Gen *12* korrelieren mit den ebenfalls nachgewiesenen Übereinstimmungen im 3'-Bereich von Gen *18*, da der C-Terminus von gp 18 unmittelbar mit gp 12 in Verbindung tritt. Untersuchungen von Schicklmaier [Schicklmaier, 1995] ergaben ein ähnliches Ergebnis für 18 von 34 untersuchten *Salmonella*-Phagen. Sowohl der 5'-Bereich von Gen *18_{ES18}* als auch das Gen *12_{P22}* dienten als Marker für das Auffinden rekombinanter Phagennachkommen bei den Superinfektionsexperimenten mit ES18. Für die Versuche mit P22 konnte nur der 5'-Bereich von Gen *18_{P22}* als Testregion verwendet werden.
- Die Funktion der Lysogene sowie ihre Regulation werden in Teil 4 dieser Arbeit ausführlich beschrieben. Für die Überprüfung der drei Lysogene *13*, *19* und *15* wurden vier Sonden verwendet, die die zu Beginn dieser Arbeit bekannten Allele der Phagen P22 (bzw. ES18) und λ repräsentierten. Von den getesteten Allelen zeigt der Phage G119 lediglich mit der Sonde des einzigen bekannten Allels des Gens *15* ein Signal. Da die Gene *13* und *19* essentiell für die Freisetzung der Phagennachkommen sind, muß davon ausgegangen werden, daß G119 für diese beiden Gene andere Allele besitzt. Die Lysisregion wurde bei den Superinfektionsversuchen mit beiden Phagen (P22 und ES18) als Kriterium zur Suche von Rekombinationsereignissen herangezogen.
- Von den nicht-essentiellen Genen der beiden Superinfektions-Exklusions-Systeme SieA und SieB des Phagen P22 besitzt G119 lediglich das spezifisch gegen heteroimmune

Phagen gerichtete *sieB*-Gen. Für die Superinfektionsexperimente mit P22 wurde deshalb lediglich die Sonde aus dem Bereich des *sieA*-Gens zur Identifizierung der rekombinanten Nachkommen verwendet. Beim Phagen ES18 deuteten die durchgeführten Hybridisierungen weder auf den Besitz eines SieA- noch eines SieB-Systems hin. Da ES18 aber den Phagen G119 infizieren kann, muß davon ausgegangen werden, daß ES18 einen anderen Mechanismus zur Umgehung des SieB-Systems von G119 besitzt. Zur Identifizierung der rekombinanten Phagen aus den Superinfektionsexperimenten mit ES18 stand deshalb die Sonde aus dem Bereich des SieB-Systems von P22 zur Verfügung.

- Ähnlichkeiten mit P22 besitzt der Phage G119 außerdem in Gen 23 (Antitermination, späte Transkriptionskontrolle), mit dem ES18 keinerlei Hybridisierungssignal liefert. Die Sonde für Gen 23_{P22} wurde deshalb nur zur Identifizierung von ES18/G119-Rekombinanten verwendet.

Zur Identifikation von Rekombinanten zwischen ES18 als überinfizierendem Phagen und G119 als Prophagen standen insgesamt neun Sonden aus sechs verschiedenen Genombereichen zur Verfügung, in denen die beiden Phagen unterschiedliche Gene bzw. Genabschnitte besitzen: S7 (Strukturgen_{P22}) und S9 (Strukturgen_{ES18}), U18 (*sieB*_{P22}), S10 (*ImmC*_{ES18}), S4 (Replikation_{ES18}) und S5 (Replikation_{P22}), Z20 (Gen 23_{P22}) sowie Z1 und Z2 (Lysogene_{P22}). Nicht alle geprüften Gene sind essentiell. Beide Phagen zeigten jedoch ein für sie charakteristisches „Hybridisierungsmuster“ mit den einzelnen Sonden (**Abb. 3.A.2.**). In den folgenden Versuchen konnte nun, an Hand von Abweichungen von diesem Muster, ein Austausch von Genomteilen zwischen den beiden Phagen nachgewiesen werden (Abschnitt **3.A.2.**).

Für die Auswahl der Hybridisierungssonden der folgenden Experimente mit P22 als superinfizierendem Phagen galten die gleichen Kriterien. Hier konnten sechs Gene bzw. Gensegmente aus insgesamt fünf Regionen identifiziert werden, in denen P22 und G119 unterschiedliche Allele besitzen. Verwendet wurden die Sonden U17 (*sieA*_{P22}), Z6 (*ImmI*_{P22}), S10 (*ImmC*_{P22}), S14 (Replikation_{P22}) sowie Z1 und Z2 (Lysogene_{P22}). **Abb. 3.A.3.** zeigt die unterschiedlichen „Hybridisierungsmuster“ der beiden Phagen G119 und P22. Abweichungen von diesen wurden in den folgenden Experimenten wiederum zum Nachweis von Rekombinationsereignissen herangezogen (Abschnitt **3.A.2.** und **3.A.2.**).

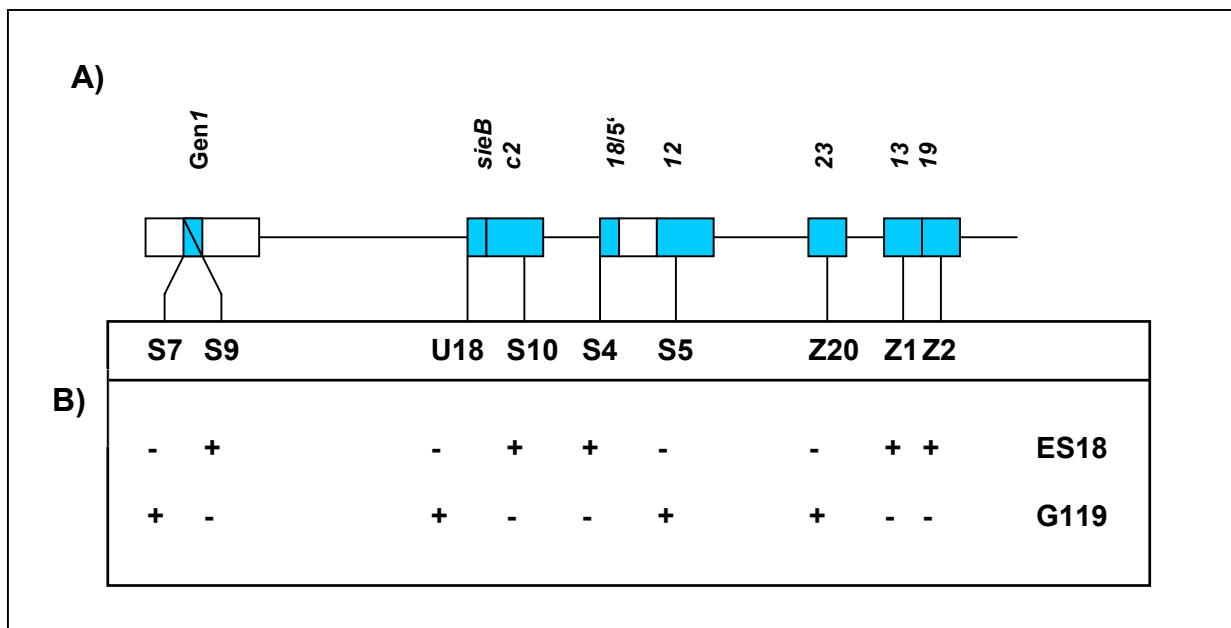


Abb. 3.A.2.: Hybridisierungssonden zur Identifizierung von Rekombinanten zwischen G119 und ES18

A) Lage der Hybridisierungssonden auf der Basis der Genkarte von P22

B) „Hybridisierungsmuster“ der Phagen G119 und ES18

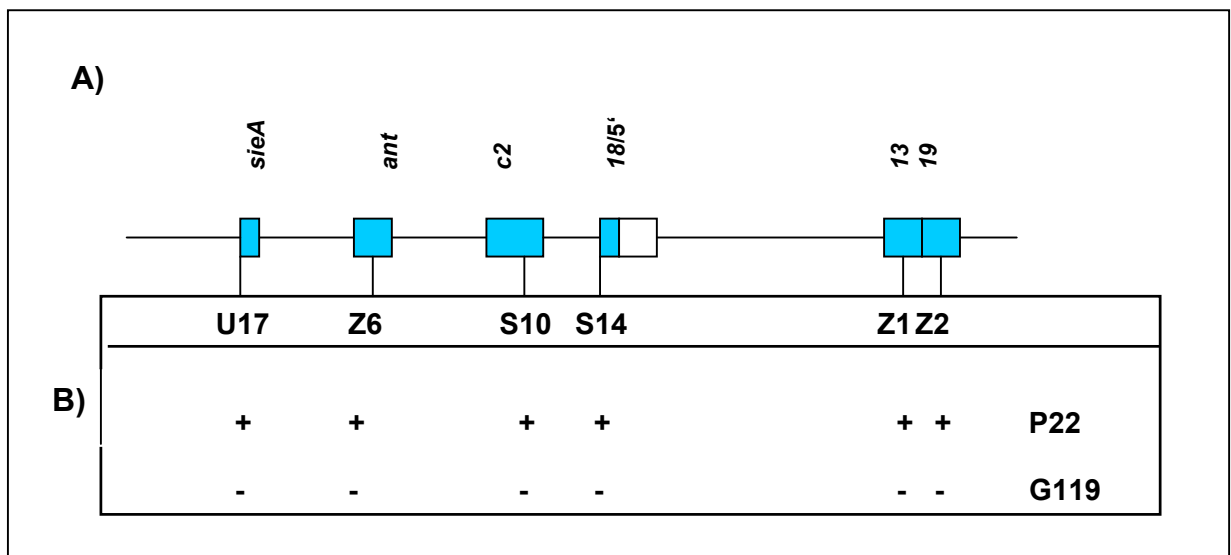


Abb. 3.A.3.: Hybridisierungssonden zur Identifizierung von Rekombinanten zwischen G119 und P22

A) Lage der Hybridisierungssonden auf der Basis der Genkarte von P22

B) „Hybridisierungsmuster“ der Phagen G119 und P22

3.A.1.2. Vermehrungsfähigkeit von ES18 und P22 auf *Salmonella typhimurium* 119

Wie häufig greift ein superinfizierender Phage durch Rekombination auf den Genpool eines bereits in der Wirtszelle etablierten Prophagen zurück? Zur Untersuchung dieser Frage wurde der Phage G119 als Prophage ausgewählt, aufgrund seiner unterschiedlichen Genomzusammensetzung im Vergleich zu den überinfizierenden Phagen P22 und ES18. Um den natürlichen Lebensbedingungen von G119 möglichst nahe zu kommen, erschien es sinnvoll, die folgenden Superinfektionsexperimente in dem natürlichen Wirt von G119, dem *Salmonella typhimurium*-Stamm Copenhagen (*Salmonella typhimurium* 119) durchzuführen.

Allerdings spielen bei der Superinfektion eines lysogenen Bakterienstammes durch einen zweiten Phagen neben den bereits untersuchten phagenbedingten Faktoren (Heteroimmunität, sie-Systeme) auch wirtsspezifische Eigenschaften eine wichtige Rolle. Ob ein Phage eine Zelle überhaupt infizieren kann, hängt von verschiedenen Faktoren ab:

- Zunächst muß der Phage einen geeigneten Rezeptor zur Adsorption finden. P22 und ES18 benutzen hierzu bestimmte Proteine der äußeren Bakterienmembran (P22: 36K-Protein / ES18: SidK-Protein). Ob diese beiden Proteine bei *Salmonella typhimurium* 119 als Rezeptoren zur Verfügung stehen, ist unbekannt.
- Man unterscheidet bei Salmonellen die sogenannten *smooth*-Stämme von den *rough*-Stämmen. Beide unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Lipopolysaccharidschicht auf der Zelloberfläche. Während *smooth*-Stämme O-spezifische Polysaccharidketten besitzen, fehlen diese bei *rough*-Stämmen teilweise oder sogar ganz [Schlegel, 1992]. ES18 ist in der Lage, beide Stämme als Wirte zu benutzen, P22 hingegen kann sich nur auf *smooth*-Stämmen vermehren. Über die Beschaffenheit der Zelloberfläche von *Salmonella typhimurium* 119 existieren keine Daten.
- Zur Abwehr von Phagen besitzen Bakterien Restriktions-/Modifikationssysteme, die in der Regel aus zwei bis drei Komponenten bestehen und dazu dienen, eigene DNA von Fremd-DNA zu unterscheiden. Während die zelleigene DNA durch Modifikation vor dem Angriff durch Endonukleasen geschützt ist, kann fremde DNA (z. B. ein Phagenom), die in der Natur meistens nicht in der notwendigen Art und Weise modifiziert ist, gespalten und somit inaktiviert werden.

Vor der eigentlichen Durchführung der Superinfektionsexperimente in dem natürlichen Wirtstamm von G119 mußte also zunächst geprüft werden, ob die beiden Phagen ES18 und P22 überhaupt in der Lage waren, den *Salmonella typhimurium*-Stamm 119 zu infizieren und sich erfolgreich in ihm zu vermehren.

Bei Titerbestimmungen von ES18- und P22-Lysaten auf *S.t.* 119 zeigte ES18 ein normales Wachstum, P22 hingegen war nicht in der Lage, Plaques auf *S.t.* 119 auszubilden. Die Ergebnisse der Untersuchung der Genomstruktur von G119 in dieser Arbeit sowie vorangegangene biologische Tests von Schicklmaier [*Schicklmaier, persönliche Mitteilung*] beweisen, daß die beiden zueinander homoimmunen Phagen P22 und ES18 gleichzeitig heteroimmun zu G119 sind. Aus diesem Grund muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei der Ursache für obiges Ergebnis nicht um prophagenbedingte Faktoren, sondern um wirtsbedingte Eigenschaften handelt. Für die Versuche mit G119 und P22 mußte deshalb ein anderes Bakterium gefunden werden.

3.A.1.3. Lysogenisierung von DB21 mit G119

Da eine Infektion des natürlichen Wirts von G119, *Salmonella typhimurium* 119, durch P22 nicht möglich war, mußte für die folgenden Experimente zum Austausch von funktionellen Modulen zwischen G119 und P22 ein anderes Bakterium gefunden werden. Dieses sollte folgende Kriterien erfüllen: Zum einen mußte eine Etablierung von G119 als Prophage möglich sein und zum anderen eine Infektion durch P22 sowie dessen erfolgreiche Vermehrung. Eine Analyse des Wirtsbereichs von G119 auf Standardindikatoren zeigte, daß G119 sich gut auf DB21, einem prototrophen Wildtypstamm von *S.t.* LT2, vermehren ließ, der gleichzeitig auch einen geeigneten Wirtstamm für P22 darstellte.

Die Lysogenisierung von DB21 mit G119 erfolgte wie unter **2.11.7.** beschrieben. Vereinbarungsgemäß wird im Folgenden der G119-lysogene DB21 als DB21(G119) bezeichnet.

3.A.1.4. Isolierung der Klarplaquemutante PGV1

In **3.A.3.** sollten die Unterschiede bei der Entstehung rekombinanter Phagennachkommen bei der Superinfektion einer lysogenen G119-Zelle durch die temperenten Wildtypen P22-H1 und ES18 und ihre entsprechenden Klarplaquemutanten untersucht werden.

Von P22 existierte bereits die Klarplaquemutante P22-H5, die eine Deletion im *c2*-Gen besitzt [*Schmieger, persönliche Mitteilung*]. Von ES18 wurde die spontane Klarplaquemutante

PGV1 isoliert, das *c2*-Gen von PGV1 wurde sequenziert und mit der bekannten Sequenz von ES18 verglichen (**Abb. 3.A.4.**). Durch eine Transition in Position 127 (5'-Bereich) fand bei PGV1 eine AS-Substitution von Threonin zu Alanin statt. In diesem Bereich befindet sich die α -Helix 3, die eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Operatorsequenz übernimmt [*Hochschild et al., 1983; Sauer et al., 1982*]. Eine zweite Basensubstitution (in diesem Fall eine Transversion) in Position 510 (3'-Bereich) hatte eine Aminosäure-Substitution von Glutaminsäure zu Asparagin zur Folge. Hier liegt eine konservierte Region, die für die kooperative DNA-Bindung der Dimere eine wichtige Rolle spielt [*Valenzuela und Ptashne, 1989*]. Eine dieser beiden Mutationen oder ihre Addition führte offenbar zum *c2*-Phänotyp von PGV1.

A)								
1	ATGAATACAC	AATTGATGGG	TGAGCGTATT	CGCGCTCGAA	GAAAAAACT	CAAGATTAGA	60	ES18
1	ATGAATACAC	AATTGATGGG	TGAGCGTATT	CGCGCTCGAA	GAAAAAACT	CAAGATTAGA	60	PGV1
61	CAAGCCGCTC	TTGGTAAGAT	GTTGGGAGTG	TCTAATGTTG	CAATATCGCA	ATGGGAGCGC	120	ES18
61	CAAGCCGCTC	TTGGTAAGAT	GTTGGGAGTG	TCTAATGTTG	CAATATCGCA	ATGGGAGCGC	120	PGV1
121	TCGGAGACTG	AGCCAAATGG	GGAGAACCTG	TTGGCACTTT	CGAAGGCTCT	TCAGTGCTCC	180	ES18
121	TCGGAGACTG	AGCCAAATGG	GGAGAACCTG	TTGGCACTTT	CGAAGGCTCT	TCAGTGCTCC	180	PGV1
181	CCTGACTATT	TGCTGAAAGG	AGATTTAAGC	CAGACAAACG	TGTCCTATCA	TAGTAGGCAT	240	ES18
181	CCTGACTATT	TGCTGAAAGG	AGATTTAAGC	CAGACAAACG	TGTCCTATCA	TAGTAGGCAT	240	PGV1
241	GAGCCAAGAG	GATCATAACC	TCTTATCAGT	TGGGTAAGCG	CAGGGCAATG	GATGGAAGCT	300	ES18
241	GAGCCAAGAG	GATCATAACC	TCTTATCAGT	TGGGTAAGCG	CAGGGCAATG	GATGGAAGCT	300	PGV1
301	GTAGAACCTT	ATCACAAGCG	CGCGATAGAG	AACTGGCAGC	ACACCACTGT	AGATTGTTCA	360	ES18
301	GTAGAACCTT	ATCACAAGCG	CGCGATAGAG	AACTGGCAGC	ACACCACTGT	AGATTGTTCA	360	PGV1
361	GAAGATTCAT	TTTGGCTTGA	TGTCCAAGGT	GACTCTATGA	CAGCACCGGC	AGGGTTAAGC	420	ES18
361	GAAGATTCAT	TTTGGCTTGA	TGTCCAAGGT	GACTCTATGA	CAGCACCGGC	AGGGTTAAGC	420	PGV1
421	ATTCCAGAAG	GAATGATAAT	TCTGGTTGAT	CCCGAAGTCG	AACCAAGAAA	CGGCAAGCTG	480	ES18
421	ATTCCAGAAG	GAATGATAAT	TCTGGTTGAT	CCCGAAGTCG	AACCAAGAAA	CGGCAAGCTG	480	PGV1
481	GTTGTTGCAA	AATTAGAAGG	TGAAAACGAG	GCCACATTCA	AAAAATTAGT	TATGGATGCA	540	ES18
481	GTTGTTGCAA	AATTAGAAGG	TGAAAACGAT	GCCACATTCA	AAAAATTAGT	TATGGATGCA	540	PGV1
541	GGCCGAAAGT	TTTTAAAACC	ATTAAACCCA	CAATATCCGA	TGATAGAAAT	CAACGGAAAC	600	ES18
541	GGCCGAAAGT	TTTTAAAACC	ATTAAACCCA	CAATATCCGA	TGATAGAAAT	CAACGGAAAC	600	PGV1
601	TGCAAAATCA	TTGGCGTAGT	TGTTGACGCA	AAACTCGCAA	ATCTTCCATA	A	651	ES18
601	TGCAAAATCA	TTGGCGTAGT	TGTTGACGCA	AAACTCGCAA	ATCTTCCATA	A	651	PGV1

B)								
1	MNTQLMGERI	RARRKKLKIR	QAALGKMVGV	SNVAISQWER	SETEPNGENL	LALSKALQCS	60	ES18
1	MNTQLMGERI	RARRKKLKIR	QAALGKMVGV	SNVAISQWER	SETEPNGENL	LALSKALQCS	60	PGV1
61	PDYLLKGDLS	QTNVAYHSRH	EPRGSYPLIS	WVSAGQWMEA	VEPYHKRAIE	NWHDTTVDCS	120	ES18
61	PDYLLKGDLS	QTNVAYHSRH	EPRGSYPLIS	WVSAGQWMEA	VEPYHKRAIE	NWHDTTVDCS	120	PGV1
121	EDSFWLDVQG	DSMTAPAGLS	IPEGMIILVD	PEVEPRNGKL	VVAKLEGENE	ATFKKLVMDA	180	ES18
121	EDSFWLDVQG	DSMTAPAGLS	IPEGMIILVD	PEVEPRNGKL	VVAKLEGEND	ATFKKLVMDA	180	PGV1
181	GRKFLKPLNP	QYPMIEINGN	CKIIGVVVDA	KLANLP.	217			ES18
181	GRKFLKPLNP	QYPMIEINGN	CKIIGVVVDA	KLANLP.	217			PGV1

Abb. 3.A.4.: Sequenzanalyse des c2-Gens von ES18 und PGV1

A) DNA-Sequenzvergleich

B) AS-Sequenzvergleich

α-Helix 2

α-Helix 3

* Basensubstitution

3.A.2. Untersuchungen zur Rolle des Antirepressors bei der Superinfektion einer lysogenen Wirtszelle

Alle nachfolgenden Versuche zur Identifizierung und Charakterisierung von Rekombinanten des Prophagen G119 und dem jeweiligen überinfizierenden Phagen in 3.A.2. und 3.A.3. wurden nach dem in Abb. 3.A.5. dargestellten Schema durchgeführt.

3.A.2.1. Rekombinantenhäufigkeit bei Superinfektion von *Salmonella typhimurium* 119(G119) mit ES18 (MOI = 0,01 / 0,5)

Die Superinfektionsexperimente mit dem Wildtyp-Phagen ES18 als überinfizierendem Phagen wurden in dem natürlichen Wirtstamm von G119, *Salmonella typhimurium* 119, durchgeführt, da ES18 (im Gegensatz zu P22) dazu in der Lage ist, diesen Stamm zu infizieren und sich in ihm zu vermehren.

Die Superinfektion des lysogenen S.t.-Stammes 119 mit ES18 erfolgte in zwei Ansätzen nach dem in Abb. 3.A.5. dargestellten Schema durch Infektion einer Flüssigkultur von S.t. 119 mit den Infektionsmultiplizitäten (MOI) 0,01 bzw. 0,5. Durch diese bewusst niedrig gewählten MOIs wurde gewährleistet, daß im ersten Infektionszyklus jeweils nur ein geringer Teil der lysogenen Bakterienzellen infiziert wurde und die entstandenen rekombinanten Phagennachkommen an den weiteren Infektionszyklen der noch nicht-infizierten Wirtszellen teil-

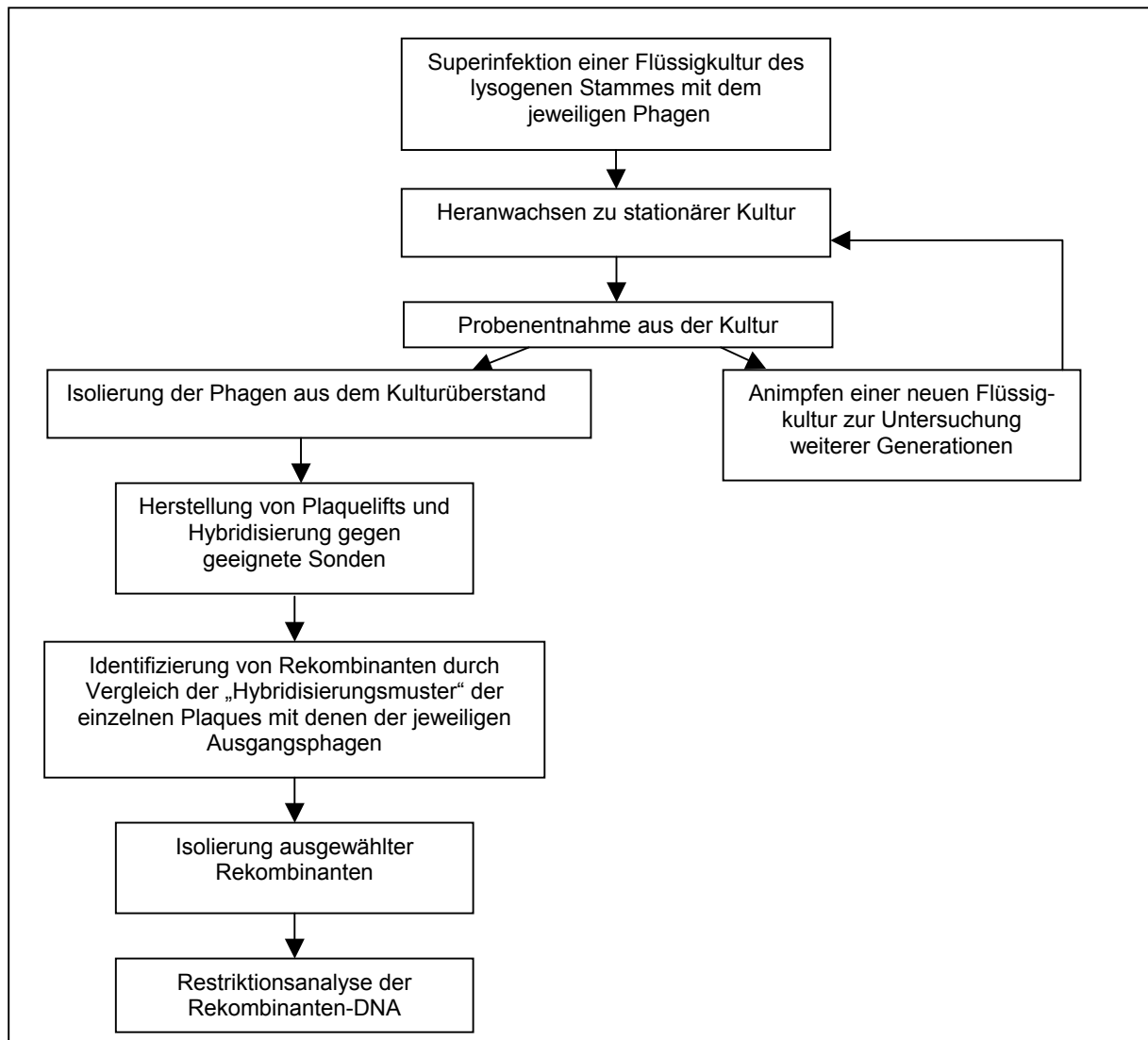


Abb. 3.A.5.: **Versuchsablauf für die Experimente in 3.A.2. und 3.A.3.**
Der detaillierte Ablauf der einzelnen Unterpunkte ist in Teil 2 dargestellt.

nehmen konnten. Nach Heranwachsen der Bakterien über einen Zeitraum von 24 h wurden die bis dahin entstandenen Nachkommen der Phagen in der Kultur analysiert. Die im Folgenden für die, in einem Zeitraum von 24 h in der Bakterienkultur freigesetzten, Phagen verwendete Bezeichnung **GZ24** bezieht sich ausschließlich auf die Dauer der Kulturinkubation und gibt keinerlei Auskunft über die tatsächliche Anzahl der in dieser Zeit entstandenen Phagengenerationen. Die Vermehrungsrunden der Kulturfolgen GZ36 bis GZ144 wurden jeweils durch Ansetzen einer weiteren Flüssigkultur aus der letzten Übernachtkultur gewonnen. Auf diese Art verblieben die Rekombinanten der vorhergehenden Generationen im Reaktionsan-

satz und konnten so ebenfalls am Infektionsprozeß und an der Neukombination von Modulen durch Rekombination mit G119 teilnehmen.

Die Suche nach Rekombinanten erfolgte an Hand von Plaquelifts und anschließender Hybridisierung gegen die in **3.A.1.1.** beschriebenen Sonden. Ein Austausch von Genomteilen zwischen den beiden Phagen G119 und ES18 konnte durch Abweichungen der „Hybridisierungsmuster“ der einzelnen Plaques von den charakteristischen Mustern der beiden Ausgangsphasen G119 und ES18 (siehe **Abb. 3.A.2.**) nachgewiesen werden.

Tab.3.A.2. bietet einen Überblick über die Anzahl der untersuchten Phagen / Kulturfolge / MOI sowie die Häufigkeit der Rekombinanten.

Bei der Superinfektion des G119-lysogenen *S.t.*-Stammes 119 konnten nur in seltenen Fällen rekombinante Phagennachkommen isoliert werden. Hierfür könnte die Immunitätssituation des Phagen ES18 verantwortlich sein. Durch das Fehlen eines Antirepressors kommt es bei der Superinfektion einer lysogenen Zelle nicht zur Induktion des Prophagen und die

Kulturfolge	MOI 0,01			MOI 0,5		
	Anzahl untersuchter Phagen	Anzahl Rekombinanten	Rekombinantenhäufigkeit	Anzahl untersuchter Phagen	Anzahl Rekombinanten	Rekombinantenhäufigkeit
GZ24	600	4	1:150	600	1	1:600
GZ48	300	2	1:150	900	0	< 1:900
GZ72	300	0	< 1:300	600	0	< 1:600
GZ96	600	1	1:600	600	2	1:300
GZ120	300	0	< 1:300	300	0	< 1:300
GZ144	300	0	< 1:300	300	3	1:100

Tab.3.A.2.: Häufigkeit der Rekombinanten bei Superinfektion von *S.t.*119(G119) mit ES18

Wahrscheinlichkeit für Rekombinationsereignisse ist eher gering. Wenn dies der Grund ist, sollte in den folgenden Superinfektionsexperimenten mit P22 als überinfizierendem Phagen eine deutlich höhere Anzahl an rekombinanten Phagennachkommen zu finden sein. Andererseits ist es aber auch denkbar, daß die beiden Phagen ES18 und G119 bereits optimal an ihre Umgebung angepaßt sind und eine Veränderung ihres Genoms durch den Austausch von Modulen sich nachteilig auswirkt. In diesem Fall würde eine Selektion zugunsten der Genome von ES18 und G119 stattfinden und Rekombinanten hätten nur geringe Überlebenschancen. Hierfür würde auch sprechen, daß im Verlauf der Kulturfolgen die Anzahl der Rekombinanten nicht stetig zunimmt.

Die Analyse der durch Superinfektion von *S.t.*(G119) mit ES18 entstandenen Rekombinanten zeigte den Austausch unterschiedlicher Module. Aufgrund der niedrigen Gesamtzahl an Rekombinanten ließen sich jedoch keine Präferenzen einzelner Modulkombinationen erkennen. Da, wie oben geschildert, bei den folgenden Experimenten mit P22 als überinfizierendem Phagen von einer größeren Rekombinantenanzahl auszugehen war, wurde auf eine detaillierte Darstellung der Modulzusammensetzung der ES18/G119-Rekombinanten sowie eine genauere Untersuchung mittels Restriktionsanalyse verzichtet.

3.A.2.2. Rekombinantenhäufigkeit bei Superinfektion von DB21(G119) mit P22-H1 (MOI = 0,01 / 0,5)

Im Gegensatz zu ES18 ist P22 nicht in der Lage, den natürlichen Wirtsstamm von G119, *Salmonella typhimurium* 119, zu infizieren und sich in ihm zu vermehren. Aus diesem Grund wurden die Superinfektionsexperimente mit P22 in dem *S.t.*-Stamm DB21 durchgeführt, der zu diesem Zweck zuvor mit G119 lysogenisiert wurde (vgl. Abschnitt 3.A.1.3.).

Die Superinfektion von DB21(G119) mit dem P22-Wildtyp (P22-H1) wurde ebenfalls mit zwei verschiedenen MOIs von 0,01 und 0,5 durchgeführt. Insgesamt wurden 5 Generationen auf Rekombinanten untersucht.

Tab.3.A.3. faßt die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen.

Kulturfolge	MOI 0,01			MOI 0,5		
	Anzahl untersuchter Phagen	Anzahl Rekombinanten	Rekombinantenhäufigkeit	Anzahl untersuchter Phagen	Anzahl Rekombinanten	Rekombinantenhäufigkeit
GZ24	427	4	1:107	353	16	1:22
GZ48	212	3	1:71	185	17	1:11
GZ72	181	0	< 1:181	128	4	1:32
GZ96	436	5	1:87	447	11	1:41
GZ120	116	0	< 1:116	379	3	1:126

Tab.3.A.3.: Häufigkeit und Verteilung der Rekombinanten bei Superinfektion von DB21(G119) mit P22-H1

Wie erwartet führte die Infektion des G119-lysogenen DB21 durch P22-H1 insgesamt wesentlich häufiger zu Rekombinationsereignissen mit dem Prophagen G119 als die Infektion mit ES18. Dies deutet auf die wichtige Rolle des Antirepressors bei der Superinfektion einer lysogenen Zelle hin. Die in Abschnitt 3.A.2.2. vermuteten Selektionsmechanismen zugunsten der bereits etablierten Ausgangsphagen P22 und G119 scheinen auch in diesem Fall von

Bedeutung zu sein. Auch bei der Superinfektion des G119-lysogenen Wirtes DB21 mit P22 entstehen größtenteils wieder die Phagen P22 und G119. Eine Erhöhung der Rekombinantenfrequenz durch die Teilnahme der Rekombinanten der vorigen Kulturfolgen am Infektionszyklus konnte hier ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Rekombinantenfrequenz nahm im Gegenteil dazu sogar ab.

3.A.2.3. Genomstruktur der G119/P22-H1-Rekombinanten (MOI = 0,01 / 0,5)

Die durch Superinfektion von DB21(G119) mit P22-H1 neu entstandenen Phagen zeigen einen mosaikartigen Aufbau aus den Modulen der beiden Ausgangsphagen (**Abb. 3.A.6.**). Da alle untersuchten Rekombinanten von den beiden Phagen G119 und P22-H1 abstammten, wird im Folgenden nicht zwischen ihrer Herkunft aus den unterschiedlichen Ansätzen bei einer MOI von 0,01 und 0,5 unterschieden. Aufgrund der Hybridisierungsergebnisse konnten sieben verschiedenartig zusammengesetzte Modulkombinationen HM1 – HM7 bei 63 rekombinanten Phagen nachgewiesen werden.

Welche Prozesse im Einzelnen zur Entstehung der verschiedenen Modulkombinationen geführt haben, ist unbekannt. Dies soll an Hand eines Beispiels verdeutlicht werden: Die meisten Phagen (84%) gehören zur Gruppe HM1, diese Phagen besitzen die Lysisgene von G119 und die übrigen Module von P22. Die Frage, ob es sich bei einem bestimmten Vertreter dieser Gruppe ursprünglich um P22 handelte, der durch ein oder mehrere Austauschereignisse die Lysisgene von G119 übernommen hat oder umgekehrt um G119, der durch einen oder mehrere Rekombinationsvorgänge die linke Genomhälfte von P22 erworben hat, kann nicht beantwortet werden. Auch kann keine Aussage darüber gemacht werden, wieviele Rekombinationsereignisse in den einzelnen Vertretern einer Gruppe tatsächlich stattgefunden haben und dann schließlich zur Entstehung der einzelnen Modulkombinationen geführt haben. Die im Anschluß an die Superinfektionen ermittelten Genomzusammensetzungen dürfen immer nur als Endergebnisse komplexer Vorgänge betrachtet werden, die keinerlei Auskunft über die Abstammung oder Entstehungsprozesse der einzelnen Phagen geben.

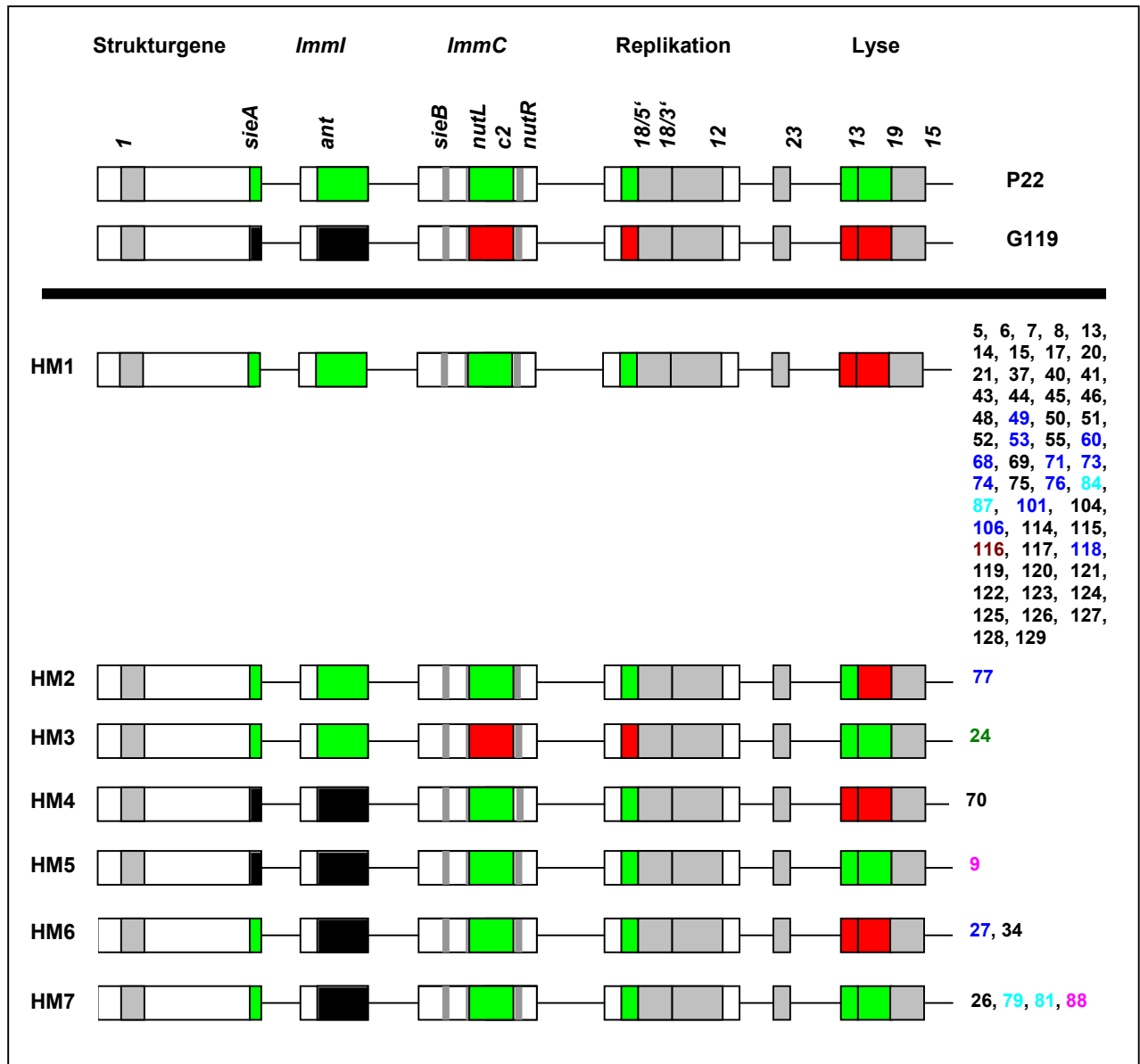


Abb. 3.A.6.: Genomzusammensetzung der G119/P22-H1-Rekombinanten, MOI 0,01 / 0,5

Gezeigt ist der Genomaufbau der untersuchten Phagenrekombinanten aus der Superinfektion von DB21(G119) mit P22-H1 (MOI 0,01 / 0,5), wie er sich aufgrund der Hybridisierungen darstellt. Im oberen Teil ist die Genomzusammensetzung der beiden Ausgangsphagen G119 und P22 gezeigt. Alle Bereiche, in denen die Phagen die gleichen modularen Allele besitzen, sind grau unterlegt. Essentielle Gene, in denen sich die beiden Phagen voneinander unterscheiden, sind durch die Farben rot (G119) und grün (P22-H1) gekennzeichnet. Dabei muß beachtet werden, daß keine näheren Sequenzinformationen über die Bereiche von G119 bestehen, die nicht mit dem Genom von P22 identisch sind. Im unteren Teil sind die verschiedenen Modulkombinationen HM1 – HM7 dargestellt. Rekombinanten mit gleichen Restriktionsmustern sind farbig gekennzeichnet: RM1; RM2; RM3; RM4; RM5; RM6

Die verwendeten Sonden deckten allerdings nur einen geringen Teil der Genome ab. Deshalb war es fraglich, ob die zahlreichen Vertreter der Gruppe HM1 tatsächlich alle völlig identische Genomstrukturen besaßen oder ob noch weitere Abschnitte der Genome ausgetauscht wurden, die durch die Hybridisierungsexperimente nicht nachweisbar waren. Ein Vergleich der *EcoRI*-Restriktionsmuster der isolierten Phagen sollte darüber Auskunft geben, inwieweit die einzelnen Hybridisierungsmuster mit bestimmten Restriktionsmustern übereinstimmen. Falls innerhalb der einzelnen Hybridisierungsgruppen unterschiedliche Restriktionsmuster existieren, deutet dies entweder auf zusätzliche Modulkombinationen oder unterschiedliche Rekombinationspunkte hin.

Zunächst wurde eine Größenbestimmung des Genoms von G119 an Hand von Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI*, *Clal* und *HindIII* durchgeführt (**Abb. 3.A.7.**). Durch Addition der einzelnen dabei entstandenen Banden konnte die Genomgröße des Phagen ca. auf 39.700 bp - 40.500 bp bestimmt werden. Damit ist der Phage G119 hinsichtlich seiner Genomgröße durchaus mit dem Phagen P22 (41.725 bp) vergleichbar.

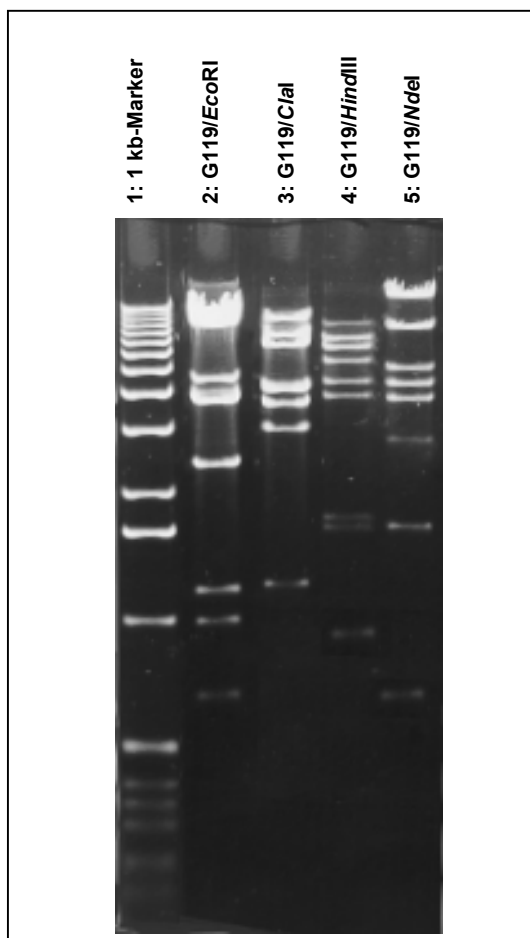


Abb. 3.A.7.: Genomgrößenbestimmung von G119
Fragmentgrößen in bp: (2-5 geschätzt durch
Größenvergleich der Banden mit denen des 1 kb-
Markers

1:	2:	3:	4:
12.216	9.000/9.000	11.000	9.000*
11.198	8.900	8.000	8.000
10.180	4.500	7.000	7.000/7.000
9.162	4.000*	4.300/4.300	5.700
8.144	3.800	3.800	4.600
7.126	2.400	3.100*	3.900
6.108	1.200	1.300	1.700
5.090	1.000	<u>Σ 42.800</u>	1.600
4.072	<u>700</u>	- 3.100	<u>900</u>
3.054	<u>Σ 44.500</u>	<u>Σ 39.700</u>	<u>Σ 49.000</u>
2.036	- 4.000		- 9.000
1.636	<u>Σ 40.500</u>		<u>Σ 40.400</u>
1.018			
517/506		5:	
396		15.500	
344		9.000	
298		5.100	
		4.500	
		3.900	
		2.800*	
		1.600	
		<u>700</u>	
		<u>Σ 43.100</u>	
		- 2.800	
		<u>Σ 40.300</u>	

* bezeichnet die unterrepräsentierte Bande, die durch den Verpackungsmechanismus entsteht.

Die *EcoRI*-Restriktionsanalysen der G119/P22-Rekombinanten ergaben insgesamt sechs verschiedene Muster (RM1 – RM6) (**Abb. 3.A.8.**), die in den meisten Fällen nicht spezifisch für ein bestimmtes Hybridisierungsmuster sind (**Tab.3.A.4.**). Allein in der Hybridisierungsgruppe HM1 existieren vier verschiedene Restriktionsmuster, davon finden sich drei auch in anderen HM-Gruppen wieder. Lediglich der einzige Vertreter der HM-Gruppe 3 besitzt ein Bandenmuster, das in anderen HM-Gruppen nicht vorkommt.

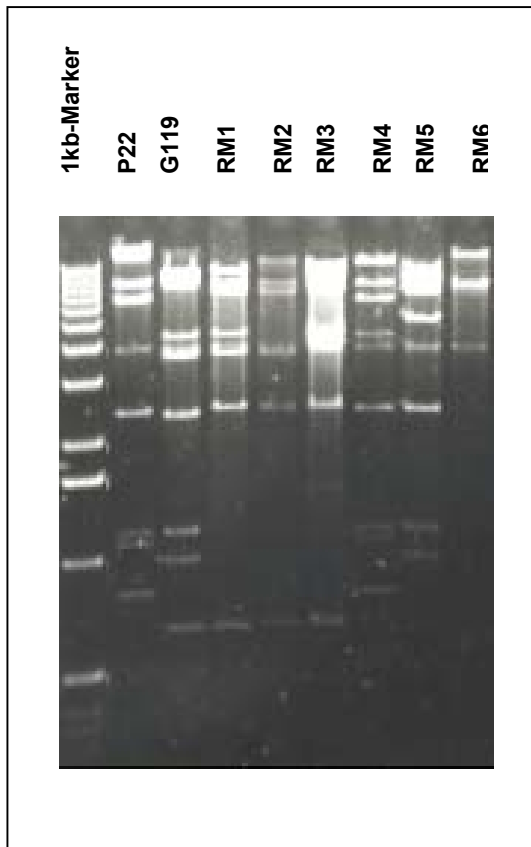
	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RM6
HM1	+	+	+	+	-	-
HM2	-	+	-	-	-	-
HM3	-	-	-	-	+	-
HM4	+	-	-	-	-	-
HM5	-	-	-	-	-	+
HM6	+	+	-	-	-	-
HM7	+	-	+	-	-	+

Tab.3.A.4.: Verteilung der *EcoRI*-Restriktionsmuster RM1 – RM6 in den Hybridisierungsgruppen HM1 – HM7 der G119/P22-Rekombinanten

Aus der Verteilung der Restriktionsmuster in den einzelnen HM-Gruppen läßt sich schließen, daß die Rekombinationsereignisse bei den Phagen der einzelnen RM-Gruppen nicht an identischen Stellen im Genom stattgefunden haben. Da die *EcoRI*-Restriktionskarte von P22 bekannt ist, kann der Bereich, in dem die Rekombinationsereignisse stattgefunden haben, die in den einzelnen Phagen zu der entsprechenden Modulkombination geführt haben, ungefähr vorausgesagt werden. Dies soll an Hand eines Beispiels verdeutlicht werden:

In der HM-Gruppe 1 sind insgesamt 4 verschiedene Restriktionsmuster vertreten: RM1, RM2, RM3 und RM4 (**Tab.3.A.4.**). Die Größe der einzelnen Fragmente in den RM-Gruppen 1, 2, 3 und 4 sowie ihre vermeintliche Abstammung von P22 bzw. G119 ist in **Tab. 3.A.5.** dargestellt. In **Abb.3.A.9.** ist die an Hand der einzelnen Fragmente ermittelte Genomzusammensetzung sowie die Lage der vermutlichen Rekombinationsbereiche dargestellt.

Durch Vergleich der Restriktionsmuster der Vertreter der RM-Gruppen mit den Mustern der beiden Referenzphagen P22 und G119 können diejenigen Fragmente identifiziert werden, die auf der gleichen Höhe laufen (**Abb.3.A.8.** und **Tab.3.A.5.**). Die Abstammung dieser Fragmente in den Nachkommenphagen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den jeweiligen Elternphagen zurückgeführt werden. Da die Anordnung der einzelnen Gene im Genom der lambdoiden Phagen konserviert ist, können die Positionen der Fragmente im Genom der



**Abb. 3.A.8.: EcoRI-Restriktionsanalyse der G119/
P22-Rekombinanten**

Fragmentgrößen in bp: siehe **Tab. 3.A.5.**

RM1: Rekombinanten 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 17, 20, 21, 26, 34, 37, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 48, 50, 51, 52, 55, 69, 70, 75, 104, 114, 115, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129

RM2: Rekombinanten 27, 49, 53, 60, 68, 71, 73, 74, 76, 77, 101, 106, 118

RM3: Rekombinanten 79, 81, 84, 87

RM4: Rekombinante 116

RM5: Rekombinante 24

RM6: Rekombinanten 9, 88

Restriktionsfragment	P22	G119	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RM6
A	19510	9000	12000	16500	12000	14000	12000	19500
B	9278	9000	9000	9000	9000	9000	9000	9000
C	7322	8900	8000	8000	8000	7322	8000	9000
D	4077	4500	4500	4000	4500	4500	6000	4000
E	2490	4000	4000	3800	4000	4077	4000	
F	1181	3800	3800	2490	4000	2490	2490	
G	1114	2400	2490	700	2490	1181	1200	
H	830	1200	700	-	700	1114	1000	
I	-	1000	-	-	-	830	-	
J	-	700	-	-	-	-	-	
Gesamt-Genomgröße	45802 <u>-4077</u> 41725	44500 <u>-4000</u> 40500	44490 <u>-4000</u> 40490	44490 <u>-4000</u> 40490	44690 <u>-4000</u> 40690	44514 <u>-4077</u> 40437	43690 <u>-4000</u> 39690	41500 <u>-4000</u> 37500*

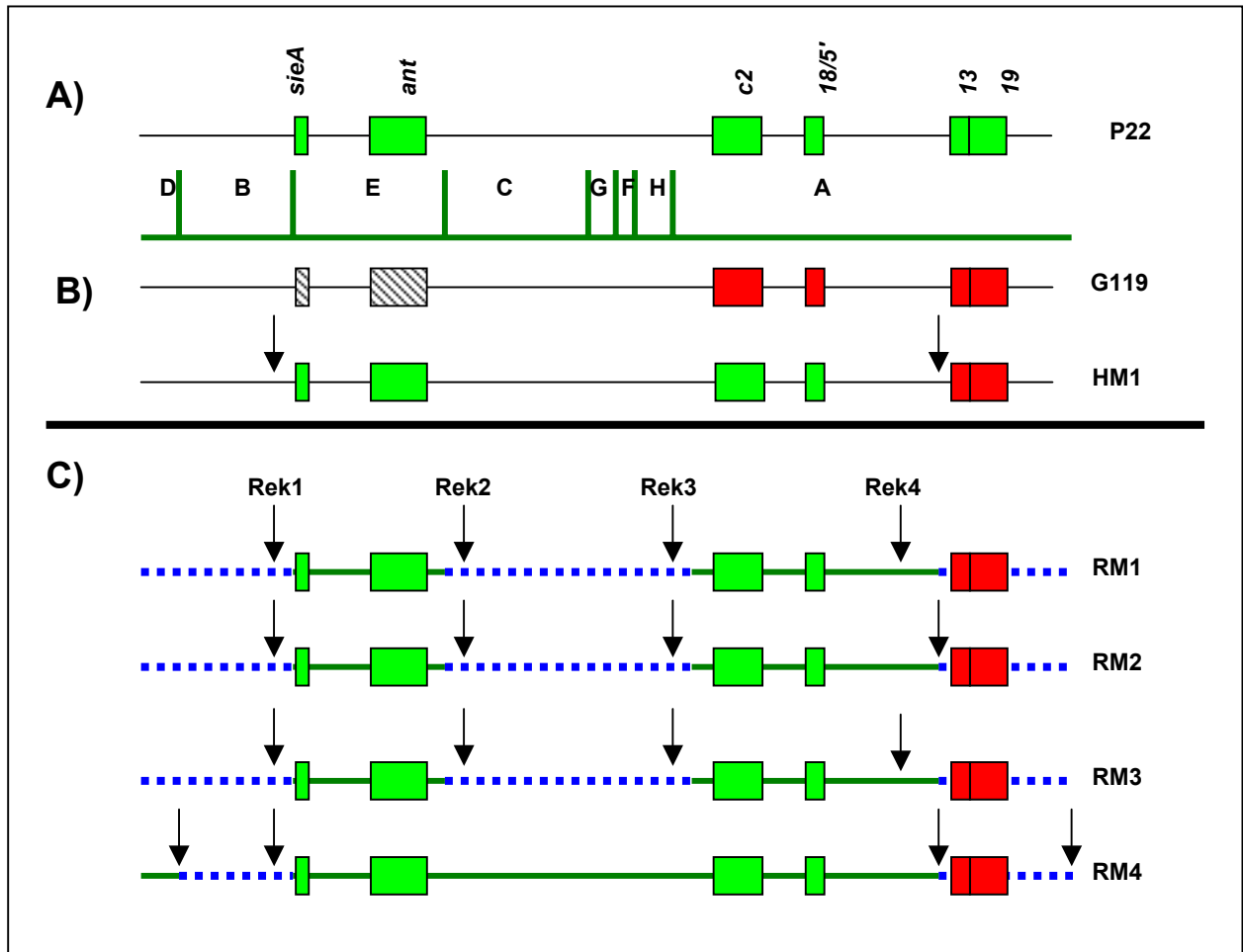
Tab. 3.A.5:

Größe der Restriktionsfragmente der RM-Gruppen 1, 3 und 6

Darstellt ist jeweils die Größe der einzelnen EcoRI-Restriktionsfragmente in bp. Die vermeintliche Abstammung der Fragmente von P22 bzw. G119 ist farbig gekennzeichnet und lediglich von dem Laufverhalten der Fragmente in der Gelelektrophorese im Vergleich zu dem der entsprechenden Fragmenten der beiden Referenzphagen abgeleitet. * Zur genauen Genomgrößenbestimmung müssten weitere Restriktionen mit anderen Enzymen stattfinden.

Nachkommenphagen durch Vergleich mit der *EcoRI*-Restriktionskarte von P22 ungefähr bestimmt werden. So ist z. B. bekannt, daß das *EcoRI*-E-Fragment von P22 den Antirepressor und den größten Teil des SieA-Systems enthält, das B-Fragment nur einen kleinen Teil des sieA-Systems und das A-Fragment die Gene der *ImmC*-Region, die Replikations- und die Lysogene (**Abb. 3.A.9.**). In der RM-Gruppe 1 kann das E-Fragment von P22 identifiziert werden, dies stimmt mit den Hybridisierungsdaten überein: Sowohl mit der Antirepressorsonde als auch mit der SieA-Sonde konnte ein Signal nachgewiesen werden. Die 5'-wärts angrenzenden Fragmente B und D jedoch sind in den Phagen der RM-Gruppe 1 nicht vorhanden. Also kann davon ausgegangen werden, daß in diesem Bereich mindestens ein Rekombinationsereignis (= **Rek1** in **Abb. 3.A.9.**) stattgefunden hat. Auch die 3'-wärts von Fragment E gelegenen Fragmente C, G, F und H können im *EcoRI*-Muster der RM1-Gruppe nicht nachgewiesen werden, so daß hier ebenfalls mindestens ein Rekombinationsereignis (= **Rek2** in **Abb. 3.A.9.**) stattgefunden haben muß. Das A-Fragment ist mit 19.510 bp das größte Fragment von P22. Dieses Fragment existiert in den Phagen der RM-Gruppe 1 nicht mehr in vollem Umfang, hier kann ein Fragment von ca. 12.000 bp gezeigt werden. Da der Phage G119 kein Fragment über 9000 bp besitzt, wird die Abstammung des 12.000 bp-Fragments auf das A-Fragment von P22 zurückgeführt. Die Hybridisierungsanalysen zeigen, daß die Phagen der HM-Gruppe 1 sowohl das *c2*-Gen als auch den 5'-Bereich des Gens *18* von P22 besitzen, die beide auf dem A-Fragment liegen. Dies deutet auf ein weiteres Rekombinationsereignis im 5'-Bereich des A-Fragments oder im benachbarten H-Fragment von P22 hin (= **Rek 3** in **Abb. 3.A.9.**). Die ebenfalls auf dem A-Fragment lokalisierten Lysogene *13* und *19* stammen jedoch vom Phagen G119. Also ist anzunehmen, daß der linke Teil des A-Fragmentes mit den Genen *c2* und *18* in den Phagen der RM-Gruppe 1 erhalten blieb, während der rechte Teil des Fragments durch ein weiteres Rekombinationsereignis stromaufwärts durch ein Fragment mit den Lysogenen von G119 ersetzt wurde (= **Rek 4** in **Abb. 3.A.9.**).

Auf diese Art lassen sich auch in den RM-Gruppen 2, 3 und 4 die möglichen Rekombinationsstellen ermitteln. Natürlich erlaubt diese Methode keine Aussage über die genauen Positionen, an denen die Rekombinationen tatsächlich stattgefunden haben, es können immer nur Bereiche angegeben werden, in denen ein Rekombinationsereignis stattgefunden haben muß. Auch die tatsächliche Anzahl von Rekombinationsereignissen kann auf diese Art nicht ermittelt werden. Durch diese Analysen kann jedoch gezeigt werden, daß die Anzahl der tatsächlich stattgefundenen Rekombinationsereignisse größer ist als alleine aufgrund der Hybridisierungsanalysen nachgewiesen werden kann (**Abb. 3.A.9.**).

**Abb. 3.A.9.:****Analyse der Genomzusammensetzung und möglichen Rekombinationspunkte in den RM-Gruppen 1, 2, 3 und 4 aus HM-Gruppe 1**

- A) Modulzusammensetzung des Phagen P22 sowie Lage der *EcoRI*-Fragmente im Genom
- B) Modulzusammensetzung des Phagen G119 sowie der HM-Gruppe 1 anhand der Hybridisierungsergebnisse
- C) Genomaufbau der RM-Gruppen 1, 2, 3 und 4 anhand der *EcoRI*-Restriktionsfragmente

— vermutlich von P22 abstammende Fragmente

..... Fragmente unklarer Abstammung



Lage möglicher Rekombinationspunkte: Die Angaben beziehen sich nicht auf exakte Positionen, sondern geben immer nur einen Bereich an; gleiche Lagen der Pfeile bedeuten nicht unbedingt eine exakte Übereinstimmung des Rekombinationsbereichs

3.A.3. Untersuchungen zur Entstehung rekombinanter Phagen- nachkommen bei der Superinfektion einer lysogenen Bak- terienzelle durch temperente Bakteriophagen und ihre Klarplaquemutanten

Zur Untersuchung von Unterschieden bei der Entstehung rekombinanter Phagennachkommen bei der Superinfektion einer lysogenen Zelle durch temperente Wildtyp-Phagen und ihre Klarplaquemutanten wurden die beiden Stämme DB21(G119) und *S.t.* 119(119), wie in **3.A.2.** beschrieben, erneut mit den Phagen P22-H1 bzw. ES18 infiziert. Parallel dazu wurden die Ansätze zusätzlich mit den entsprechenden Klarplaquemutanten P22-H5 und PGV1 durchgeführt. In allen Versuchen wurde mit der, normalerweise im Labor für die Infektion mit Klarplaquephagen gewählten, MOI = 3 infiziert. Analysiert wurde jeweils nur die erste Generation. Zur Identifikation von rekombinanten Phagen wurden die in **3.A.1.1.** beschriebenen Sonden zur Hybridisierung von Plaquelifts verwendet.

3.A.3.1. Rekombinantenhäufigkeit bei Superinfektion von *S. typhimurium*119(G119) mit ES18 bzw. PGV1 (MOI 3)

Bei den Superinfektionsexperimenten von *S.t.* 119(G119) mit ES18 wurden insgesamt 200 Plaques getestet. Es konnten jedoch keine Rekombinanten identifiziert werden (Rekombinantenfrequenz <1:200). Aus dem Lysat von *S.t.* 119(G119), das mit PGV1 überinfiziert wurde, wurden 198 Phagenplaques untersucht, darunter fanden sich 3 Rekombinanten. Dies entspricht einer Rekombinantenhäufigkeit von 1:66. Im Vergleich dazu lagen die Frequenzen bei der Superinfektion mit ES18 in **3.A.2.1.** deutlich niedriger (**Tab.3.A.2.**: 1:100 – <1: 900). Aufgrund der niedrigen Gesamtanzahl an rekombinanten Phagen aus der Infektion von *S.t.* 119(G119) mit ES18 bzw. PGV1 wurde auf eine eingehendere Analyse der Rekombinanten verzichtet.

3.A.3.2. Rekombinantenhäufigkeit bei Superinfektion von DB21(PS119) mit P22-H1 bzw. P22-H5 (MOI 3)

Die Rekombinantenhäufigkeiten bei der Superinfektion des G119-lysogenen DB21 mit P22-H1 bzw. seiner Klarplaquemutanten P22-H5 lagen erwartungsgemäß höher als die der entsprechenden Versuche mit ES18 und PGV1. Anhand der hier durchgeführten Experimente konnte kein Unterschied der Häufigkeit des Auftretens von Rekombinanten zwischen den Phagen P22-H1 und P22-H5 mit G119 nachgewiesen werden. Bei beiden lag die Rekombi-

nantenhäufigkeit bei 1:14 (P22-H1: 11 Rekombinanten von 148 getesteten Phagen; P22-H5: 14 von 192).

3.A.3.3. Genomstruktur der G119/P22-H1- und G119/P22-H5-Rekombinanten (MOI 3)

Die Frage nach der Art der Austauschereignisse zwischen G119 und P22-H1 bzw. P22-H5 wurde anhand der Genomzusammensetzung der Rekombinanten analog zu Abschnitt **3.A.2.3.** untersucht. Dabei kamen die Muster HM1, HM2, HM4 und HM5, die bereits bei der Genomanalyse der G119/P22-H1-Rekombinanten (MOI = 0,01 bzw. 0,5) in **3.A.2.3.** auftauchten, erneut vor. Die Muster HM3 und HM6 konnten nicht nachgewiesen werden. Für die G119/P22-H5-Rekombinanten konnten drei neue Modulkombinationen (HM9, HM10 und HM11), für die G119/P22H1-Phagen eine (HM8) gezeigt werden (**Abb. 3.A.10.**).

Die meisten Rekombinanten der MOI = 3 von G119/P22-H1 (8 von 11 = 72%) und von G119/P22-H5 (6 von 14 = 48%) gehörten der Gruppe HM5 an, die bei den G119/P22-H1-Rekombinanten der MOI 0,01 und 0,5 nur 1,6% ausmachte. Die bei letzteren zahlenmäßig am häufigsten vertretene Gruppe HM1 kam bei den Rekombinanten der MOI = 3 nur bei einem Vertreter der G119/P22-H5-Phagen vor. Auch die Hybridisierungsmuster HM2, HM7, HM9, HM10 und HM11 wurden jeweils nur von einem Phagen repräsentiert, die Muster HM4 und HM8 besaßen jeweils zwei Vertreter.

3.A.4. Zusammenfassende Darstellung der Hybridisierungsergebnisse aus 3.A.2. und 3.A.3.

Zur Analyse der Modulkombinationen aller Rekombinanten, die durch Superinfektion des lysogenen Stammes DB21(G119) mit P22-H1 bzw. P22-H5 entstanden (MOI 0,01/0,5 und 3), standen sechs Hybridisierungssonden aus unterschiedlichen Genombereichen von P22 zur Verfügung, die im Phagen G119 in dieser Form nicht vorhanden waren. Theoretisch konnten also allein durch Austausch dieser Module $2^6 = 64$ verschiedene Kombinationsmöglichkeiten (= neue Phagen) entstehen. 11 davon wurden in allen Superinfektionsexperimenten zusammen nachgewiesen. Die Restriktionsanalysen der Rekombinanten in **3.A.2.** zeigten, daß die Rekombinationsereignisse selbst beim Austausch gleicher Gene nicht unbedingt an den gleichen homologen Punkten in den Phagengenomen stattfanden. **Abb. 3.A.10.** gibt einen Überblick über die, durch Hybridisierungsanalysen nachgewiesenen, neu entstandenen Modulkombinationen und die Anzahl der Vertreter in den unterschiedlichen Versuchen.

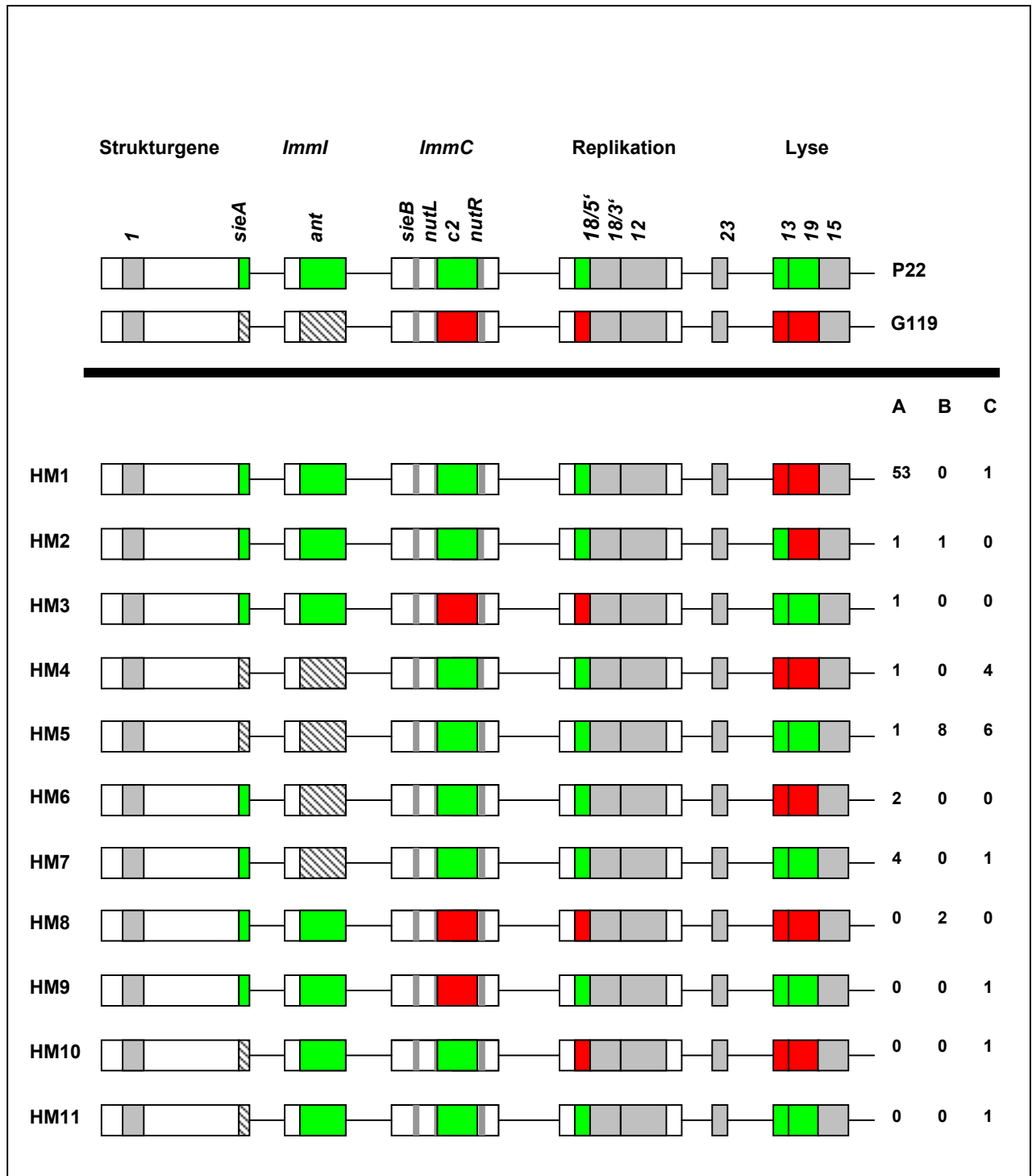


Abb. 3.A.10.: Modulkombinationen bei Superinfektion von DB21(G119) mit P22-H1 und P22-H5

Dargestellt ist der Genomaufbau der rekombinanten Phagen an Hand der Hybridisierungsanalysen. Legende siehe **Abb. 3.A.6.**

Angegeben ist jeweils die Anzahl der Vertreter der einzelnen Gruppen:

A: G119/P22-H1-Rekombinanten, MOI 0,01/0,5

B: G119/P22-H1-Rekombinanten, MOI 3

C: G119/P22-H5-Rekombinanten, MOI 3

3.B. Diskussion

Seit langem ist bekannt, daß einige Vertreter der lambdoiden Familie miteinander in genetischem Austausch stehen und Gene oder Gengruppen untereinander austauschen können [Campbell und Botstein, 1983]. Als Zugehörigkeitskriterium für die lambdaoide Familie forderten Campbell und Botstein deshalb die Fähigkeit zum Austausch genetischer Information mit λ [Campbell und Botstein, 1983]. Aufgrund der unterschiedlichen Wirtsbereiche der Vertreter des P22- und λ -Astes der lambdoiden Familie ist dies in den meisten Fällen in der Natur nicht ohne weiteres auf direktem Weg möglich. Unter Laborbedingungen konnte jedoch gezeigt werden, daß selbst Phagen, die zu den beiden unterschiedlichen Ästen der lambdoiden Familie gehören (wie z. B. P22 und λ), in der Lage sind, durch Rekombination neue lebensfähige Hybridphagen hervorzubringen [Gemski et al., 1972; Botstein und Herskowitz, 1974]. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, wie rekombinante Phagen entstehen können:

1. Durch Mischinfektion einer Bakterienzelle mit zwei unterschiedlichen Phagen oder
2. durch Superinfektion einer lysogenen oder defekt-lysogenen Wirtszelle durch einen freien Phagen. Man vermutet, daß dies die häufigste Ursache für das Entstehen neuer Modulkombinationen in der Natur ist [Campbell, 1988].

Experimente, die sich diese beiden Möglichkeiten zunutze machen, sind seit langem bekannt: Bereits 1959 schlug Adams die sogenannten "mixed-infection"-Experimente einer Wirtszelle mit zwei unterschiedlichen Phagen als Zuordnungskriterium der Taxonomie vor [Adams, 1959]. Sollte es im Anschluß hieran zur Freisetzung von rekombinanten Phagen kommen, wäre dies nach Adams gleichbedeutend mit der Zugehörigkeit zu einer Spezies.

Auch Versuche zur Superinfektion von lysogenen Bakterienzellen durch einen freien Phagen wurden früh in der Literatur beschrieben: 1969 konnte Yamamoto zeigen, daß die Vermehrung von P22 auf einem, mit dem Phagen Fels 2 lysogenisierten, Isolat des *Salmonella typhimurium*-Stamms Q1 mit einer Frequenz von $< 10^{-11}$ zur Entstehung des rekombinanten Phagen F22 führte [Yamamoto, 1969]. Kaiser beschrieb den Austausch der QSR-Genregionen von $\lambda p4$ und verschiedener λqin -Phagen gegen Teile des *qsr'*-Prophagen [Kaiser, 1980]. Auch die Abstammung der λrev -Phagen wurde auf ein Austauschereignis mit dem Rac-Prophagen zurückgeführt [Kaiser und Murray, 1979].

Nach Highton et al. ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß ein solcher Austausch auch in der Natur stattfindet [Highton et al., 1990]. Neuere Experimente zur Superinfektion von lysoge-

nen Bakterien mit *Streptococcus*-Phagen weisen jedoch teilweise widersprüchliche Ergebnisse auf:

- Fayard wies bei Superinfektionen von *Streptococcus thermophilus*-Phagen mit heteroimmunen temperenten Phagen unter den isolierten Nachkommenphagen Rekombinationsereignisse an Hand neuer Restriktionsmuster nach, die mit keinem der Muster eines Elternteils übereinstimmten [Fayard, 1993].
- Bei der Untersuchung von *Streptococcus thermophilus*-Phagen hingegen, die aus Superinfektionsversuchen mit heteroimmunen virulenten Phagen stammten, konnten weder durch Restriktions- noch durch Hybridisierungsanalysen rekombinante Nachkommenphagen entdeckt werden [Brüssow et al., 1998]. Brüssow et al. stellten deshalb das tatsächliche Auftreten von Rekombinationsereignissen beim Aufeinandertreffen von zwei Phagen infolge Superinfektion einer lysogenen Wirtszelle sowohl unter Laborbedingungen als auch in der Natur in Frage. Allerdings sollte hierbei der Verwandtschaftsgrad der eingesetzten Phagen berücksichtigt werden. Diese gehörten nicht zu einer der lambdoiden Familie vergleichbaren Gruppe, sondern waren, wenn überhaupt nur sehr weitläufig miteinander verwandt [Brüssow, persönliche Mitteilung].

Zum besseren Verständnis der Evolutionsmechanismen, die zur Entstehung der enormen Vielfalt der lambdoiden Phagen geführt haben, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Superinfektion einer lysogenen Wirtszelle unter Laborbedingungen nachgestellt.

Die zur Infektion eingesetzten Phagen P22-H1, P22-H5, ES18 und PGV1 (isoliert im Rahmen dieser Arbeit) waren heteroimmun zu dem Prophagen G119. Sie unterschieden sich zum einen hinsichtlich ihrer Immunitätsregionen voneinander (ES18 und PGV1 besitzen im Gegensatz zu P22-H1 und P22-H5 keine Imml-Region), zum anderen sind die Phagen P22-H5 und PGV1 die Klarplaquemutanten der temperenten Phagen P22-H1 und ES18. Da der natürliche Wirt des Phagen G119, *Salmonella typhimurium* 119, nicht durch P22 infiziert werden konnte, mußte für die Superinfektionsexperimente mit P22 auf den Stamm DB21 (prototropher Wildtyp von *Salmonella typhimurium* LT2) zurückgegriffen werden. Dazu war jedoch zunächst eine Etablierung von G119 als Prophage in DB21 notwendig.

Durch Vergleich des Genoms des Prophagen G119 mit den Genomen von P22 und ES18 mittels Hybridisierungsanalysen mit spezifischen Sonden aus typischen Genomsegmenten der lambdoiden Phagen P22 und ES18 konnten zunächst alle Bereiche, in denen die jeweiligen Phagenpaare (G119/P22-H1, G119/P22-H5, G119/ES18 und G119/PGV1) unterschiedliche Gene besaßen, ermittelt werden (**Abb. 3.A.2.** und **Abb. 3.A.3.**). Die in Abschnitt **3.A.2.**

beschriebene Analyse der Nachkommenphagen mittels Restriktionsanalysen und Hybridisierungsexperimenten (teilweise über mehrere Generationen) ermöglicht es nun, Aussagen über die Häufigkeit zu machen, mit der zwei Phagen Segmente ihres Genoms austauschen.

Häufigkeit der Rekombinanten:

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Superinfektionsexperimente deuten darauf hin, daß Rekombinationsereignisse eine wichtige Rolle bei der Neukombination von Modulen und damit bei der Entstehung neuer Phagen spielen. Zur besseren Übersicht ist die Anzahl der nachgewiesenen Rekombinanten bei den verschiedenen Superinfektionsexperimenten in **Tab. 3.B.1.** noch einmal zusammengefaßt.

G119-lysogener Wirtstamm	Infektion mit	MOI	Rekombinationsfrequenz
<i>Salmonella typhimurium</i> 119 (G119)	ES18	0,01	1:150 - 1:600
		0,5	1:100 - <1:900
		3	<1:200
	PGV1	3	1:66
DB21(G119)	P22-H1	0,01	1:71 - <1:181
		0,5	1:11 – 1:126
		3	1:14
	P22-H5	3	1:14

Tab. 3.B.1.: Rekombinantenhäufigkeiten in den einzelnen Superinfektionsexperimenten

Die in dieser Arbeit ermittelten Rekombinantenhäufigkeiten zeigen, daß Rekombinationsereignisse zwischen lambdoiden Phagen zumindest unter geeigneten Laborbedingungen einen häufig ablaufenden Prozeß darstellen (**Tab. 3.B.1.**). Die Werte liegen in einem Bereich, der auch von Botstein und Herskowitz bei ihren bereits in Teil 1 dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Entstehung von P22/ λ -Hybridphagen beschrieben wurde [Botstein und Herskowitz, 1974]. Sie erhielten Rekombinanten mit einer Häufigkeit von 2×10^{-2} - $< 2 \times 10^{-8}$. Bei Untersuchungen zur Rekombination zwischen den Phagen P22 und Fels2, die nicht zu einer homogenen Familie gehören, konnte Yamamoto hingegen Rekombinanten nur mit einer Frequenz von 10^{-11} nachweisen [Yamamoto, 1969]. Es ist also anzunehmen, daß die Anzahl der Rekombinanten in engem Zusammenhang mit den jeweils gewählten Versuchsbedingungen steht.

Die Gesamtzahl der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Phagennachkommen reicht bei weitem nicht aus, um signifikante statistische Aussagen zu machen. Aus diesem Grund können hier nur richtungsweisende Trends aufgezeigt werden. Über die Rolle der unterschiedlichen Entwicklungsmöglichkeiten temperenter Bakteriophagen und ihrer Klarplaque-Mutanten kann keinerlei Aussage getroffen werden. Hier stimmt die Anzahl der nachgewiesenen Rekombinanten bei den Superinfektionsexperimenten mit P22-H1 und P22-H5 überein. Vermutlich liegt bei der für diese Versuche gewählten MOI = 3 die Rekombinationshäufigkeit bereits so hoch, daß die unterschiedlichen Vermehrungsformen diese Zahl nicht weiter erhöhen können.

Insgesamt konnte für jedes geprüfte Modul mindestens eine neue Kombination mit anderen Modulen nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt **3.A.3.2.**). Teilweise wurden bis zu mindestens vier Rekombinationsereignisse in einem Phagen nachgewiesen (z.B. HM-Gruppe 6 in **Abb. 3.A.10.**). Die einzelnen Regionen wurden allerdings mit unterschiedlichen Häufigkeiten ausgetauscht (**Abb. 3.A.10.**).

Die in den einzelnen Superinfektionsexperimenten nachgewiesene Anzahl an rekombinanten Phagen darf jedoch nicht mit der Anzahl der tatsächlich stattgefundenen Rekombinationsereignisse verwechselt werden.

Von den hier überprüften Modulen konnten nur 11 der theoretisch errechenbaren 64 verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten (= neue Phagen) nachgewiesen werden. Diese geringe Zahl deutet darauf hin, daß nicht alle durch Rekombinationsereignisse neu entstandenen Modulkombinationen notwendigerweise zu lebensfähigen oder genauso optimal angepaßten Phagennachkommen führten, sondern ein großer Teil der entstandenen Phagen Selektionsmechanismen zum Opfer fielen.

Die verwendeten Hybridisierungs sonden erfassen nur einen geringen Teil des lambdoiden Genoms, so daß bei weitem nicht alle Regionen, in denen ein Austauschereignis stattgefunden haben könnte, erfaßt werden konnten. Die Gesamtzahl aller Rekombinationsereignisse sowie auch die Anzahl der neuen Modulkombinationen, die zu lebensfähigen Phagen führten, ist höchstwahrscheinlich in Wirklichkeit wesentlich höher als die Zahl derer, die durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsanalysen nachgewiesen werden konnten. Darauf deuten auch die Ergebnisse der *EcoRI*-Restriktionsanalysen der Rekombinanten aus den Superinfektionsexperimenten mit P22-H1 hin. Hierbei zeigte sich, daß innerhalb der verschiedenen Hybridisierungsmuster-Gruppen (HM-Gruppen) durchaus unterschiedliche Restriktionsmuster existierten (**Abb. 3.A.6.**). Die Restriktionsanalysen ermögliche-

ten außerdem die Identifizierung zusätzlicher Bereiche, in denen sich mögliche Rekombinationsereignisse abgespielt haben könnten (**Abb. 3.A.9.**).

Einfluß der *Multiplicity of Infection* (MOI):

Aufgrund der niedrigen Gesamtfrequenz an Rekombinationsereignissen lassen die Superinfektionsexperimente mit ES18 keinerlei Aussage über die Rolle des zahlenmäßigen Verhältnisses von überinfizierenden Phagen zu lysogenen Wirtszellen bei der Neuentstehung von Modulen zu. Bei der Infektion von DB21(G119) mit P22-H1 ist deutlich zu erkennen, daß die Anzahl der rekombinanten Nachkommenphagen mit dem Verhältnis der infizierenden Phagen zu lysogenen Wirtszellen steigt. Mit steigender MOI werden in der gleichen Zeit mehr Zellen der Kultur infiziert, was mit dem häufigeren Auftreten von Rekombinationsereignissen korreliert. Im Falle der Infektion mit P22 spielt jedoch auch die im Folgenden beschriebene Induktion des Prophagen G119 durch den Antirepressor des überinfizierenden P22 eine Rolle.

Einfluß des Antirepressors von P22:

Die in Teil **3.A.2.** durchgeführten Superinfektionsexperimente zeigen, daß nach Superinfektion einer lysogenen Bakterienzelle mit P22-H1 der Anteil an rekombinanten Phagen unter den Nachkommen der ursprünglichen Elternphagen wesentlich höher war als nach Superinfektion mit ES18. Das gleiche konnte auch bei den Experimenten mit den entsprechenden Klarplaque-Mutanten P22-H5 und PGV1 beobachtet werden.

Die vorliegenden Daten deuten auf eine entscheidende Rolle der zweiten Immunitätsregion *Imm1* hin, über die P22 im Gegensatz zu ES18 zusätzlich zur Immunitätsregion *ImmC* verfügt. Durch den Besitz seines in der *Imm1*-Region kodierten Antirepressors hat P22 gegenüber ES18 in zweifacher Hinsicht einen großen Vorteil: Zunächst ermöglicht es der Antirepressor P22, sich in einer lysogenen Zelle mit homoimmunem Prophagen durch Ausschaltung des prophageneigenen Repressors erfolgreich zu vermehren. Dadurch findet eine Erweiterung des Wirtsbereiches von P22 auf die normalerweise nicht zugänglichen Wirte von homoimmunen Prophagen statt. Dies spielt bei den hier durchgeführten Experimenten allerdings keine Rolle, da der als Prophage in das Genom der Wirtszelle integrierte Phage G119 heteroimmun zu P22 und ES18 ist. Der Antirepressor ermöglicht es P22 aber auch, sowohl homo- als auch heteroimmune Prophagen zu induzieren [*Bezdek und Amati, 1968; Susskind und Botstein, 1975*]. Durch Replikation des Prophagenoms liegen dann mehr Kopien von

letztem in der Bakterienzelle vor. Somit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für ein Rekombinationsereignis zwischen dem superinfizierenden Phagen und dem Prophagen drastisch. Dies bietet dem überinfizierenden P22 verstärkt die Möglichkeit, durch Rekombination den gesamten Gen-Pool des Prophagen zu nutzen. Die Wahrscheinlichkeit der Entstehung neuer Genotypen wird damit erhöht.

Wie bereits 1980 von Botstein beschrieben, besitzen bei der Superinfektion einer lysogenen Wirtszelle offensichtlich diejenigen Phagen einen besonderen Vorteil, die dazu in der Lage sind, den in der Wirtszelle etablierten Prophagen zu induzieren und dadurch seine Replikation herbeizuführen [Botstein, 1980].

Die Derepression von Prophagenfunktionen kann unter Umständen sogar essentiell sein, z. B. dann, wenn eine lebensnotwendige P22-eigene Funktion sich in dem neuen Wirt als nicht funktionsfähig erweist [Suskind und Botstein, 1978].

Über den Repressor des zu P22 heteroimmunen Prophagen G119 liegt keinerlei Information vor, er ist jedoch offensichtlich nahe genug mit P22 verwandt, um durch dessen Antirepressor durch eine nicht-kovalente Bindung [Suskind und Youderian, 1983] inhibiert und somit inaktiviert zu werden.

Evolutiv gesehen besteht der Vorteil des Antirepressors darin, die Neukombination von funktionellen modularen Segmenten zur Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen zu vereinfachen. Um so erstaunlicher ist es, daß bisher innerhalb der lambdoiden Familie kein Antirepressor mit einer anderen Spezifität außer der von P22 gefunden wurde. Bemerkenswert ist auch, daß selbst Phagen, die den Antirepressor von P22 besitzen, bis heute nur bei sechs weiteren Phagen des P22-Astes der lambdoiden Familie gefunden wurden [Schicklmaier, 1995]. Diese Tatsache könnte ein Hinweis darauf sein, daß der Antirepressor als ein nicht-essentielles Gen evolutiv gesehen neueren Ursprungs ist und dem Genpool des P22-Astes der lambdoiden Familie erst seit kurzer Zeit angehört.

Einfluß der rekombinanten Nachkommenphagen an der Neukombination von Modulen in den nachfolgenden Generationen:

Eine wichtige Frage zu Beginn dieser Arbeit war, ob die rekombinanten Nachkommenphagen einen zusätzlichen Beitrag zur Neukombination von Modulen leisten, wenn sie in den nachfolgenden Generationen im Kulturansatz verbleiben und dann ebenfalls an der Infektion lysogener Wirtszellen teilnehmen können. Hierzu wurden bei den Superinfektionsexperimenten mit den temperenten Wildtypphagen die Nachkommen über sechs Generationen (bei ES18) bzw. über fünf Generationen (bei P22-H1) auf Austauschereignisse hin untersucht.

Die Anzahl der Rekombinanten in den einzelnen Generationen schwankte stark (**Abb. 3.A.3.**). Ein konstanter Anstieg der Rekombinantenhäufigkeit in den aufeinanderfolgenden Generationen konnte nicht beobachtet werden.

Durch die gewählten Laborbedingungen wurde gewährleistet, daß in der Kultur während der gesamten Inkubationsdauer eine geschlossene Population vorlag. Dies bedeutet, daß der Genpool in sich geschlossen blieb und von außen keinerlei neue Allele einfließen konnten. Aus diesem Grund blieb die Anzahl der vorhandenen homologen Sequenzen, an denen Rekombinationsereignisse stattfinden konnten, zwischen den Elternphagen zu den Nachkommenphagen konstant. In den nachfolgenden Generationen konnten deshalb prinzipiell zwar keine anderen Modulkombinationen entstehen als bereits in der ersten Generation möglich waren, es wäre aber durchaus denkbar gewesen, daß die rekombinanten Nachkommen zu einer zusätzlichen Erhöhung der Rekombinanzanzahl in der Kultur führen. Dies kann jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß die bereits etablierten Phagen ES18 bzw. P22 und G119 besser an die bestehenden Umweltbedingungen angepaßt waren als die neuen Modulkombinationen, so daß eine Selektion zugunsten der Elternphagen stattgefunden hat. Unter Umständen haben sogar sehr viele Rekombinationsereignisse stattgefunden. Die entstandenen neuen Modulkombinationen führten jedoch nur in wenigen Fällen zu überlebensfähigen Nachkommen, da sich die meisten Kombinationen gegenüber den bereits etablierten Phagen nicht durchsetzen konnten. In den nachfolgenden Generationen konnten sich ebenfalls die beiden Elternphagen am besten durchsetzen, wiederum gefolgt von einigen wenigen überlebensfähigen neuen Kombinationen.

Auf das Vorhandensein solcher Selektionsmechanismen deutet auch die bereits erwähnte geringe Anzahl der tatsächlich nachgewiesenen Modulkombinationen (11) im Vergleich zur Zahl der theoretisch errechenbaren (64).

Es stellt sich nun die Frage, in wie weit diese Selektionsmechanismen Einfluß auf das zahlenmäßige Verhältnis der Kombinationen untereinander im Laufe der Generationen besitzen. Setzen sich innerhalb der Kulturfolgen bestimmte Phagen durch oder besitzen alle überlebensfähigen Modulkombinationen die gleichen Chancen? Diese Frage soll Gegenstand des nächsten Abschnitts sein.

Modulkombinationen in unterschiedlichen Phagengenerationen

Die in Teil **3.A.2.** und **3.A.3.** durchgeführten Superinfektionsexperimente mit P22-H1 bzw. P22-H5 als überinfizierenden Phagen liefern Einblicke in die Art der Modulkombinationen,

die sich im Laufe der Zeit in Abhängigkeit von MOI und Inkubationsdauer der Kultur durchgesetzt haben.

In Teil **3.A.2.** wurden die Infektionsmultiplizitäten bewußt niedrig gewählt (MOI = 0,01 bzw. 0,5). Dadurch wurde gewährleistet, daß die rekombinanten Phagen der jeweils vorangegangenen Inkubationszyklen bei erneuter Inkubation noch genügend nicht-infizierte Wirtszellen zur Superinfektion vorfanden. So konnten mehrere aufeinanderfolgende Generationen auf Austauschereignisse hin untersucht werden. In Teil **3.A.3.** wurde eine MOI = 3 verwendet, dies entspricht der normalerweise unter Laborbedingungen gewählten MOI für Klarplaque-mutanten. Bei dieser MOI beträgt das Verhältnis Phagen : Wirtszelle = 3:1. Man kann also davon ausgehen, daß bereits nach dem ersten Infektionszyklus der größte Teil der Wirtszellen infiziert wurde, so daß die hierdurch entstandenen rekombinanten Phagennachkommen kaum noch nicht-infizierte Zellen für weitere Infektionszyklen vorgefunden haben.

Die in Teil **3.A.2.** und **3.A.3.** nachgewiesenen Modulkombinationen repräsentieren also unterschiedliche Momentaufnahmen der Nachkommengenerationen. Während durch die Superinfektionsexperimente bei hoher MOI (Teil **3.A.3.**) diejenigen Phagen isoliert wurden, die nach einem Infektionszyklus entstanden sind, wurden durch die Superinfektionsexperimente bei den niedrigeren MOIs (Teil **3.A.2.**) die Phagen erfaßt, die sich im Laufe der Zeit innerhalb der geschlossenen Population durchgesetzt haben. Tatsächlich sind die verschiedenen Hybridisierungsmuster-Gruppen (HM-Gruppen) in den einzelnen Versuchen unterschiedlich stark vertreten (**Abb. 3.A.9.**). Zur besseren Übersicht sind die beiden größten Phagengruppen, die nach einem und zahlreichen Infektionszyklen nachweisbar waren, in **Abb. 3.B.2.** noch einmal dargestellt.

Die meisten nach kurzer Zeit entstandenen Rekombinanten (54%) besitzen in der linken Hälfte des Genoms die überprüfbaren Regionen von G119 (kein SieA-System und keinen Antirepressor) und in der rechten Hälfte den c2-Repressor, den 5'-Bereich von Gen 18 sowie die Lysigene von P22. Eine völlig andere Modulzusammensetzung weist die größte Gruppe der Rekombinanten auf, die sich im Laufe mehrerer aufeinanderfolgender Generationen angereichert hat. Diese Phagen besitzen bis auf die Lysigene alle überprüften Regionen von P22, also auch das sieA-System und den Antirepressor. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß bei der Superinfektion einer lysogenen Wirtszelle zu Beginn durch Rekombinationsereignisse eine bestimmte Modulkombination bevorzugt entsteht, die dann im Laufe der Generationen durch eine andere Kombination ersetzt wird. Bei der nach wenigen Infektionszyklen am häufigsten vertretenen Modulkombination wäre ein gehäuftes Vorkommen homologer Sequenzbereiche in den benachbarten Genomabschnitten der ausgetauschten Regionen denkbar.

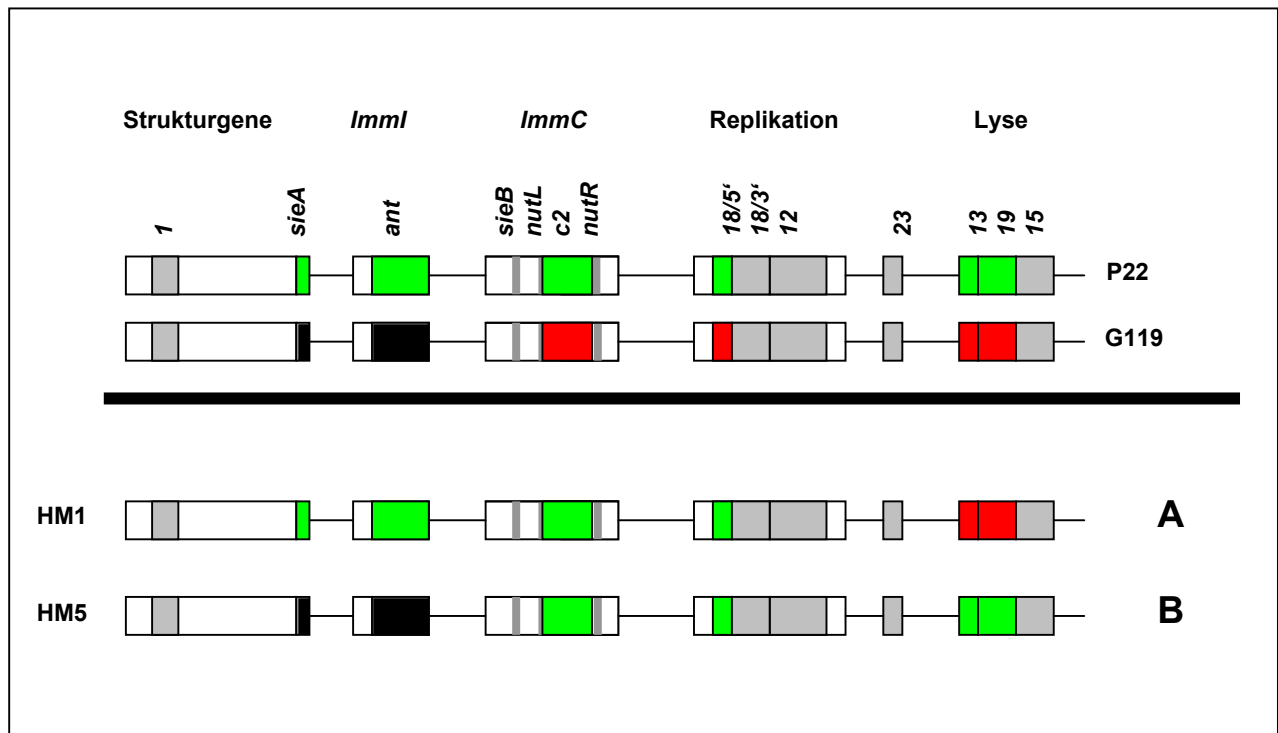


Abb. 3.B.2.: Häufigste Modulkombinationen bei Superinfektion von DB21(G119) mit P22
 Dargestellt ist der Genomaufbau der rekombinanten Phagen anhand der Hybridisierungsanalysen. Legende siehe **Abb. 3.A.6.**
A: Am häufigsten vertretene Rekombinantengruppe nach zahlreichen Infektionszyklen
B: Am häufigsten vertretene Rekombinantengruppe nach einem Infektionszyklus

Dies würde dann zu einer Anhäufung von Rekombinationsereignissen in diesen Bereichen führen und damit zunächst zu einem Vorteil dieser Modulkombinationen gegenüber denjenigen, die nur über wenige flankierende benachbarte Homologien in den geprüften Regionen verfügen. Im Laufe der Zeit setzt sich jedoch offensichtlich eine Phagengruppe mit einer anderen Genomstruktur durch. Diese Gruppe besitzt nicht nur das SieA-System von P22, das für seinen Besitzer im Prophagenzustand einen zusätzlichen Schutzmechanismus gegen überinfizierende Phagen bedeutet, sondern auch den Antirepressor von P22, dessen besondere Funktion bei der Superinfektion einer lysogenen Zelle bereits ausführlich beschrieben wurde. Die Tatsache, daß sich die meisten Phagen der Population im Laufe der Zeit den Antirepressor von P22 „angeeignet“ haben, spricht dafür, daß Phagen, die über einen Antirepressor verfügen, langfristig gesehen einen Selektionsvorteil gegenüber Phagen ohne zweite Immunitätsregion besitzen. Die hier geschilderten Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Antirepressor tatsächlich, wie bereits zuvor vermutet, als ein nicht-essentielles Gen evolutionär gesehen neueren Ursprungs ist und sich bis heute in natürlichen Populationen noch nicht in dem Maße durchsetzen konnte, wie es unter Laborbedingungen in kurzer Zeit möglich ist.

Die Phagengruppe, die sich im Laufe zahlreicher Infektionszyklen durchgesetzt hat, besitzt außerdem die Lysisgene 13 und 19 des Phagen G119. Dieser Genombereich ist für die Freisetzung der Phagennachkommen essentiell. Auch diese Genkassette scheint ihren Besitzern entweder einen deutlichen Selektionsvorteil zu bieten oder vermehrt über flankierende Homologien zu verfügen. Untersuchungen der Genomstrukturen einer Sammlung lambdoider *Salmonella*-Phagen aus Naturisolaten, zu denen auch der Phage G119 gehört, deuteten darauf hin, daß die meisten dieser Phagen (82 %) im Bereich der Lysisgenkassette noch nicht identifizierte Gene besitzen [Schicklmaier, 1995]. Hier stellt sich nun die Frage, ob einige dieser Phagen ebenfalls die Lysisgene von G119 besitzen, die sich unter Laborbedingungen in kurzer Zeit gegenüber den Lysisgenen von P22 durchgesetzt haben. Nicht zuletzt auch aus diesem Grund wurde für die Untersuchung der Modulzusammensetzung in einer natürlichen Population lambdoider Phagen in Teil 4 der vorliegenden Arbeit die Lysisgenkassette dieser Phagenkollektion ausgewählt.

4. Evolution auf Modulebene in einer natürlichen Phagenpopulation

Im Laufe der Evolution wirken zahlreiche umweltbedingte und wirtsspezifische Faktoren auf die Phagen einer natürlichen Bakterienpopulation ein. Leider ist es nicht möglich, diese Faktoren, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuer Modulkombinationen spielen, unter Laborbedingungen nachzustellen. Auch eine Untersuchung der Modulzusammensetzung von Phagen, die aus natürlichen Populationen hervorgegangen sind, liefert noch keine Erkenntnisse über die einzelnen Faktoren, die die Entwicklung der Phagen im Laufe der Zeit beeinflusst haben. Man kann jedoch davon ausgehen, daß diese "natürlichen Phagen" bereits unter der Einwirkung besagter Faktoren entstanden sind.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Evolution der lambdoiden Bakteriophagen in einer natürlichen Phagenpopulation untersucht. Angesichts der enormen Variabilität der Mitglieder der lambdoiden Familie stellten sich folgende Fragen:

- Wieviele unterschiedliche Allele der einzelnen Module existieren in natürlichen Phagenpopulationen?
- Welche Allelkombinationen sind in der Natur tatsächlich vertreten?
- Mit welcher Häufigkeit wurden die einzelnen Allele im Verlauf der Evolution ausgetauscht?
- Können mögliche Rekombinationspunkte („Steckerelemente“) zum Austausch der einzelnen Allele nachgewiesen werden, wie sie in der Modultheorie von Botstein [Botstein, 1980] gefordert werden?
- Wieviele Kombinationsmöglichkeiten oder mit anderen Worten wieviele verschiedene Phagen können theoretisch existieren?

Diese Fragen sollten am Beispiel **einer** Genkassette des Genoms der lambdoiden Phagen untersucht werden: der **Lysisgenkassette**. Als Ausgangsmaterial hierzu diente eine Kollektion lambdoider Phagen aus Naturisolaten von *Salmonella typhimurium*. Ergebnisse von Schicklmaier [Schicklmaier, 1995] deuteten bereits darauf hin, daß in verschiedenen Bereichen der Genome dieser Phagen, darunter auch im Bereich der Lysisgene, bisher noch nicht identifizierte, neue "Allele" existieren müssen (vgl. **Abb. 1.3.**).

4.A. Ergebnisse

4.A.1 Module der Lysisgenkassette in einer natürlichen Population lambdoider *Salmonella*-Phagen

4.A.1.1. Lysisgene lambdoider Bakteriophagen

Am Ende des vegetativen Zyklus, nach der Heranreifung neuer Phagenpartikel in einer Wirtszelle, müssen die Nachkommenphagen diese verlassen, um ihrerseits neue Bakterien infizieren zu können. Dazu entwickelten die Phagen unterschiedliche Methoden. Die einfachste Strategie findet man bei einzelsträngigen filamentösen Phagen, die durch die Zellwand des Wirtes gelangen, ohne diese zu lysieren. Das klassische Beispiel hierfür ist der Phage M13 von *E. coli* [Model und Russel, 1988]. Die meisten anderen Phagen müssen die Wirtszelle zunächst lysieren, damit ihre Nachkommen freigesetzt werden können. Kleine Phagen (z. B. ϕ X174, MS2) haben hierzu andere Mechanismen entwickelt als die großen Phagen. Ein weit verbreitetes System zur Freisetzung neuer Phagenpartikel findet man bei den komplexeren doppelsträngigen DNA-Phagen, zu denen auch die lambdoiden Phagen zählen. Hier kommt es zur Zerstörung der Wirtszellwand durch Permeabilisierung der Membran und Degradation der Peptidoglycanschicht. Die hierfür verantwortlichen Genprodukte werden von drei Genen kodiert, die zusammen die Lysisgenkassette bilden. Diese Gene können jeweils als einzelne Module angesehen werden, deren Genprodukte trotz völlig verschiedener Wirkungsweisen durch ihr Zusammenwirken letztendlich immer zum gleichen Ergebnis führen, nämlich zur Lyse der Wirtszelle. Die drei Gene der Lysisgenkassetten in P22 und λ haben analoge Funktionen, aber andere Bezeichnungen:

- Gen $13_{P22} = \text{Gen } S_{\lambda}$,
- Gen $19_{P22} = \text{Gen } R_{\lambda}$,
- Gen $15_{P22} = \text{Gen } Rz_{\lambda}$.

Im Folgenden werden die Genbezeichnungen von P22 verwendet, sofern nicht explizit von den Genen des Phagen λ oder anderer Phagen die Rede ist.

Von **Gen 15**, das kein essentielles Gen ist, ist nur ein einziges Allel bekannt, das in abgewandelter Form in allen bisher untersuchten lambdoiden Phagen gefunden wurde. Die genaue Funktion des gp 15 ist unbekannt. Es handelt sich um ein Membranprotein mit einem

N-Terminus, der stark an eine sekretorische Signalsequenz erinnert. Man vermutet, daß gp 15 als Endopeptidase wirkt und eventuell am Auftrennen der Oligopeptid-Querverbindungen der Peptidoglycanschicht und/oder zwischen der Peptidoglycanschicht und der äußeren Membran beteiligt ist [Young, 1992].

In der kodierenden Region von Gen 15_λ wurde vor ein paar Jahren ein weiteres, viertes Lysegen identifiziert, das als Rz1 bezeichnet wird [Hanych et al, 1993]. Rz1 kodiert für ein Lipoprotein der äußeren Membran [Taylor et al., 1996].

Bei dem Produkt des **Gens 19** handelt es sich um das eigentliche lytische Agens. Der Sammelbegriff für die verschiedenen Enzyme, die schließlich zur Lyse der Bakterienzelle führen, ist **Endolysin**. Insgesamt sind vier verschiedene Endolysintypen bekannt, die die Phagen zur Degradation der Zellwand nutzen können und die sich lediglich hinsichtlich ihres Angriffspunktes an der Peptidoglycanschicht unterscheiden (**Abb. 4.A.1.**):

1. Der Phage λ besitzt eine **Transglykosylase**, die die Glycankette durch Schnitt der glykosidischen Bindung durchtrennt und den intramolekularen Transfer des O-Muramyl-Restes auf seine eigene C6-Hydroxylgruppe katalysiert. So entsteht ein zyklisches 1,6-Disaccharid-Produkt [Bienkowska-Szewczyk et al., 1981].
2. P22 besitzt ein **Lysozym (Glykosidase)**, das die $\beta(1-4)$ glykosidische Bindung hydrolysiert [Rennell und Poteete, 1985]. Auch beim gp R des lambdoiden *E. coli*-Phagen 21 geht man aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum gp 19_{P22} davon aus, daß es sich um ein Lysozym handelt [Young, 1992].
3. Bei dem dritten Endolysintyp handelt es sich um eine **Amidase**, die die Amidbindung zwischen der aminoglykosidischen Untereinheit und der Oligopeptidkette spaltet. Eine Amidase findet man beim gp 3.5 des Phagen T7 [Cheng et al., 1994]. Bei den lambdoiden Phagen konnte bis jetzt keine Amidase nachgewiesen werden.
4. **Endopeptidasen**, die z. B. bei den Phagen A118 und A500 von *Listeria monocytogenes* gefunden wurden, schneiden zwischen den Aminosäureresten in der Oligopeptidverbindung zwischen zwei aminoglykosidischen Polymeren [Loessner et al., 1995]. Endopeptidasen wurden bis heute bei Vertretern der lambdoiden Familie ebenfalls nicht nachgewiesen.

Endolysine werden, genauso wie die anderen Lysogene, während der Expressionsphase der späten Gene synthetisiert und liegen während der vegetativen Phase in aktiver, komplett

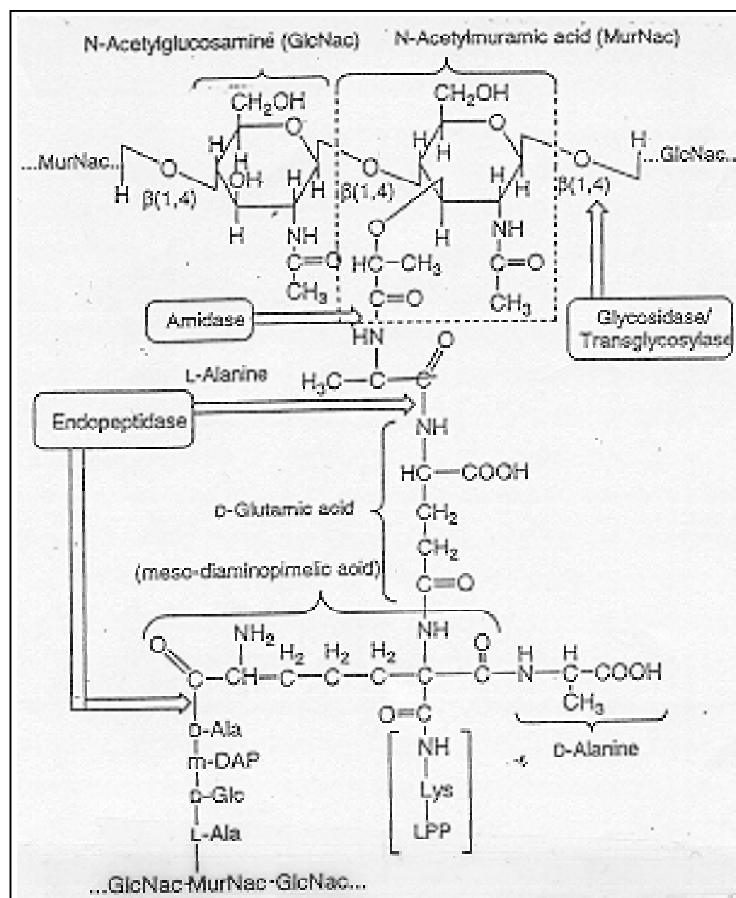


Abb. 4.A.1.: Angriffspunkte verschiedener Endolysintypen an der Peptidoglycanschicht gram-negativer Bakterien

GlcNac: N-Acetylglucosamin, MurNac: N-Acetylmuraminsäure, L/D-Ala: L/D-Alanin, D-Glu: D-Glutaminsäure, m-DAP: meso-Diaminopimelinsäure, Lys: Lysin, LLP: Lipoprotein, nach [Smith, 1998].

gefalteter Form im Cytoplasma vor [Young und Bläsi, 1995]. Da sie keine sekretorische Signalsequenz besitzen, können sie nicht durch die Cytoplasmamembran hindurchgelangen, um ihren Wirkungsort, die Peptidoglycanschicht, zu erreichen [Young, 1992].

Hierzu benötigen sie das Genprodukt des dritten Lysegens, des **Gens 13**, das sogenannte **Holin**. Die Holine sind die eigentlichen Kontrollelemente der Lyse. Es handelt sich um kleine integrale Membranproteine. Zu einem vorprogrammierten Zeitpunkt verursachen die Holine eine Läsion in der Cytoplasmamembran und dadurch einen Zusammenbruch des Membranpotentials. Die entstehenden "Löcher" (*holes*) sind stabil und unspezifisch und ermöglichen dem Endolysin den Zugang zum Periplasma und damit die Degradation der Peptidoglycanschicht. Über die Anordnung der einzelnen Holinmoleküle sowie die Verteilung der Proteine in der Membran ist nichts bekannt. Bis heute schlugen alle Versuche, die Läsionen der inneren Membran elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen, fehl [Young und Bläsi, 1995].

Die Holine werden in Abhängigkeit ihrer Größe und Membrantopologie in verschiedene Klassen unterteilt, die wiederum in unterschiedliche „Familien“ eingeteilt werden. Man unterscheidet bei den gram-negativen Bakterien drei verschiedene Klassen von Holinen, bei den gram-positiven Bakterien existieren mindestens vier unterschiedliche Holinklassen. Insgesamt waren zu Beginn dieser Arbeit mindestens 29 Holinfamilien bekannt, die insgesamt 56 verschiedene Mitglieder enthielten [Smith, 1998].

Für die vorliegende Arbeit sind lediglich die, im Folgenden ausführlich beschriebenen, Holine der Phagen der gram-negativen Bakterien von Bedeutung:

- Die Holine der **Klasse I** bestehen aus mindestens 87 Aminosäuren und enthalten zwei bis drei oder mehr Regionen, die als Transmembrandomänen (TMD) fungieren könnten. Innerhalb der Klasse I unterscheidet man vier „Genfamilien“, die sich aufgrund mangelnder Sequenzhomologien klar voneinander unterscheiden. Zu einer Familie dieser Klasse gehören unter anderem das S-Protein von λ sowie gp 13_{P22} (89 % Übereinstimmung auf Nukleotidebene).
- Die Holine der **Klasse II** sind kleiner. Sie bestehen aus maximal 78 Aminosäuren und besitzen nur zwei vermeintliche TMD. Zu einer der drei „Genfamilien“ gehört das S-Protein des Phagen 21.
- Der Phage T4 besitzt das einzige bekannte Holin der **Klasse III**. Es weist zu keinem der anderen bekannten Holine Ähnlichkeiten auf.

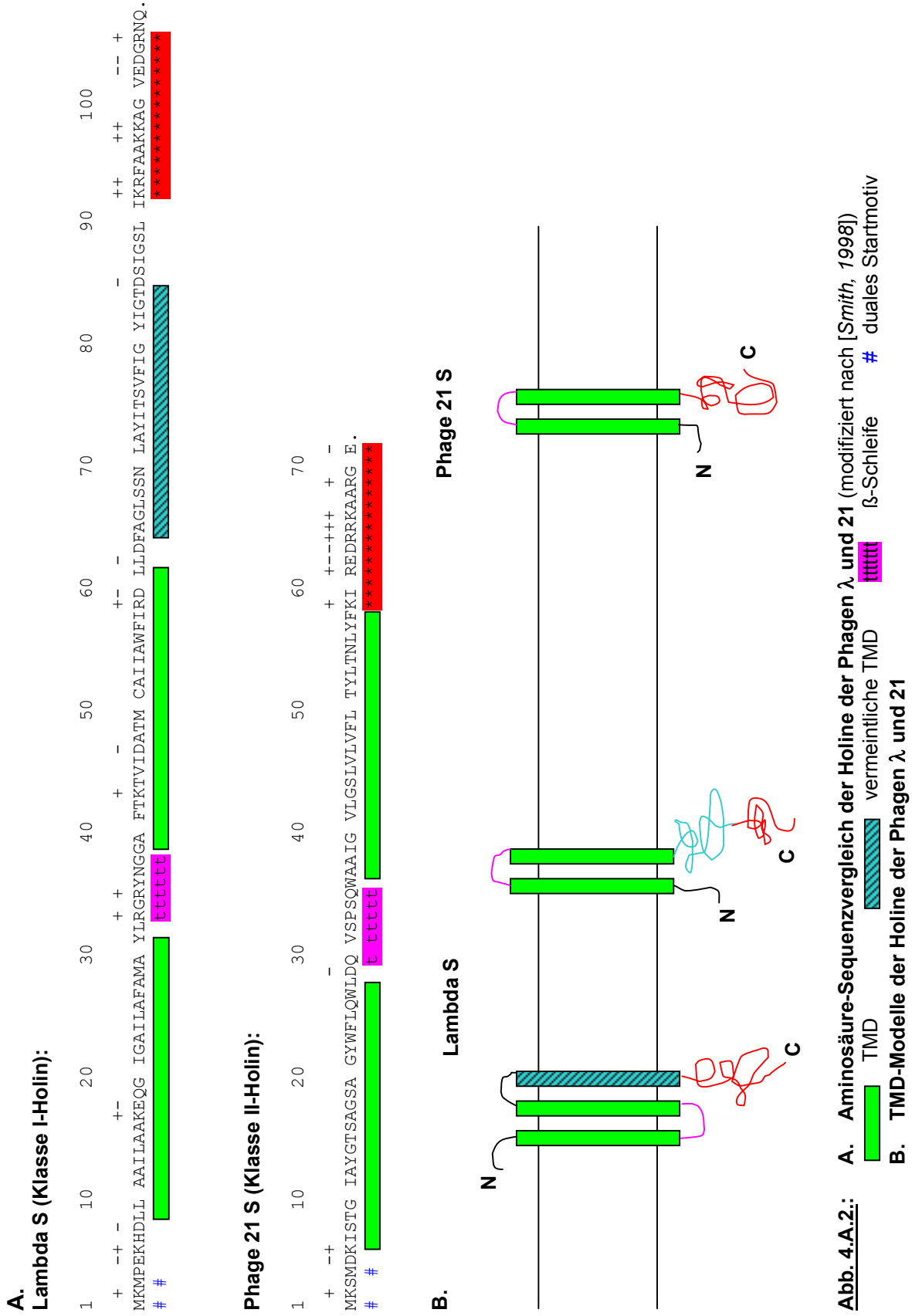
Erst eine eingehende Untersuchung der Holine der beiden lambdoiden Phagen λ und 21 führte zu der Idee, die Holine in Klassen einzuteilen. Es stellte sich heraus, daß die beiden Genprodukte in der Lage sind, einander zu substituieren, obwohl weder auf Sequenz- noch auf Nukleotidebene irgendwelche Ähnlichkeiten bestehen [Bonovich und Young, 1992]. Beide Proteine weisen jedoch einige Gemeinsamkeiten auf: Bei beiden handelt es sich um kleine Proteine (107 AS bei λ bzw. 71 AS beim Phagen 21), beide besitzen mindestens zwei TMD, die jeweils durch eine β -Schleife voneinander getrennt sind, einen hydrophilen N-Terminus sowie einen stark polaren, geladenen C-Terminus. Der größte Unterschied in der Organisation der beiden, durch die Phagen λ und 21 vertretenen, Holinklassen I und II besteht in der dritten ungeladenen Domäne der Proteine der Klasse I. Daraus resultieren auch die beiden verschiedenen Membrantopologie-Modelle, die für die Klasse I-Holine existieren (**Abb.4.A.2.**). Je nach Anwendung verschiedener Sekundärstrukturvorhersagen ergeben sich unterschiedliche Anzahlen an Transmembrandomänen: Ein Hydrophobizitätsprofil nach dem Kyte-Doolittle-Algorithmus deutet auf drei vermeintliche TMD hin [Raab et al., 1986]. Dies

würde bedeuten, daß der N-Terminus im Periplasma lokalisiert ist und der C-Terminus im Cytoplasma. Demgegenüber sagt der Chou-Fasman-Algorithmus nur zwei TMD voraus [Raab *et al.*, 1988]. In diesem Fall würden sowohl der N- als auch der C-Terminus im Cytoplasma liegen. Mittlerweile gilt es als relativ sicher, daß sich der C-Terminus der Klasse I-Holine im Cytoplasma befindet, die Lokalisation des N-Terminus ist jedoch nach wie vor unklar. Die Vorhersagen für die Holine der Klasse II sind dagegen eindeutig, hier findet man zwei TMD und die Lokalisation von N- und C-Terminus wird im Cytoplasma vermutet [Young und Bläsi, 1995]. In **Abb. 4.A.2.** sind jeweils die vermeintlichen TMD in der AS-Sequenz der Holine der Phagen λ und 21 sowie die unterschiedlichen existierenden Membrantopologie-Modelle dargestellt.

Die Regulation der Holinfunktion wurde vor allem beim Phagen λ intensiv untersucht. Das S-Gen von Lambda wird ebenso wie die anderen Lysigene nach Anschalten der Expression der späten Gene konstitutiv transkribiert. Es gibt keinerlei Hinweise auf eine aktive Regulation des Holins auf Transkriptions- oder Translationsebene während des vegetativen Zyklus. Wie ist es dann aber dennoch möglich, daß das Holin exakt zur richtigen Zeit in allen Zellen aktiv wird und Löcher in der Cytoplasmamembran hervorruft? Der genaue Mechanismus hierzu ist noch unbekannt. Eine wichtige Rolle kommt der Translations-Initiations-Region des S-Gens zu. Diese weist verschiedene Besonderheiten auf (**Abb. 4.A.3.**):

- Ein wichtiges Merkmal, das den Holinen aller lambdoiden Phagen und auch denen der meisten anderen Phagen gemeinsam ist, ist das duale Startmotiv [Bläsi und Young, 1996]. Alle lambdoiden Hologene besitzen ein zweites Methionin-Codon in der zweiten bis vierten Position und mindestens einer der dazwischen liegenden Reste ist entweder ein Lysin oder ein Arginin (**Abb. 4.A.2.**).

Neben den beiden Initiationscodons liegen zwei Sequenzbereiche, die komplementär zum 3'-Ende der 16S RNA sind. Der erste davon, 5'-GGGGG-3', wird als sdi-Struktur (*structure-directed initiation*) bezeichnet und ist an der Bildung einer Sekundärstruktur beteiligt. Der zweite Sequenzbereich, 5'-UAAG-3', schließt unmittelbar stromabwärts an diese Haarnadelstruktur an. Mutationsanalysen in dieser Region führten zu der Annahme, daß diese Strukturen in die Regulation der Funktion der Lysigene involviert sind [Raab *et al.*, 1988].



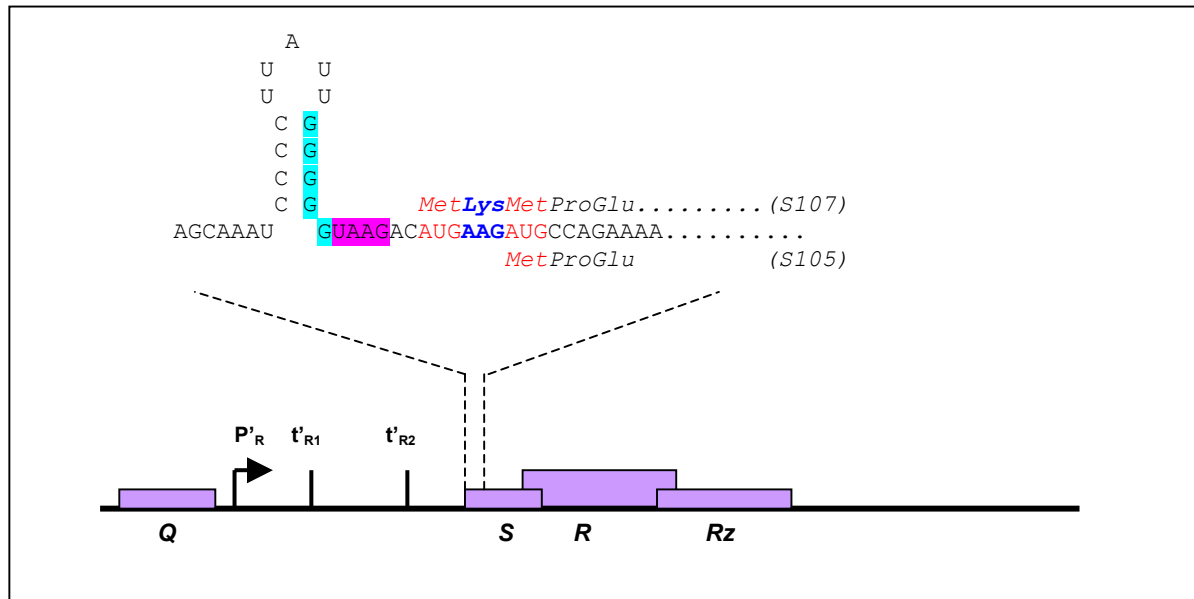


Abb. 4.A.3.: Sekundärstrukturen in den Translations-Initiations-Regionen der Holin-Gene lambdoider Bakteriophagen am Beispiel des Phagen λ

(modifiziert nach [Bläsi und Young, 1996])

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der sdi-Struktur sowie der ersten Basen des λ_S -Gens

Im unteren Teil sind die zum Promotor P'R proximal gelegenen Gene des späten Operons von λ dargestellt.

GGGGG Shine-Dalgarno-Sequenz des ersten Startcodons

UAAG zum 3'-Ende der 16S RNA komplementäre Sequenz

Auf der Basis dieser Untersuchungen entwickelten Raab et al. ein erstes Modell zur Erklärung der Funktion und Regulation des Gens S_λ mit Hilfe des dualen Startmotivs:

Die beiden Startcodons führen zur Bildung von zwei verschiedenen S-Proteinen, die entsprechend der Anzahl ihrer AS als S107 und S105 bezeichnet werden und nicht nur unterschiedliche, sondern sogar entgegengesetzte Funktionen haben. Das kürzere S105-Protein ist das letale Genprodukt, während das längere S107-Protein als Inhibitor von S105 fungiert. Im Hinblick auf die entgegengesetzten Funktionen von S107 und S105 wäre es logisch, die Lochentstehung über eine zeitliche Modulation des Verhältnisses der beiden Genprodukte zu regulieren. Die Isolierung kodominant-lysisdefekter Mutanten im Bereich der oben beschriebenen Sekundärstrukturen am 5'-Ende des S-Gens zeigte jedoch, daß das Verhältnis der beiden Holinprodukte zueinander während der Expressionsphase der späten Gene mit Hilfe dieser Strukturen konstant auf einem Wert von S105:S107 = 2-3:1 gehalten wird [Chang et al., 1993].

Das Modell von Raab et al. erklärt noch nicht, warum das Loch in der Membran nicht bereits zu einem früheren Zeitpunkt gebildet wird. Ebenfalls auf der Grundlage von Mutationsanalysen gelang es, ein ergänzendes Modell zu entwickeln [Johnson-Boaz und Young, 1994; Chang et al., 1995]. Es besagt, daß das S-Protein während der Expressionsphase der späten Gene in der Cytoplasmamembran akkumuliert und dort die sogenannten „Preholes“ bildet (**Abb. 4.A.4.**). Dabei handelt es sich um Aggregate, die noch keine richtigen Löcher darstellen, aber dennoch den Durchlaß von Protonen durch die Membran bewirken. Für den Wirt wird es dann im Laufe der Zeit immer schwieriger, das normale Membranpotential aufrecht zu erhalten. Die Kollabierung des Membranpotentials führt schließlich zur Bildung der echten Löcher in der Membran, die dem Endolysin den Zugang zur Peptidoglycanschicht ermöglichen.

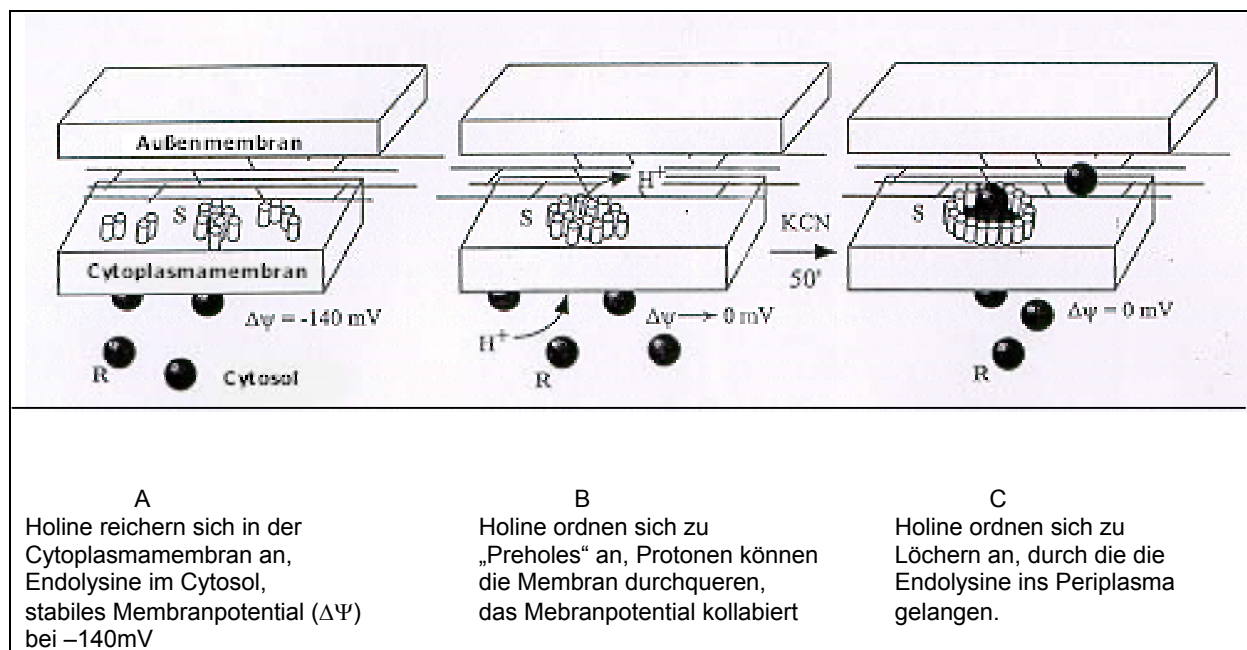


Abb. 4.A.4.: Modell der Holin-Funktion (modifiziert nach [Smith, 1998])
Holine sind als Zylinder dargestellt, die in die Cytoplasmamembran eingebettet sind, Endolysine (R) als dunkle Punkte.

Es wurde gezeigt, daß die einzelnen Gene der Kassette der Phagen P22 und λ sich unter Laborbedingungen gegenseitig komplementieren können [Rennell und Poteete, 1985]. Ob in der Natur evt. sogar ein Austausch der Lysingene erfolgt, sollte Teil der folgenden Untersuchungen sein.

Zu Beginn dieser Arbeit waren folgende Allele der verschiedenen Lysisgene innerhalb der Familie der lambdoiden Phagen bekannt (**Abb. 4.A.5.**):

- Gen 15 zeigt eine mosaikartige Struktur innerhalb der Phagen P22, Phage 21 und λ , trotzdem beträgt die Gesamtübereinstimmung auf DNA-Ebene zwischen den drei Phagen ca. 70 %. Da sich diese Unterschiede durchaus mutativ erklären lassen, werden die bekannten Formen des Gens im Folgenden als ein Allel angesehen.

- Für Gen 19 existieren drei verschiedene Allele:
 - a) Gen 19_{P22} (gp = Lysozym)
 - b) Gen R_λ (gp = Transglykosylase)
 - c) Gen $R_{\text{Phage 21}}$ (gp = Lysozym)

- Für Gen 13 sind zwei Allele bekannt:
 - a) Gen 13_{P22} zeigt zum Gen S_λ eine Übereinstimmung von 89 % auf Nukleotidebene und wird somit als das gleiche Allel aufgefaßt.
 - b) Gen $S_{\text{Phage 21}}$

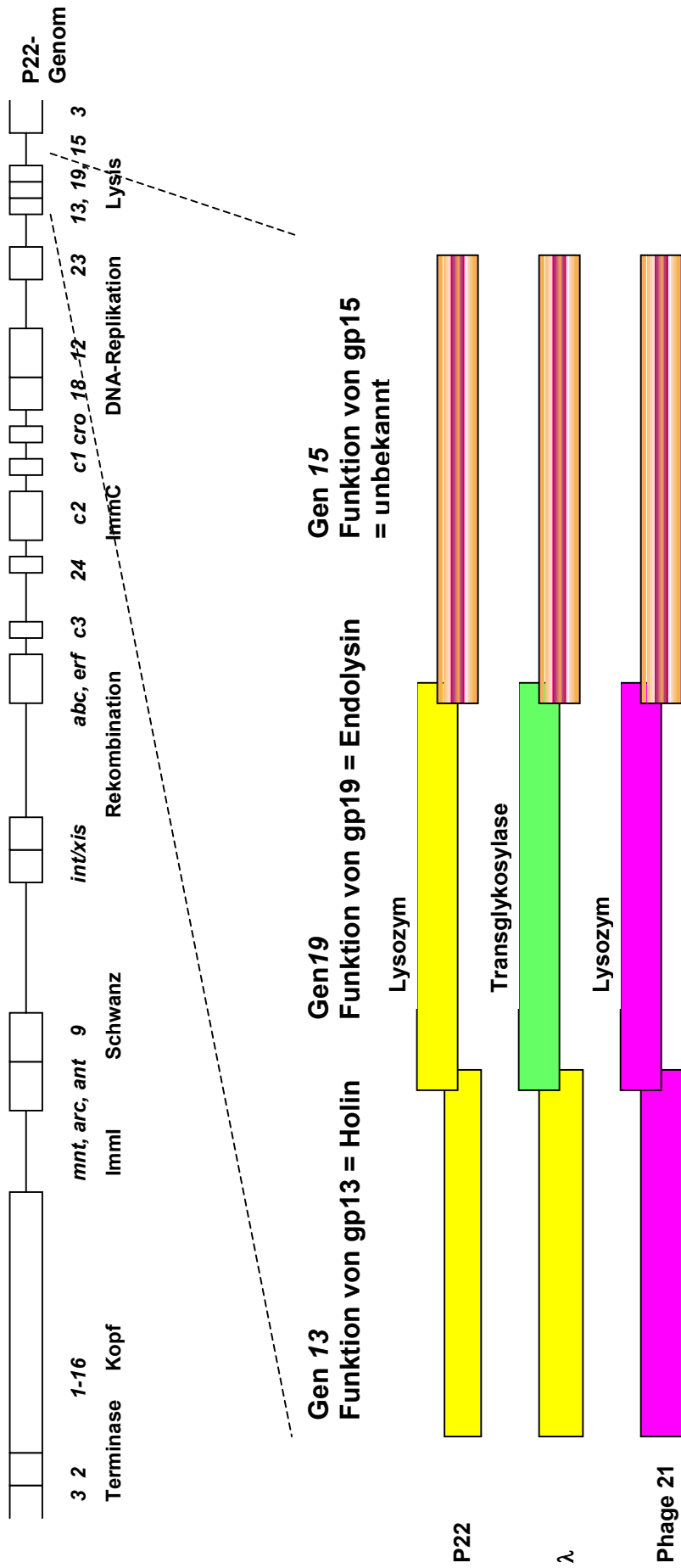


Abb. 4.A.5.: Lysisenkassetten lambdaoider Phagen – Stand zu Beginn dieser Arbeit
 Dargestellt sind die bis dahin bekannten Lysisenmodule der lambdaoiden Phagen P22, λ und Phage 21

4.A.2 Untersuchung der Lysisgene von 46 Phagen aus Naturisolaten von *Salmonella typhimurium*

In vorangegangenen Untersuchungen von Schicklmaier zur Verbreitung und Charakterisierung von Bakteriophagen in Naturisolaten von *Salmonella typhimurium* [Schicklmaier, 1995; Schicklmaier, 1999] wurden 57 Phagen mittels Hybridisierungsexperimenten bzgl. ihrer Genomzusammensetzung untersucht (vgl. **Abb. 1.6.**). Dabei zeigten 46 Phagen Abweichungen zu den bekannten Lysisgenen der Phagen P22 und λ . Da es sich bei den Lysisgenen um essentielle Gene handelt, mußten besagte Phagen andere Allele besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Phagen auf die Zusammensetzung ihrer Lysisgenkassette getestet. Die Modulzusammensetzung der 46 Phagen ist in **Abb. 4.A.6.** noch einmal detailliert dargestellt.

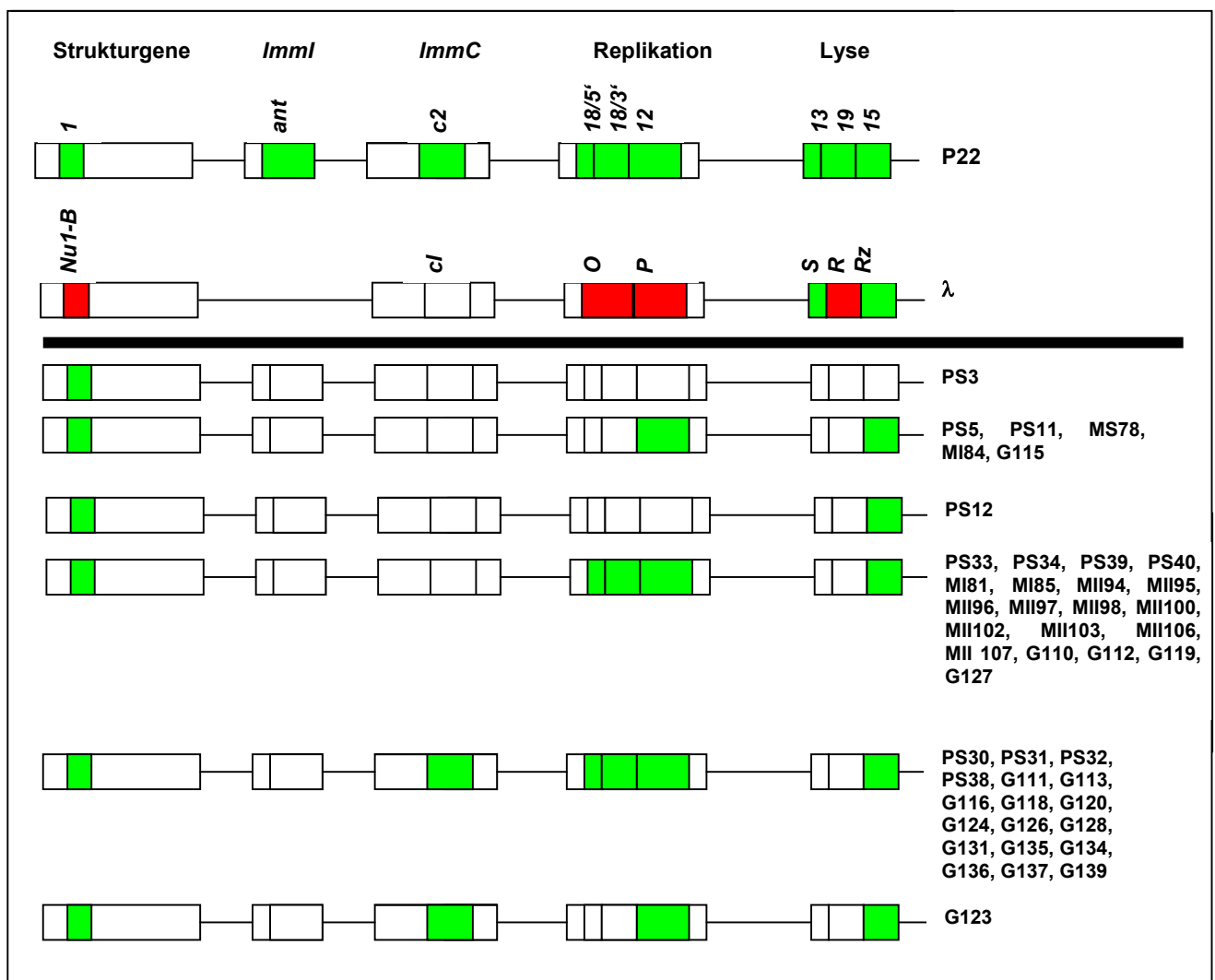


Abb. 4.A.6.: Modulaufbau der 46 Phagen Genome mit unidentifizierten Lysigenen (modifiziert nach [Schicklmaier, 1995; Schicklmaier, 1999])

Der Lysisgenbereich wurde anhand von *Southern*- oder *Dot-Blots* der Phagen-DNA mit den bereits in **3.A.1.** beschriebenen Hybridisierungssonden Z1 (Gen 13_{P22}), Z2 (Gen 19_{P22}), S3 (R_{λ}) und S11 (Gen 15_{P22}) überprüft. Die hierbei zum Teil abweichenden Ergebnisse im Vergleich zu den Untersuchungen von Schicklmaier sind auf den Einsatz unterschiedlicher Hybridisierungssonden aus verschiedenen Bereichen des jeweiligen Gens zurückzuführen.

Abb. 4.A.7. zeigt schematisch die Vorgehensweise, die schließlich zur Aufklärung der Zusammensetzung der Lysisgenkassette der 46 Phagen führte.

Für alle untersuchten Phagen werden im Folgenden die Genbezeichnungen von P22 übernommen.

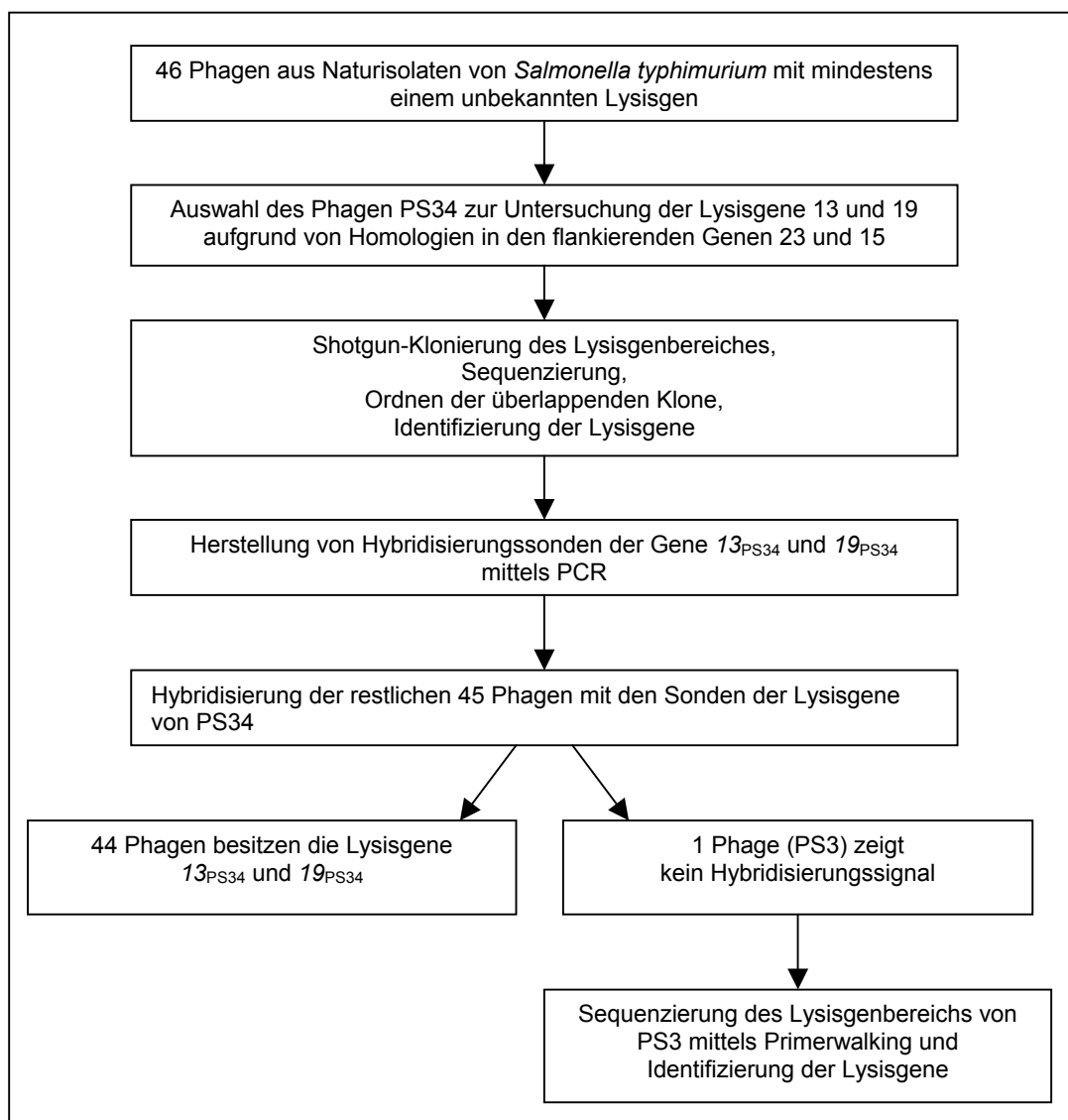


Abb. 4.A.7.: Versuchsablauf zur Aufklärung der Lysigene der 46 untersuchten *Salmonella*-Phagen

4.A.2.1. Identifizierung der Lysigene des Phagen PS34

Von den 46 zu prüfenden Phagen wurde zunächst der Phage PS34 zur Identifikation der Lysigene herangezogen. Durch Hybridisierung von *Southern-Blots* der Phagen-DNA mit den Sonden Z20 (Gen 23_{P22}) und S11 (Gen 15_{ES18}) zeigte sich, daß die DNA von PS34 Ähnlichkeit mit den Genen 15_{P22} und 23_{P22} besitzt, die die beiden Lysigene 13 und 19 flankieren. Die Hybridisierung der *EcoRI*-behandelten DNA von PS34 mit den beiden Sonden Z20 und S11 lieferte in beiden Fällen ein Signal mit einem ca. 6 kb großen Fragment. Daher konnte davon ausgegangen werden, daß sich auch die Lysigene auf diesem Fragment befanden. Eine Klonierung des vollständigen Bereiches oder einzelner Lysigene war ohne weiteres nicht möglich, da die Lysigene für die Wirtszelle letal sind. Deshalb wurde eine *Shotgun*-Klonierung des 6 kb-*EcoRI*-Fragmentes mit überlappenden Plasmidinserts durchgeführt. Dazu wurde das 6 kb-Fragment zunächst mit *TaqI* gespalten und die entstandenen Subfragmente in die *AccI*-Schnittstelle des Vektors pIC20H ligiert. Die Inserts der daraus resultierenden Plasmide pAA1/1 – pAA1/26 wurden sequenziert. Da Fragmente mit gleichen Schnittstellen identische Enden besitzen und nicht überlappen, können sie nicht geordnet werden. Um überlappende Sequenzen zu erhalten, wurde analog ein *HpaII*-Verdau des 6 kb-*EcoRI*-Fragmentes durchgeführt und die resultierenden Subfragmente in die *AccI*-Schnittstelle des Vektors pIC19H ligiert. Nach Sequenzierung der Inserts der daraus entstandenen Plasmide pAA5/1 – 5/16 konnten anhand der Überlappungsbereiche mit den Inserts von pAA1/1 – pAA1/26 die Sequenzen teilweise geordnet werden. Zunächst konnten auf diese Art drei größere Fragmente (34.1, 34.3, 34.4) identifiziert werden, die jedoch alleine an Hand der isolierten und sequenzierten Plasmidinserts nicht zu einer zusammenhängenden Sequenz zusammengefügt werden konnten (**Abb. 4.A.8.**).

Die Lage der Sequenzfragmente 34.1, 34.3 und 34.4 zueinander konnte aufgrund von Ähnlichkeiten zum P22-Genom festgelegt werden. Die Lage des Inserts von Plasmid 1/15 konnte ebenfalls an Hand von Übereinstimmungen zu Gen 23 von P22 bestimmt werden. Zur besseren Übersicht wird dieses Insert im Folgenden als Fragment 34.2 bezeichnet. Zur Schließung der noch vorhandenen Lücken zwischen den einzelnen Fragmenten wurden mittels der bekannten Sequenzen acht Primer ausgewählt, die sich jeweils an den Endabschnitten der Fragmente befanden. Diese Primer wurden jeweils nach dem Fragment, von dem sie abstammten, benannt und zusätzlich durch F (*Forward*) bzw. R (*Reverse*) gekennzeichnet, abhängig von der Richtung, in die sequenziert werden sollte. Die Lage der Primer ist in **Abb. 4.A.8.** eingezeichnet. Sequenziert wurde die Gesamt-DNA des freien Phagen.

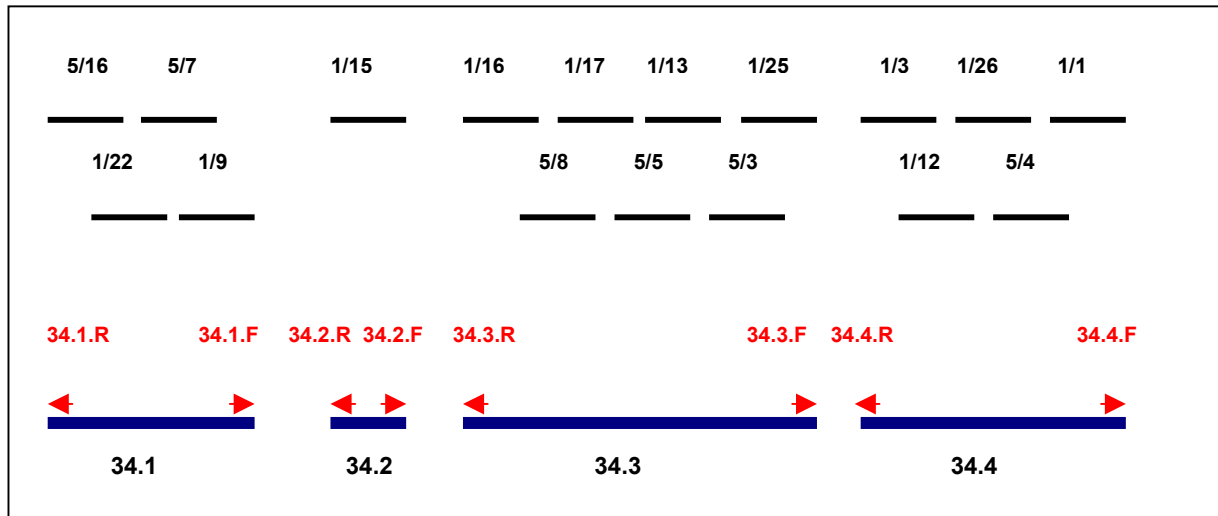


Abb. 4.A.8.: Lage der *TaqI*- und *HpaII*-Fragmente innerhalb der Fragmente 34.1 – 34.4
 Dargestellt ist die Orientierung der einzelnen Klone zueinander und die Lage der Primer, die zum Sequenzieren der noch offenen Übergänge zwischen den Fragmenten 34.1 – 34.4 ausgewählt wurden. Die Größe der einzelnen Fragmente ist nicht maßstabgetreu, so daß an Hand dieser Abbildung keine Aussage über die tatsächliche Größe der Inserts gemacht wird. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 2.5. aufgeführt.

Die neuen Sequenzen konnten anhand von Überlappungen miteinander und mit den bereits vorhandenen Fragmenten eingefügt werden. Insgesamt wurde auf diese Art eine zusammenhängende Region von 6.709 bp sequenziert. In diesem Bereich konnten verschiedene **ORFs** (*Open Reading Frames*) identifiziert werden, die im Folgenden aufgrund ihrer analogen Lage im P22-Genom mit den Genbezeichnungen von P22 versehen werden. Es handelt sich hierbei um die ORFs des Gens 23, der Lysigene 13, 19 und 15, des Gens 3 sowie eines Teil des Gens 2. Die Gene 23, 2 und 3 gehören nicht zur Lysisgenkassette. Ihre Produkte sind an der DNA-Verpackung bei der Phagen-Reifung beteiligt. Die Zuordnung der ORFs der Gene 23, 15, 3 und 2 erfolgte außerdem aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu den entsprechenden Genen von P22. Dies bestätigte die Richtigkeit der Annahme der Positionsgleichheit der einzelnen Gene in den Phagen P22 und PS34. Die Lage der einzelnen Gene und ihre Aminosäuresequenzen sind in der Gesamtsequenz (**Abb. 4.A.9.**) eingezeichnet.

GGCACCAATG	GTGTTTCAGA	TGTGAGCGGT	CGCCAGTAGG	TAATTTCCCG	CTGCCAGAGA	60
CGAAGGAGGA	CGTATGGCAC	GACAGCGACG	AAGTATCACC	GACATAATCT	GCGAAAACCTG	120
CAAATACCTT	CCAACGAAAC	GTTCCAGAAA	TAAACGCAAG	CCAATCCCAA	AAGAGTCTGA	180
CGTAAAAACC	TTCAATTACA	CGGCTCACCT	GTGGGATATC	CGGTGGCTAA	GACATCGTGC	240
GAGGAAATGA	CAATGGATTA	TTCACAGTTA	AGTGATTTTG	AAATTAACAA	GCGAGTCGCG	300
ATAGCGACAG	GGCATAAGAA	GTTTAACGGC	CTGGGATGGC	AAGGGACACA	AGAAGACAGT	360
TGTAGCGCAG	TGATAGTAAG	AGGTCCAAC	AAAATAGGCG	CGTTTGACCC	ATGTAATAAC	420
CCGGCAGACG	CATGGCCGAT	TATTGAGAAA	TACAGAATTT	CTTTCTTAGA	CCAGTTAACT	480
GAATGGTGTG	TAGATGCAAA	AGGCGTGAGT	CCAATATTTG	ATATCAGACC	TCTCCGCGCC	540
GCCATGATTG	TCTTTCTCCT	GATGCAGGAC	GCCAATAATG	CTTAGCCCAT	CACAATCCCT	600
TCAATACCAG	AAAGAAAGCG	TCGAGCGGGC	TTTAACGTGC	GCTAACTGCG	GTCAGAAGCT	660
GCATGTGCTG	GAAGTTTCATG	TATGTGAAGC	GTGCTGCGCA	GAAGTATGA	GCGATCCGAA	720
TAGCTCAATG	TTTCAGGAAG	AAGACGATGG	CTAAATCAGC	GCGAAGACGA	TGCAAAAACG	780
AAGAATGTAG	GGAATGTTTC	ACCCTGCATT	CGCTAATCAG	TGGTGGTGCT	CTCCAGAGTG	840
TGGAACCAAG	ATAGCACTCG	AACGACGAAG	CAAAGAGCGC	GAAAAAGCAG	AAAAAGCAGC	900
AGAGAAGAAA	CGACGACGAG	AGGAGCAAAA	ACAGAAAGAT	AAACTGAAGA	TTTCGAAAAC	960
CGCCTTAAAG	CCCCGCAGTT	ACTGGATTAA	ACAAGCCCAA	CAAGCCGTAA	ACGCCTTCAT	1020
CAGAGAAAAG	GACCCGACT	TACCATGTAT	CTCGTCGCGA	ACGCTCACGT	CTGCTCAGTG	1080
GGATGCCGGG	CATTACCGGA	CAACCGCTGC	GGCACCTCAG	CTCCGATTTG	ATGAAGCAA	1140
TATCCATAAG	CAATGCGTCG	TGTGCAATCA	ACACAAGAGC	GGGAACCTGG	TTCTTATATCG	1200
CGTGATGCTC	ATCGAGCGCA	TAGGGATTGC	AGCAGTAGAC	GAAATCGAAT	CTGACCATAA	1260
GCGGCTTCGC	TGGACTACCG	AAGAGTGCAA	AGCGATTAA	GCGGAGTATC	AGCAGAAGCT	1320
TAAAGACCTA	CGTGACAGCA	GAAGCGAGGC	AGCATGAGCA	AAATCCAATA	CCCAATGACC	1380
ACTGCGGCAA	TTTTTCATGA	TGTTGTCTAT	CCGCTGCATT	TCGACAATGC	CGGCAAGGTT	1440
AGGCAAGAAA	TGGAAGGCGC	TGTTATCTGG	TTCTGCAGTT	GGTGCAACGA	AGAGAAAAGC	1500
GCTGTGAAAG	CGAGATTGTT	GGTCAGTTGC	TGGGGTCAAT	ATCTGTGTCA	TGAGCAGGTT	1560
ATCCGGGAGG	CCGCATGACA	CACACTGTCA	AAACCATTCC	AGACATGCTC	ATAGAGACAT	1620
ATGGAAACCA	GACAGAAGTA	GCACGGCGCT	TATCGTGCCA	CCGCAACACA	GTCAGGCGTT	1680
ATCTGTACGA	CAAAGAAGCC	AGGTATCAGC	CCATCGTTAA	CGGCGTTTAA	ATGATTCATC	1740
AGGGCGGGAG	AGGTATTTAT	GACCGTAACC	AGCATTAACC	AGGCAAAAACA	GCAGCGTGAA	1800
CGTGACGAGG	CTGAATTACG	CAGCGTCAGA	GAGATGACGG	AGCAACACCA	GAAGCGGATG	1860
GATTATCTGA	ATGACGCGA	GCGTGAAC	GTGAACCGCG	TTGGATTGAA	CAAGCCGCGC	1920

Start 23

GGAGGCGATG	CTGC	ATGAGA	CTCGAAAGCG	TAGCTAAATT	TCATTCCGCA	AAAAGCCCGA	1980
		M R	L E S V	A K F	H S P	K S P M	
TGATGAGTGA	CTCACCGCGG	GCTACGGCTT	CTGACTCTCT	TTCCGGTACT	GATGTGATGG	2040	
M S D	S P R	A T A S	D S L	S G T	D V M A		
CTGCTATGGG	GATGGCGCAA	TCACAAGCCG	FATTCGGTAT	GGCTGCATTG	TGCGCAAGC	2100	
A M G	M A Q	S Q A G	G F G M	A A F	C G K H		
ACGAACTCAG	CCAGAATGAC	AAACAAAAGG	CTATCAACTA	TCTGATGCAA	TTTGCACACA	2160	
E L S	Q N D	K Q K A	I N Y	L M Q	F A H K		
AGGTATCGGG	GAAATATTGT	GGTGTGGCAA	AGCTCGAAGG	AAATACTAAG	GCAAAGGTAC	2220	
V S G	K Y C	G V A K	L E G	N T K	A K V L		
TGCAAGTGCT	CGCAACATTC	GCTTATGCGG	ATTATTGCCG	TAGTGCCGCG	ACTCCGGGCG	2280	
Q V L	A T F	A Y A D	Y C R	S A A	T P G A		
CAAGATGCAG	AAATTGCCAC	GGTACAGGCC	GTGCGGTTGA	TATAGCCAAA	ACAGAGCAGT	2340	
R C R	N C H	G T G R	A V D	I A K	T E Q W		
GGGGGAGAGT	TGTTGAGAAA	GAATGCGGAA	GATGCAAAGG	TGTCGGCTAT	TCAAGAATGC	2400	
G R V	V E K	E C G R	C K G	V G Y	S R M P		
CAGCAAGCGC	CGCATATCGC	GCTGTAACGA	TGCTAATCCC	AAACCTTACC	CAACCCACCT	2460	
A S A	A Y R	A V T M	L I P	N L T	Q P T W		
GGTCACGCAC	TGTTAAGCCG	CTGTATGACG	CTTTGGTGGT	GCAATGCCAC	AAGGAAGAGT	2520	
S R T	V K P	L Y D A	L V V	Q C H	K E E S		

Stop 23

CAATCGCAGA	CAATATTTTG	AATGCGGTCA	CGCGTTAA	TA	GCATGATTGC	TACGGATGGC	2580
I A D	N I L	N A V T	R ***				
AACATATTA	CAGCATGATA	TTGACTTTTT	GAATAAAGTT	GGGTAATTT	GACTCAACGA	2640	
TGGATAAATG	CACTCGTTAA	ATAAAGCCCT	GAGTTTAAAC	GCTCGGGGCA	TTTTGCGTTT	2700	
TAAACACGAC	ATTTCTGAAA	CGCCCTATC	ACCAATCACC	AGAACACATC	CAGATACCCCT	2760	
TGCTCATTCG	TGGCGACGGG	GTAGGGCGTT	TTACACAAAA	GAAAACCCAG	AACTATGGCT	2820	
GGGCTTCGTG	AAGATGGGTG	GCAAGAGGCT	TCGCTAACAA	CCTCCTGCCG	TTTTGCCCGT	2880	
GCATATCGGT	CACGAACAAA	TCTGATTACT	AAACACAGTA	GCCTGGATT	GTTCTATCAG	2940	

SD

Start 13

TAATCGACCT	TATTCCTAAT	TAAATAGAGC	AAATCCCCTC	TAT	GAAGGG	TAGAGC	ATGT	3000
------------	------------	------------	------------	-----	---------------	---------------	-------------	-------------

ATGTTTCGAGC	GTAATCATCG	TCAGCCCCTT	ATCGAAGAAC	AGCACCGCCT	GGCGGCCTAA	5100
GCTACGGAAA	TAGCTTCGAG	AGCCACTTTC	ACAACGGCTC	TCCATTACAA	AGCCTATCTA	5160
CGGGTGGGCT	TGATAATGAA	ACCGGAGTTA	ATTTCTGGTC	ACTAATTAAC	GGCAGTACCG	5220
CGAAACAACC	CAAGCCAGTA	AGTGGGGAAA	TAACACTGGC	AGCCACTGAA	AGATGAACCT	5280
CCTGCCTTAT	GGCAAAAAAG	ATTCTTTGTG	GTGGCGGACT	GATGGAAAAG	CATCGGTTAT	5340
TGCAGAGGCC	ATTCAATGAG	TGGTCTAGAC	AATGGCTTAT	CCCAACAACC	GGAGCCAAAA	5400
CAATGGCAGA	GATTATTCCC	ATGACTGAAG	AACAGAAAT	CCAGTTAGAG	ATTTACAAAC	5460
TGGTCATGAA	CCAGAACGCA	GCCGCAGAGG	AAGCATTTCA	ATTCATTGGC	ACTGACGAAC	5520
TGAAGCTTGA	GCTATTCAAA	ATTCACTTCC	AGTCAGGCGG	CGCTAATTCG	GATATCACGA	5580
TCCGCACATT	CGAAGCAGTG	CGTAAATCTA	AGGAAGCGTT	AGACCTGTTC	ACTACCGGAG	5640
CATGATGTGA	GTTGCGTAAT	CAATTTGGGT	AAGGAGAAGA	AATTCCCAAT	TACTCAAGAG	5700
CTATACGAGC	GGCTGGAAAG	CGTCATTCAAT	TATTACGATG	GTGAAATCAG	TTTATGTGAG	5760
GCAGTTGGCA	CACTCGAATT	GCTGAAGCAG	TTATTGATTG	AAGGCGCGAA	AGAGCAATCA	5820
			Start 3			
ACCTGAAATA	ACAATTAAGT	GAGACGAATA	<u>TGGCAGCACC</u>	<u>AAAGGGCAAC</u>	<u>CGATTTTGGG</u>	5880
			M	A	A	P
			K	G	N	R
			F	W	E	
AGGCCCGCAG	TAGTCATGGG	CGAAACCCTA	<u>AAATTCGAATC</u>	<u>GCCTGAGGCG</u>	<u>CTGTGGGCTG</u>	5940
A	R	S	S	H	G	R
N	P	K	F	E	S	P
E	A	L	W	A	A	
CTTGTGTGTA	ATACTTCGAG	TGGGTGGAAG	<u>CTAACCCACT</u>	<u>ATGGGAGATG</u>	<u>AAGGCTTCT</u>	6000
C	C	E	Y	F	E	W
V	E	A	N	P	L	W
E	M	K	A	F	S	
CATATCAGGG	AGAAGTTACA	CAAGAGCCTA	<u>TCGCCAAGAT</u>	<u>GAGGGCAATG</u>	<u>ACCATCACTG</u>	6060
Y	Q	G	E	V	T	Q
E	P	I	A	K	M	R
A	M	T	I	T	G	
GGCTAACGCT	ATTCCTCGAT	GTGACGCTTG	<u>AAACATGGCG</u>	<u>CACATATCGA</u>	<u>ATGCGAGAAG</u>	6120
L	T	L	F	L	D	V
T	L	E	T	W	R	T
Y	R	M	R	E	D	
ATTTATCTGA	GGTCTTACG	CGAGCAGAGC	<u>AAATCACTA</u>	<u>CGACCAGAAA</u>	<u>TTCTCCGGCG</u>	6180
L	S	E	V	V	T	R
A	E	Q	I	I	Y	D
Q	K	F	S	G	A	
CAGCCGCTGA	CCTTCTCAAC	GCTAACATCA	<u>TAGCCCGTGA</u>	<u>TTTGGGCCTC</u>	<u>AAAGAGCAGT</u>	6240
A	A	D	L	L	N	A
N	I	I	A	R	D	L
G	L	K	E	Q	S	
CGCAAGTTGA	AGACGTGACA	CCTGATAAGG	<u>GAGATCGCGA</u>	<u>TAAGCGCCGC</u>	<u>TCTCGTATCA</u>	6300
Q	V	E	D	V	T	P
D	K	G	D	R	D	K
R	R	S	R	I	K	
			Stop 3			
			Start 2			
AGGAGCTATT	<u>CAACCGTGA</u>	<u>ACTGGACGCG</u>	<u>ATTCTTGATA</u>	<u>ACCTGAGCGA</u>	<u>CGAAGAGCAA</u>	6360
E	L	F	N	R	G	T
G	R	D	S	***		
			V	E	L	D
			A	I	L	D
			N	L	S	D
			E	E	Q	
ATCGAATTGC	TCGAGCTACT	CGAAGAAGAA	<u>GAGAACTACC</u>	<u>GGAACACACA</u>	<u>CCTGCTATAT</u>	6420
I	E	L	L	E	L	L
E	E	E	E	N	Y	R
N	T	H	L	L	Y	
GAATTTACGC	CATACAGCAA	ACAGCGTGAG	<u>TTCATAGACG</u>	<u>CCGGGCATGA</u>	<u>CTATCCAGAG</u>	6480
E	F	T	P	Y	S	K
Q	R	E	F	I	D	A
G	H	D	Y	P	E	
CGATGTTTTA	TGGCTGGTAA	CCAGCTTGGT	<u>AAGTCATTTA</u>	<u>CTGGCGCTGC</u>	<u>TGAAGTCGCG</u>	6540
R	C	F	M	A	G	N
Q	L	G	K	S	F	T
G	A	A	E	V	A	
TTTCACCTTA	CAGGGCGATA	CCCGGGAACG	<u>AAAGGTTATC</u>	<u>CTGCTGATGG</u>	<u>CAAATATGGC</u>	6600
F	H	L	T	G	R	Y
P	G	T	K	G	Y	P
A	D	G	K	Y	G	
GGAGAGTGG	AAGGTAAGCG	TTTCTATGAG	<u>CCAGTGTCT</u>	<u>TCTGGATTGG</u>	<u>CGGTGAAACA</u>	6660
G	E	W	K	G	K	R
F	Y	E	P	V	V	F
W	I	G	G	E	T	
AACGAGACTG	TAACCAAAAC	GACTCAACGC	<u>ATCCTGTGCG</u>	<u>GGCGTATCG</u>		
N	E	T	V	T	K	T
T	Q	R	I	L	C	G
R	I					

Abb. 4.A.9.: Sequenzierter Bereich von PS34
 Die Gene 23, 13, 19, 15, 3 und der sequenzierte Teil von Gen 2 sind farbig unterlegt, die jeweiligen Start- und Stopcodons unterstrichen. Die vermeintlichen Shine-Dalgarno-Sequenzen der Gene 13, 19 und 15 sind rot dargestellt. In den codierenden Bereichen der Gene ist die Aminosäuresequenz im 1-Buchstabencode angegeben.

4.A.2.2. Homologien des sequenzierten 6,7 kb-Bereichs von PS34 zu P22, λ und Phage 21

Der sequenzierte 6709 bp große Bereich von PS34 zeigt über weite Strecken große Ähnlichkeit zu P22 (**Abb. 4.A.10.**). An dieser Stelle muß noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die im Folgenden verwendeten Genbezeichnungen 23, 13, 19, 15, 3 und 2 lediglich aufgrund der Lage ihrer jeweiligen ORFs zu analogen Positionen der ORFs der Gene von P22 eingesetzt werden. Innerhalb der ersten 2950 Basen von PS34 besteht eine Übereinstimmung von 97 % mit P22. In dieser Region liegt der Leserahmen für das **Gen 23**, das eine 94-prozentige Übereinstimmung zu P22 aufweist. Kurz vor Beginn des ORFs von Gen 13 endet die Ähnlichkeit zu P22.

Der unmittelbar vor Gen 13 liegende Bereich von PS34 (200 bp) zeigt starke Ähnlichkeit zu λ (80 %). Dieser Bereich entspricht der Region, in der die Homologie zu P22 endet. Hier liegen die sogenannten *chi*-ähnlichen Sequenzen von λ , auf deren Rolle als mögliche Rekombinationspunkte in der Diskussion noch näher eingegangen wird.

Dort, wo aufgrund der Positionsgleichheit der ORFs **Gen 13** erwartet wird, konnten weder auf Nukleotid- noch auf Proteinebene Homologien zu einem der bekannten Holine der lambdaoiden Phagen nachgewiesen werden. Da es sich bei Gen 13 um ein essentielles Gen handelt, muß davon ausgegangen werden, daß es sich hierbei um ein neues, bisher noch nicht bekanntes Holingen handelt. Ein Datenbank-Vergleich mit dem Computerprogramm "*Blast*" [Altschul, S. et al., 1990] auf Proteinebene ergab sowohl eine Ähnlichkeit zu dem holin-analogen regA-Protein von *Serratia marcescens* (30%) als auch eine Übereinstimmung mit einer Holinprotein-Sequenz in *Haemophilus somnus* (32 %) (**Abb.4.A.11.**).

Auch **Gen 19** stellt für den P22-Ast der lambdaoiden Familie ein neues Gen dar. Es ist nahezu identisch mit Gen $R_{\text{Phage 21}}$, zu dem die Homologie auf Nukleotidebene 90 % beträgt. Bislang wurde dieses Gen, dessen gp ein Lysozym darstellt, lediglich beim Phagen 21, einem Vertreter des λ -Astes der Familie, gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieses Gen 19 zum ersten Mal bei einem Phagen des P22-Astes nachgewiesen werden.

Mit geringfügigen Abweichungen besitzt PS34 ebenfalls das bereits bekannte Allel des **Gens 15**, das auch in P22, Phage 21 und λ vorhanden ist. Die Gesamthomologie zu P22 beträgt 95%.

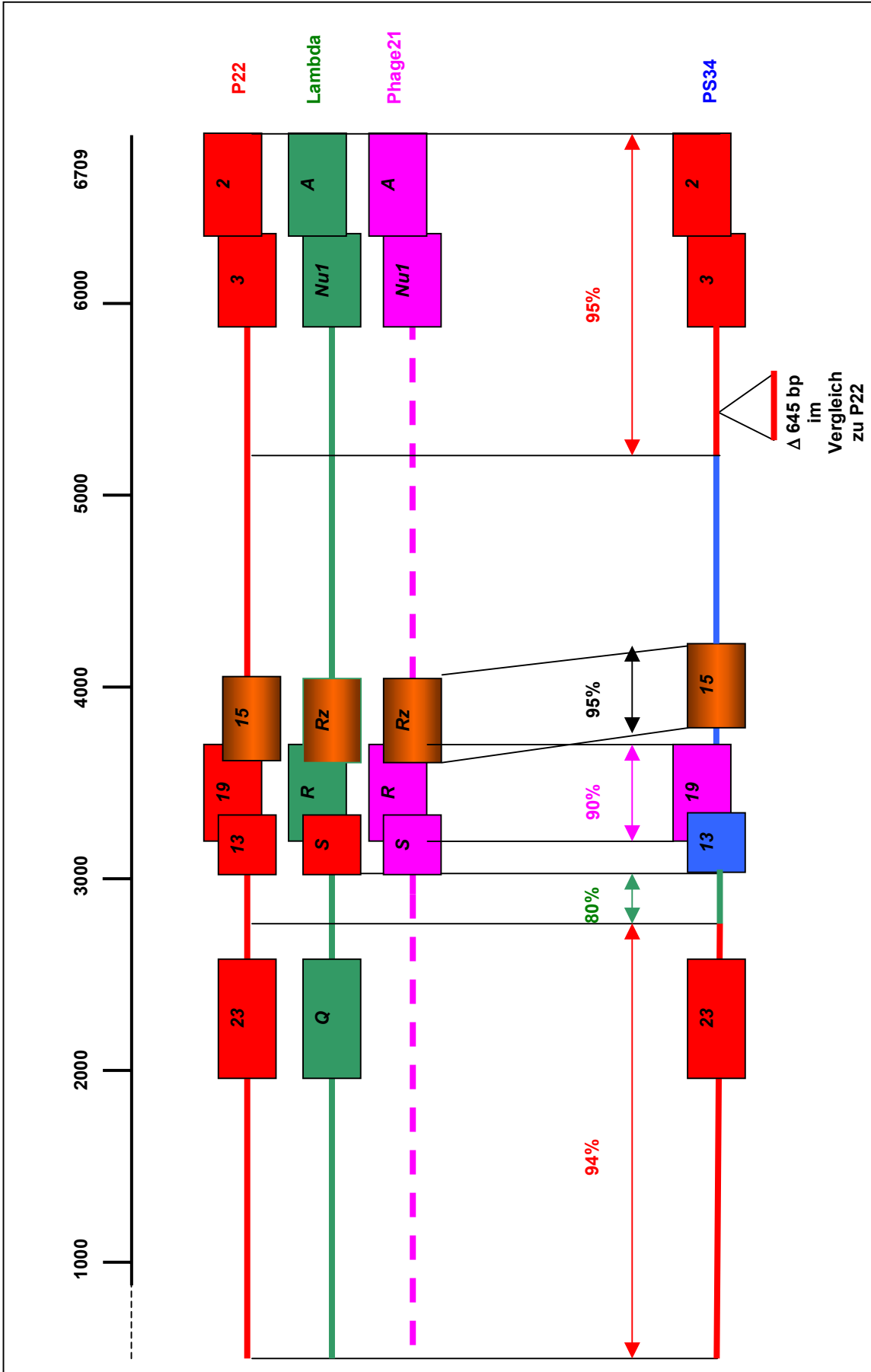


Abb. 4.A.10.: Homologien des sequenzierten Bereichs von PS34 zu P22, Phage 21 und λ . Die charakteristischen Sequenzbereiche der einzelnen Phagen sind farblich gekennzeichnet. Über die gestrichelt dargestellten Bereiche des Phagen 21 bestehen keinerlei Sequenzinformationen.

A)	
PS34/gp13	4 MDKIREWFSYSGGLTAMGGILSLNDWAVIIGILCTVGTFGINWYYKRK 52
	M+KI + +Y+ A G LS D A ++G +GTF +NWYY+RK
<i>S. marcescens</i> /gp recA	16 MEKITSFIYYAMALFLAWLCKLSPODIAFLVGAAVGEGTFLVNWYYRRK 64
B)	
PS34/gp13	2 VRMDKIREWFYSYSGGLTAMGGILSLNDWAVIIGILCTVGTFGINWYYKRKE 53
	+ M K E G A+ +L DWA I GIL + T INWYYK KE
<i>H. somnus</i> / Holin-Protein <i>Orf6</i>	3 FNMLKNSETTGAYVGSAAIAYSGFTLADWAAIFGILFGLFTMLINWYYKNKE 54

Abb. 4.A.11.: Datenbankvergleich von Gen 13_{PS34}
 Dargestellt sind jeweils Auszüge der AS-Sequenzen der Genprodukte.
 IA: identische AS
 IA: AS mit ähnlichen Eigenschaften

Im Gegensatz zu den bekannten Lysisgenen der Phagen P22, λ und Phage 21 besitzen die drei Lysisgene von PS34 nur zum Teil überlappende Leserahmen. Man findet diese nur bei den Genen 13 und 19. Das Startcodon für Gen 15 beginnt erst 99 bp nach dem Stopcodon für Gen 19. Tatsächlich findet sich für Gen 15 innerhalb dieses Spacerbereichs auch eine zweite, eigene Shine-Dalgarno-Sequenz (siehe **Abb. 4.A.9.**).

Stromabwärts von Gen 15 besteht zunächst über ca. 1000 bp keine Homologie zu einem der drei Standardphagen P22, λ oder Phage 21. Erst dann ist der Phage PS34 wieder über 186 bp homolog zu P22 (95 %). Es folgt in PS34 im Vergleich zu P22 eine Deletion von 645 bp. Im Anschluß daran sind die Sequenzen von P22 und PS34 über Gen 3 (94 % Homologie) in Gen 2 (96 % Homologie innerhalb der ersten 393 Basen) homolog bis zum Ende des sequenzierten Bereiches. Die Gesamthomologie in dieser Region beträgt 95 %.

Über die unmittelbar an die Lysisgene angrenzenden Regionen des Phagen 21 existieren keinerlei Sequenzinformationen.

Abb. 4.A.12. zeigt die Übergänge zwischen homologen und nicht-homologen Sequenzen zwischen PS34 und den Phagen P22 und Phage 21 im Bereich der Lysisgene.

A) Homologien zwischen PS34, P22 und λ zwischen Gen 23 und 13:

	Gen 23					
PS34	CGGTCACGCG TTAATAGCAT	GATTGCTACG	GATGGCAACA	TATTAACAGC	ATGATATTGA	
P22	CGGTCACGCG TTAATAGCAT	GATTGCCACG	GATGGCAACA	TATTAACAGC	ATGATATTGA	
PS34	CTTTTTGAAT AAAGTTGGGT	AAATTTGACT	CAACGA_TGG	ATAAATGCAC	TCGTAAATA	
P22	CTTTTTGAAT AAAGTTGGGT	AAATTTGACT	CAACGAATGG	ATAAATGCAC	TCGTAAATA	
λ	CCGTTGTGCT GAATTAAGCG	AATACCGGAA	GCAGAACCGG	ATCACCAAAT	GCGTACAGGC	
PS34	AAGCCCTGAG TTTAACCGCT	CGGGGCATTT	TGCGTTTTAA	GCACGACATT	TCTGAAAGCG	
P22	AAGCCCTGAG TTTAACCGCT	CGGGGCTTTT	TGCGTTTTAA	GCACGACACT	TCTGAAAGCG	
λ	GTCATCGCCG CCCAGCAACA	GCACAACCCA	AACTGAGCCG	TAGCCACTGT	CTGTCCTGAA	
PS34	CCCTATCACC AATCACCAGA	ACACATCCAG	ATACCCTTGC	TCATTCGTGG	CGACGGGGTA	
P22	CCCTATCACC AATCACCAGA	ACACATCCAG	ATACCCTTGC	TCATTCGTGG	CGACGGGGTA	
				<i>Chi-ähnliche Sequenzen</i>		
λ	TTCATTAGTA ATAGTTACGC	TGCGGCCTTT	TACACATGAC	CTTCGTGAAA	GCGGGTGGCA	
PS34	GGGCGTTTTA CACAAAAGAA	AACCCAGAAC	TATGGCTGGG	CTTCGTGAAG	ATGGGTGGCA	
P22	GGGCGTTTTA CACAAAAGAA	AACCCAGAAC	TATGGCTGG_	CTTCGTGAAG	ATGGGTGGCA	
λ	GGAGGTCGCG CTAACAACCT	CCTGCC_GTT	TTGCCCGTGC	ATATCGGTCA	CGAACAAATC	
PS34	AGAGGCTTCG CTAACAACCT	CCTGCC_GTT	TTGCCCGTGC	ATATCGGTCA	CGAACAAATC	
P22	AGAGACTGCG CTAACTGCCT	CTTGCCCTGAT	CTGCCCATGC	_TCTTAATCA	CGGACAAACC	
λ	T_GATTACT_ AAACACAGT	AGCCTGGATT	TGTTCTATCA	GTAATCGACC	TTATTCCTAA	
PS34	T_GATTACT_ AAACACAGT	AGCCTGGATT	TGTTCTATCA	GTAATCGACC	TTATTCCTAA	
P22	ACG_TTACCG CAA_A_T_GT	ATCCTGGATT	TGTTCTTTCC	AATATCAACC	AATTCATAAC	
			Gen 13			
λ	TTAAATAGAG CAAATCCCCT	TATTGGGGGT	AAGACATGAA	GATGCCAGAA	AAACATGACC	
PS34	TTAAATAGAG CAAATCCCCT	CTATGAAGGG	GTAGAGCATG	TACCGTATGG	ACAAAATCAG	
P22	ATTGAACAAA TCCTCACGGT	CGTGAGGTAA	GACATGAAAA	AGATGCCAGA	AAAACATGAT	
λ	TGTTGGCCGC CATTCTCGCG	GCAAAGGAAC	AAGGCAT...			
PS34	AGAATGGTTC AGTTACAGCT	TCGGAGGACT	GACTGCGATG	GGTGGCATTG	TCTCCCTGAA	
P22	CTGTTAACCG CCATGATGGC	GGCAAAGGAA	CAGGGCATCG	GGGCAATCCT	TGCGTTTGA	

B) Homologien zwischen PS34 und Phage 21 zwischen Gen 13 und 19:

	Gen 13				Gen 19
PS34	ACATTTGGCA TCAACTGGTA	CTACAAACGC	AAGGAGCGTG	AGGACAGATT	GAATGGCAAT
Phage 21	TGACAAATCT GTATTTCAA	ATCAGAGAAG	ACAGACGAAA	GGCTGCGAGA	GGTGAATAA
PS34	GTCACCGGCA GTACGAAATA	CGTAATAGC	GGCGATAAGT	GGCGGGGCTA	TTGCTATAGC
Phage 21	CCTCCATCA TTACGAAAAG	CCGTTGCTGC	TGCTATTGGT	GGCGGAGCAA	TTGCTATAGC
PS34	ATCTGTGTTA ATCACTGGCC	CCGGTGGTAA	CGATGGTCTG	GAAGGTGTCA	GATACAAAAC
Phage 21	ATCAGTGTTA ATCACTGGCC	CAAGTGGTAA	CGATGGTCTG	GAAGGTGTCA	GCTACATAAC

C) Homologien zwischen PS34 und Phage 21 im Bereich zwischen Gen 19 und 15:

Gen 19

PS34 **GGCGGTAAGC AATGGAAAGG CCTGATGACT CGTCGTGAGA TTGAGCGTGA AGTCTGTTTG**
 |||||
 Phage 21 **GGCGGTAAGC AATGGAAAGG TCTCATGACT CGTCGTGAGA TTGAGCGTGA AATCTGTTTG**

PS34 **TGGGGGCAGC AATGA**GCGTG ATTTGCTTTT TCATGGCAGC GTTGTTCGCA TTCAATGGCA
 |||||
 Phage 21 **TGGGGTCAGC AATGA** _____

PS34 ACGATGCGTG GCCGTGGTTT CTGTCCGTTG GGGTGTGAT GTC**ATG**AGTC GGTTAACCGC
 |||||
 Gen 15
 ACA GAGTAACCGC

Phage 21

PS34 **GATTATCTCC GCTCTGGTTA TCTGCATCAT CGTCTGCCAG TCATGGGCGG TTAATCATTA**
 |||||
 Phage 21 **GATTATCTCC GCTCTGGTTA TCTGCATCAT CGTCTGCCAG TCATGGGCTG TTAATCATTA**

D) Homologien zwischen PS34 und P22 im Bereich zwischen Gen 19 und 15:

Gen 19

PS34 **GGCGGTAAGC AATGGAAAGG CCTGATGACT CGTCGTGAGA TTGAGCGTGA AGTCTGTTTG**
 |||||
 P22 TCAACATAGG TAAATCAGCA TTTGCCGGCT CTACCGTTCT TCGCCAGTTG AATTAAAGA

PS34 **TGGGGGCAGC AATGA**GCGTG ATTTGCTTTT TCATGGCAGC GTTGTTCGCA TTCAATGGCA
 |||||
 P22 **ATTACCAGGC AGCAGCAGAT GCTTTCCTGT TATGGAAAAA AGCTGGTAAA GACCCTGATA**

PS34 ACGATGCGTG GCCGTGGTTT CTGTCCGTTG GGGTGTGAT GTC**ATG**AGTC GGTTAACCGC
 |||||
 Gen 15
 P22 **TCTCTCTCC ACGGAGGCGG CGAGAAAGAG CGCTGTCTT ATCCTGA**AGTC GTATTAAGGC

PS34 **GATTATCTCC GCTCTGGTTA TCTGCATCAT CGTCTGCCAG TCATGGGCGG TTAATCATTA**
 |||||
 P22 **AATTATTGCG TCTGTCATTA TCTGCATCAT CGTCTGTCTT TCGTGGGCTG TTAATCATTA**

E) Homologien zwischen PS34 und P22 im Endbereich von Gen 15:

Gen 15

PS34 CAAGATAACC GCGCAGGTTA ACTACCTGCA GGACTACATC AGGACACAAT GCCTGAAATA
 |||||
 P22 CAGGATAACC GCGCAGGTTA ACTACCTGCA GGAGTACATC AGGAGTCAGT GCTTAAAAATA

PS34 **A**TTTCCATCA CATAGAAATT TGACAAGTGA CTTTCATGAA AATGCCTCGT AATGCGGGG
 |||||
 P22 **A**TTTTAATTT CACTGAAATT TAACAAGTGA CTTTCAGGAA AATGCCTCGC AGATGCGGGG

PS34 TTTTTTATAT CCGCAGTAAA TCGCCTTCAC ACGCGTACT TCTGAACACA GAACCTTTCA
 |||||
 P22 CGTTTTTGTA TAGGTGTTTC ACCGCGCACC GCAGGCACA ACAACCACCG AACCTGACCC

PS34 GGATGACCTT TGAGGATGCC GGTGGTGA TCGGTGCCTT TCTGTGGGCC GGAATCGTGT
 |||||
 P22 TTTGGAATGG GCCTTTGAGG ATACCAGTTA GTGCTGGCGA GCCTCGGTGG GCTG

Abb. 4.A.12.: Übergänge zwischen homologen und nicht-homologen Bereichen zwischen PS34, P22, Phage 21 und λ
 Die Start und Stopcodons der einzelnen Gene sind rot markiert, homologe Basen sind durch senkrechte Striche markiert.

4.A.2.3. Überprüfung der Lysigene der restlichen 45 Phagen mit Hybridisierungssonden aus den Lysigenen des Phagen PS34

Nach Identifikation der Lysigene 13 und 19 des Phagen PS34 war es möglich, durch Auswahl geeigneter Primer mittels PCR Hybridisierungssonden von diesen Genen herzustellen (**Tab. 4.A.1.**). Im Anschluß daran wurden *Southern-Blots* der noch zu überprüfenden 45 Phagen mit den Sonden Z21 (Gen 13_{PS34}) und Z22 (Gen 19_{PS34}) hybridisiert.

Sonde	Gen (Abstammung)	Funktion/ Genprodukt	Größe (bp)	markiertes Fragment	Hybridisierungstemperatur (°C)
Z21	13 (PS34)	Lyse/Holin	207	PCR-Fragment aus PS34 mit den Primern 34/13-F1 und 34/13-R1	48
Z22	19 (PS34)	Lyse/Endolysin	501	PCR-Fragment aus PS34 mit den Primern 34/19-F1 und 34/13-R1	44

Tab. 4.A.1.: Hybridisierungssonden zur Analyse der Lysigene der restlichen 45 Phagen
Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in **Material und Methoden** unter Punkt 2.5. aufgeführt.

Dabei stellte sich heraus, daß 44 der 45 untersuchten Phagen mit beiden Sonden ein Hybridisierungssignal lieferten und demzufolge die gleiche Lysigenkassette besitzen wie der Phage PS34. Lediglich der Phage PS3 zeigte mit keiner der verwendeten Sonden ein Signal, so daß davon ausgegangen werden mußte, daß er neue, noch nicht identifizierte Allele der Lysigenkassette besitzt.

4.A.2.4. Identifizierung der Lysigene des Phagen PS3

Zur Identifikation der Lysigene von PS3 mußte zunächst ein Ansatzpunkt gefunden werden. Aufgrund der Positionsgleichheit von Genen mit analogen Funktionen im Genom der lambdoiden Phagen konnte davon ausgegangen werden, daß sich auch die Lysigene von PS3 in dem entsprechenden Genomabschnitt zwischen Gen 23 und Gen 3 befinden mußten. Aus diesem Grund wurde PS3 analog zu PS34 zunächst auf Homologien zu P22 in diesen benachbarten Regionen der Lysigene geprüft. Hybridisierungen von *Southern-Blots* mit den, bereits zur Identifizierung der Lysigene von PS34 verwendeten, Sonden Z20 (Gen 23_{P22}) und S11 (Gen 15_{ES18}) lieferten jedoch keine Signale mit PS3. Die einzige Hybri-

disierungs-sonde, mit der PS3 ein positives Signal ergab, umfaßte den Bereich des Struktur- gens 1_{P22} (S7). Zwischen Gen 1 und den Lysisgenen liegen bei P22 ca. 4.000 bp. Aufgrund des gleichartigen Genomaufbaus aller lambdoiden Phagen war anzunehmen, daß dieser Bereich bei PS3 eine ähnliche Größe einnimmt. Dies stellte für die Sequenzierung einen zu großen Bereich dar, der für die Identifizierung der Lysisgene nicht von Interesse war. Des- halb wurde zunächst nach einem anderen Ausgangspunkt für ein darauffolgendes *Primer- walking* gesucht. Da in dem rechts der Lysisgene gelegenen Bereich weitgehende Ähnlich- keiten zwischen den Phagen PS34 und P22 gefunden wurden (siehe Abschnitt 4.A.2.1.), lag die Vermutung nahe, daß zumindest ein Teil dieser homologen Sequenzen auch in PS3 existierte. Aus der Shotgun-Klonierung von PS34 stammende Plasmidinserts dieses Berei- ches und aus Gen 15 wurden deshalb als Sonden zur Hybridisierung (**Tab. 4.A.2.**) von *Sou- thern-blots* der Phagen-DNA von PS3 eingesetzt.

Sonde	Abstammung	Größe (bp)	markiertes Fragment	Hybridisierungs- temperatur (°C)
Z23	PS34	71	<i>Pst</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus Klon pAA 1/3	48
Z24	PS34	1617	<i>Pst</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus Klon pAA 5/4	48
Z25	PS34	288	<i>Pst</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus Klon pAA 5/3	48
Z26	PS34	474	<i>Pst</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus Klon pAA 1/12	48

Tab. 4.A.2.: Hybridisierungssonden zur Analyse von PS3
Die Sequenzen der verwendeten Primer (M13/pUC universal und revers) sind in **Ma- terial und Methoden** unter Punkt 2.5. aufgeführt.

In **Abb. 4.A.13.** ist die Lage der zur Hybridisierung verwendeten Sonden aus Gen 15 und dem Nachbarbereich der Lysisgene von PS34 dargestellt.

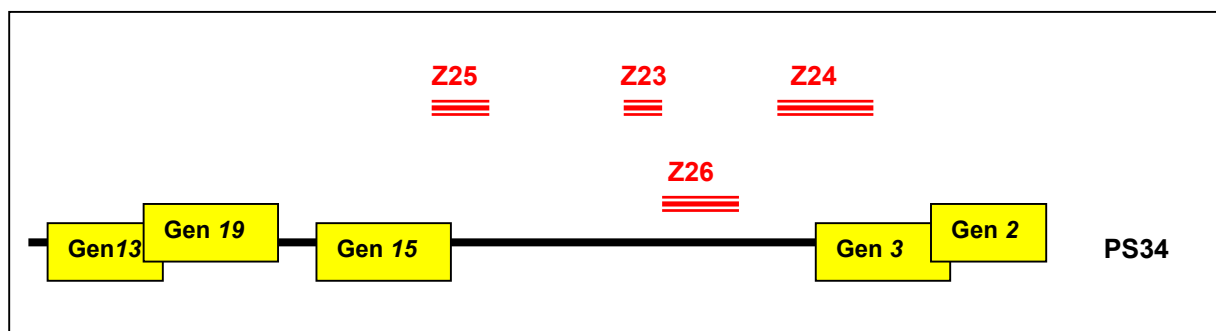


Abb. 4.A.13.: Lage der zur Analyse von PS3 verwendeten Hybridisierungssonden in PS34

Um ein Fragment geeigneter Größe zur Subklonierung zu identifizieren, wurden verschiedene Restriktionsenzyme zur Herstellung der *Southern-Blots* eingesetzt: *EcoRI*, *BamHI*, *Clal*, *HindIII*, *NdeI* und *StuI*. Als Positivkontrollen wurde jeweils ein *EcoRI*-Verdau der Phagen P22 und PS34 mitgeführt. Hybridisierungen mit den Sonden Z23 und Z25 lieferten keine Signale. Positive Ergebnisse lieferten die Hybridisierungen mit den Sonden Z24 und Z26. Zur anschließenden *Shotgun*-Klonierung wurde ein 4,5 kb großes *Clal*-Fragment ausgewählt, das Signale mit den beiden Sonden lieferte (**Abb. 4.A.14.**).

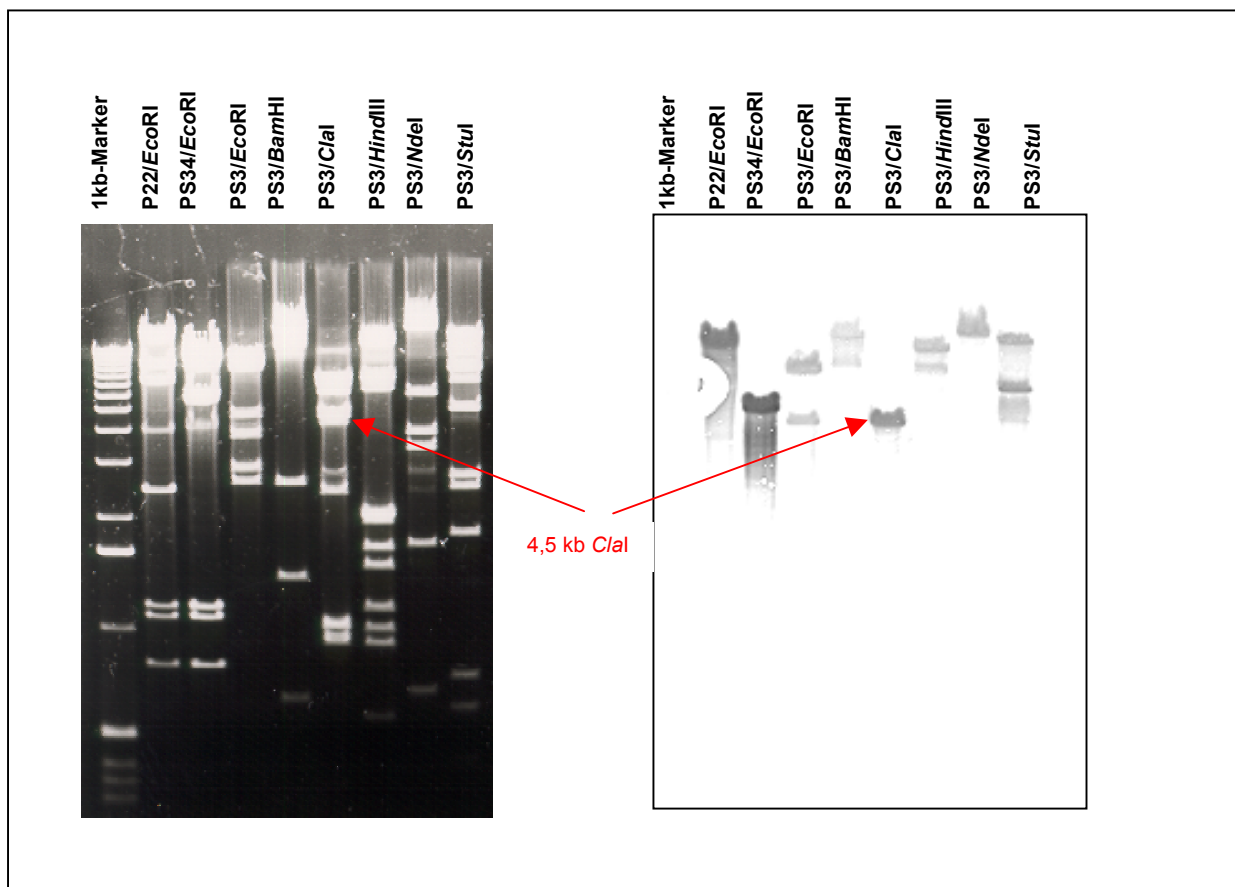


Abb. 4.A.14.: Hybridisierung verschiedener Restriktionen von PS3 zur Identifizierung eines Fragmentes geeigneter Größe zur anschließenden Subklonierung

Restriktionspaltung von PS3 mit verschiedenen Enzymen und der dazugehörige *Southern-Blot* nach Hybridisierung mit Sonde Z26. Als Größenstandard wurde der 1 kb-Marker aufgetragen, als positive Kontrollen *EcoRI*-restingierte DNA der Phagen P22 und PS34. Die Pfeile markieren die Lage des anschließend subklonierten *Clal*-Fragmentes von PS3.

Die Subklonierung des Fragmentes erfolgte analog zu den Experimenten in 4.A.2.1. mit

überlappenden *TaqI*- und *HpaI*-Klonen in die *Accl*-Schnittstelle des Vektors pIC20H. Die daraus erhaltenen Inserts der Plasmide pAA34/1 - 34/12 (*HpaI*) und pAA35/13 - 35/24 (*TaqI*) wurden im Anschluß sequenziert. Durch Vergleich der Sequenzen mit den entsprechenden Regionen von PS34 und P22 konnte schließlich eine Homologie zwischen dem Plasmidinsert von pAA34/12 und P22 bzw. PS34 nachgewiesen werden, die im Bereich von Gen 3 liegt (**Abb. 4.A.16.**). Von hier ausgehend wurde durch Auswahl geeigneter Primer aus der jeweils neuesten bekannten Sequenz ein *Primerwalking* in Richtung Lysogene durchgeführt. Außerdem wurde mit Hilfe eines weiteren Primers die Sequenz von Gen 3 in Richtung Gen 2 vervollständigt. Die Lage der einzelnen Primer ist in der Gesamtsequenz von PS3 (**Abb. 4.A.15.**) dargestellt. Insgesamt wurde ein Bereich von 3.563 bp sequenziert, in dem aufgrund ihrer Lage an anliegen Positionen im Genom von P22 ORFs der Gene 13, 19, 15, 3 sowie ein Teil des ORFs von Gen 2 identifiziert werden konnten.

TAGAGGGTAA	GCTGCCGTTA	GTGACTCTTA	AGTTGCAACG	GTGGCTTTTT	TATTTGGGTC	60
AGTCGTATAA	AGGTCATTAC	GGAAGGCTGT	TAACTTCTT	ATCGTGGTTC	GAGTCCACGC	120
TGTCCCGCCA	AACATGCTGG	TTAGCTCAA	TGGTTGGAGC	GCCTTCCTAA	GAAGGGAGTT	180
CGGGTTCAGT	TCCGTCAATC	AGCACCAACC	AATCCCGCTG	GCAGGGATTG	CAGGCCGTAG	240
AGTATACGTG	CCTTACCCTC	TTATCTTCTT	GCCACCTAG	CCGTGGGCTT	TTCATTTCAGG	300
CCGCCGACAA	TCACCCTCAT	AAGCCACGTA	CCTATCATGT	CGGACGGCCT	TTCCCCACTA	360
Start 13						
CAAATACAGC	ACCCCGTTTC	TTCGGAGGTG	GTATGGCAAA	ACGTATGAAT	GACGACCATA	420
M A K R M N D D H K						
AAATTGTAGG	CCTGTCTGG	CTAATTCTGC	TTGGAATTGC	CTGCTGGGGC	GGCTTAGTTC	480
I V G L S W	L I L L	G I A C W G	G L V R			
GCTACCTGAT	TGACGTAAAG	CAGAATAAAG	CAACATGGAG	TTGATAAAC	GCTTTCGCAC	540
Y L I D V K	Q N K A	T W S W I N	A F A Q			
AGATCGCGGT	ATCTGGCTTT	ACCGGTCTGA	TTGGCGGGTT	GATAAGCGTT	GAGGGTGGGC	600
I A V S G F	T G L I	G G L I S V	E G G L			
TTAGTTTTCA	CATGATCCTG	GTAACGTCGG	GAATTAGCGG	GGCAATGGGT	TCCGGTGCTC	660
S F H M I L	V T S G	I S G A M G	S G A L			
PAZ-3R5 ← Stop 13						
Start 19						
TAACTACTTT	CTGGGAGCGT	CTTACAGGGA	TGAAAAATGC	AAACCAATAA	GTTTAAATTT	720
T Y F W E R	L T G M	K N A N Q	***			
M Q T N K F K F						
TCTCAGCGTA	GCGAGAAGAA	CCTGAACGGA	GTTAATCCTG	ACCTGGTCAA	AGTGATCCGC	780
S Q R S E K N	L N G V N P D	L V K V I R				
CGAGCACTGG	AAATTACACC	AGTAGACTTC	ATCGTTATCG	AAGGGGTGAG	AACACAAGCC	840
R A L E I T P	V D F I V I E	G V R T Q A				
AGGCAGAAAG	ATATGGTTGC	TACTGGGAAG	TCACAGACGA	TGAACAGCCG	CCACCTGAGT	900
R Q K D M V A	T G K S Q T M	N S R H L S				
GGTAATGCTG	TGCACATCAT	CCCGTTAAC	ACTACCTGCA	AGATTGAAGA	GTTCAGAGCCG	960
G N A V D I I	P V N T T C K	I E E F K P				
TTGCTCAAGG	CGGTTAAACA	GGCAGCTGAT	GAACAGGGCA	TGAAACTACG	ATTTCGGCATT	1020
L L K A V K Q	A A D E Q G M	K L R F G I				
AACTGGAAGC	ATGATCCGTC	ACTGCCATT	GAAACCAAT	TCATCGATGC	CCCCACGTT	1080
N W K H D P S	L P I E T K F	I D A P H V				
Stop 19						
Start 15						
GAGATACCCG	CATGAAAATC	AGCCTGAAGT	CGCTGATTGT	GCCAGTTGTA	ATGCTGTTGC	1140
E I P A	***					
M K I S L K S L I V P V V M L L I						
TAACGGCAAC	GGCATACATC	TATCAGGCA	AATATCAGGA	TGAATTGGCG	CGAGCGGAAT	1200
T A T A Y I	Y H G K	Y Q D E L A	R A E S			
CAGCCGAAAG	CAACCTGGTG	CTGGCCAATC	TAACAATAGC	TGACATGCAG	AAGCGTCAAC	1260

A E S N L V L A N L T I A D M Q K R Q R						
PAZ3-R4 ←						
GTGACGTAGC	GAAGCTCGAT	GCCAGATACA	CAAAGGAGCT	TGCTGATGCT	AACGCGACTA	1320
D V A K L D	A R Y T	K E L	A D A	N A T I		
TCGAAAGTCT	CCGTGCTGAT	GTTTCTGCTG	GTCGTAAGCG	CCTGCAAGTC	GCCGCCACCT	1380
E S L R A D	V S A G	R K R	L Q V	A A T C		
GTGCAAAGTC	AACGACCGGA	GCCGGCGGCA	TGGTGCATGG	AGAAAGCCCA	AGACTTACAG	1440
A K S T T G	A G G M	V D G	E S P	R L T A		
CAAATGCTGA	ACTCAATTAT	TACCGTCTCC	GAAGTGGAA	CGACAGGATA	ACCGCGCAGG	1500
N A E L N Y	Y R L R	S G I	D R I	T A Q V		
Stop 15						
TTAACTACCT	GCAGGAGTAT	GTCAGGACTC	AGTGCCTGAA	ATGATTTCGTC	AACCAAAGCG	1560
N Y L Q E Y	V R T Q	C L K	***			
GAAGCAAAAAG	CGAAGTAGCC	ATTACAAAAGC	CCATCTACGG	GTGGGCTTGA	TAATGAAACC	1620
GGAGTTAATT	TCTGGTCACC	AATTAACGGC	AGTACCACGT	AGCAACCCAA	GCCAGTAAGT	1680
GGGAAAAAAA	CACTGGCAGC	CAGATGAAAG	ATTGATCCTC	CTGCCTTATG	GCAAAAAAGA	1740
PAZ3-R3 ←						
TTCTTTGTGG	TGGCGGACTG	ATGAAAAGAC	ATCGGTTATT	GCAGGGGCTA	TTCAATGAGT	1800
GGTCTCGACA	ATGGCTTATC	CCAACAACCG	AGCCCAACAC	AATGGCAGAG	ATTACAGCAT	1860
TGACAGAATT	ACAGCAGATG	AACCTCGATA	TCTCCGTTT	AGTTCAAAGC	GATACCGCAG	1920
CAGCAGAGAA	AGCGATCGCA	TTCGTTGCTG	GAAGTAAGCT	GAACTTCGAA	CTGTTCAAAG	1980
ACCAACTGGT	TTTGGCGCAG	GGTGAAGGAA	CGGCATTAGC	TCGCGCAGAA	AAGCCTATTC	2040
GTAGGCAAAA	AGAAGCGTTA	GACCTGTTCA	CTGCCGGAGC	ATAACGAATG	GCAAAGACGA	2100
AGTGGCCTAA	ACTTCCCCGG	TTCTTCGTGC	CATTGTTCCA	TAGCGCCAAT	GTCTACCTGT	2160
GTCGTTCAA	GGAAAGAGTG	GATCAGGCTT	GCATTCATCT	TGGAGTTGGT	AGCGGCGGGA	2220
AATGAGATGCT	GCGGGGGGCA	ACACAGTCAT	ATTGCAATAC	CGAAACAGGC	GAGAATCTTT	2280
ACCTGCTTGG	TGTATTCAAT	GGTGAGGCGG	CCACATTGGT	TCATGAATGC	GCTCACGTTG	2340
PAZ3-R2 ←						
CATTTTATGT	CTGCCGAGAT	GTTGGTGTA	CCACTTATCC	TGGCGACGCA	AACGAAACCT	2400
ACTGCTACAT	GCTTGACAGA	ATGTTTCAGTC	ACTTCCCTGCC	GTTCTTTTCAT	GAACCAGAAA	2460
AAGAAGGAGC	CAAGTAATGG	CAAACCCAAA	CTTCAAGCCA	TCATGGCCTC	TATACAAAAGA	2520
TGCTGACGGT	GTATATGTGT	CTGCGCTTCC	GATTAAGCT	ATCAAATACG	CTAATGACCG	2580
AGTGCAAAC	GCAGAATTCG	TCGGCCCGTA	TGCTGACCAG	TACATGTCAG	CGCAAACAGT	2640
AGCCGTATTC	AAGCCGGAGG	TTGGCGGATA	TCTGTTCCGG	AGCCAGTACG	GCGAGCTGCT	2700
CTATATGAGC	AAGACAGCAT	TTGAAGCTAA	CTACACTTCT	GCAAGCGGTT	CAGTAGCTAA	2760
TGCAGAGACG	GCGGATAAGT	TATCTACTGC	CCGCACTATC	ACACTAACCG	GAGCGGTCAC	2820
AGGTTTCAGCG	TCCTTTGATG	GTTCCGGCTAA	CGTGACTATC	GAAACAACAT	CAGGAAGTTA	2880
Start 3						
ACTTATGGCA	GCACCAAAGG	GCAACCGATT	CTGGGAGGCC	CGCAGTAGCC	ATGGGCGTAA	2940
M A A P K G	N R F	W E A	R S S H	G R N		
CCCAGAAATTC	GAGTCGCCTG	AGGCGCTGTG	GGCTGCTTGT	TGTGAATACT	TCGAGTGGGT	3000
P K F E S P E	A L W	A A C	C E Y F	E W V		
GGAGGCTAAC	CCACTATGGG	AGATGAAGGC	TTTCTCATAT	CAAGGAGAAG	TTACACAAGA	3060
E A N P L W E	M K A	F S Y	Q G E V	T Q E		
GCCTATTGCC	AAGATGAGGG	CGATGACCAT	CACTGGGCTA	ACGCTATTCC	TCGATGTGAC	3120
P I A K M R A	M T I	T G L	T L F L	D V T		
GCTTGAGACA	TGGCGACAAT	ACAGGGTGAG	AGAAGACTTA	TCTGAGGTCG	TTACGCGAGC	3180
L E T W R Q Y	R V R	E D L	S E V V	T R A		
AGAGCAAATC	ATCTACGACC	AGAAATTCTC	CGGCGCAGCC	GCTGATCTTC	TCAAACGCTAA	3240
E Q I I Y D Q	K F S	G A A	A D L L	N A N		
Gen3-R ←						
CATCATCGCC	CGCGATTGG	GCCTCAAAGA	GCAGTCGCAA	TTTGAAGACG	TGACACCTGA	3300
I I A R D L G	L K E	Q S Q	F E D V	T P D		
Start 2						
TAAGGGAGAT	CGCGATAAGC	GCCGCTCTCG	TATCAAGGAG	CTATTCAACC	GTGGAACTGG	3360
K F D R D K R	R S R	I K E	L F N R	G T G		
Stop 3						
ACGCGATTCT	TGATAACCTG	AGCGACGAAG	AGCAAATCGA	ATTGCTCGAG	CTACTCGAAG	3420
R D S	***					
A I L D N L	S D E E	Q I E	L L E	L L E E		
AAGAAGAGAA	CTACCGAAAT	ACACACTTGC	TATATGAGTT	TACGCCATAC	AGCAAACAGC	3480

E	E	N	Y	R	N	T	H	L	L	Y	E	F	T	P	Y	S	K	Q	R
GTGAGTTCAT	CGACGCAGGT	CATGATTATC	CAGAGCGATG	TTTATGGCT	GGTAACCAGC														
E	F	I	D	A	G	H	D	Y	P	E	R	C	F	M	A	G	N	Q	L
TTGGTAAGTC	ATTACTGGC	GCT																	
G	K	S	F	T	G	A													

3540

Abb. 4.A.15.: Sequenzierter Bereich von PS3

Die ORFs der Gene 13, 19, 15, 3 und der sequenzierte Bereich des ORFs von Gen 2 sind farbig unterlegt, die jeweiligen Start- und Stopcodons unterstrichen. In den codierenden Bereichen der Gene ist die Aminosäuresequenz im 1-Buchstabencode angegeben. Die Lagen der verwendeten Primer sind durch Pfeile über der jeweiligen Sequenz dargestellt.

4.A.2.5. Homologien des sequenzierten 3,5 kb-Bereichs von PS3 zu P22, λ und Phage 21

Innerhalb des sequenzierten 3,5 kb-Bereiches besitzt der Phage PS3 in großen Teilen nur wenig Ähnlichkeit auf der Sequenzebene zu P22 (**Abb. 4.A.16.**), keinerlei Ähnlichkeit konnte zu den Phagen λ und 21 nachgewiesen werden. Auf die fehlenden Übereinstimmungen deuteten bereits die Hybridisierungsexperimente zur Genomanalyse hin (vgl. **Abb. 4.A.6.**). Auch hier muß darauf hingewiesen werden, daß die im Folgenden verwendeten Genbezeichnungen lediglich aufgrund gleicher Positionen der dazugehörigen Leserahmen an entsprechender Stelle im P22-Genom eingesetzt werden.

Der links von Gen 13 liegende Bereich weist keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen anderer Vertreter der lambdoiden Familie auf.

Auch **Gen 13_{PS3}** zeigt zu keinem der bekannten Hologene lambdoider Phagen Homologien. Ein Datenbank-Vergleich auf Proteinebene mit dem Computerprogramm "Blast" [Altschul, S. et al, 1990] für gp 13 ergab jedoch eine Gesamtübereinstimmung von 11,3 % mit einem hypothetischen integralen Membranprotein von *Helicobacter pylori* (**Abb. 4.A.17.**). Ansonsten konnten weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäureebene Homologien zu bekannten Genen oder Proteinen nachgewiesen werden. Es muß also davon ausgegangen werden, daß es sich bei Gen 13_{PS3} um ein neues, bisher noch nicht beschriebenes Hologen handelt.

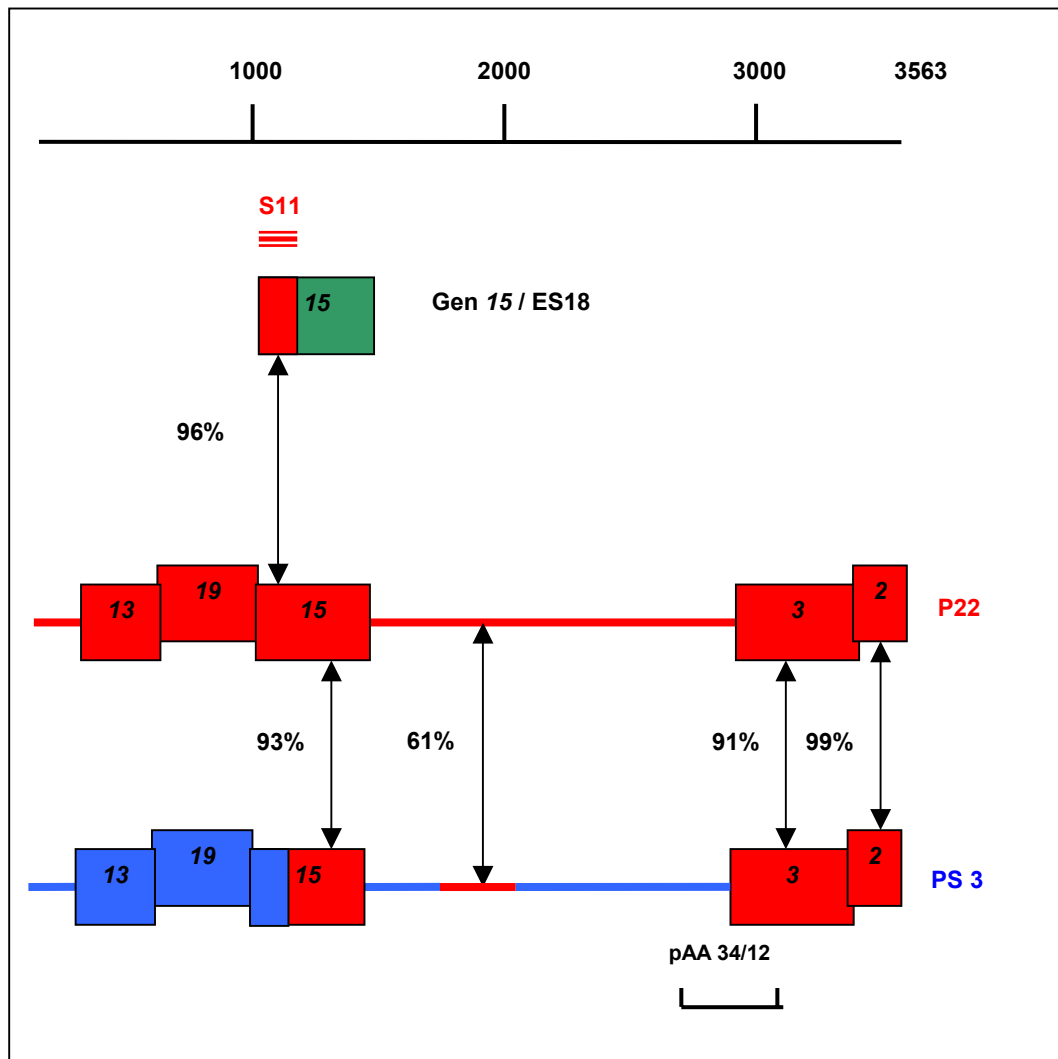


Abb. 4.A.16.: Homologien des sequenzierten Bereichs von PS3 zu P22

Im oberen Teil der Abbildung ist die Lage der Hybridisierungssonde S11 aus Gen 15_{ES18} dargestellt, sowie die im 5'-Bereich des Gens vorhandene Homologie zu Gen 15_{P22}. Die genaue Position des Plasmidinserts von pAA34/12 aus PS3 ist ebenfalls gekennzeichnet.

Gen 19_{PS3} zeigt ebenfalls keinerlei Ähnlichkeit zu einem der bekannten Endolysin-Gene der lambdoiden Phagen. Allerdings ergab ein Datenbank-Vergleich eine Gesamtübereinstimmung von 12,8 % auf Proteinebene zwischen gp 19_{PS3} und gp PLY118 des Phagen A118 von *Lysteria monocytogenes* (**Abb. 4.A.17.**). Bei letzterem handelt es sich um eine L-Alanoyl-D-Glutamat-Peptidase, die zur Gruppe der Endopeptidasen gehört (siehe auch Abschnitt 4.A.1.).

Die beschriebenen Übereinstimmungen von 11,3 % bzw. 12,8 % auf Proteinebene erscheinen zunächst gering. Man muß jedoch beachten, daß es sich hierbei um Gesamthomologien handelt. Bei näherer Betrachtung erkennt man Bereiche innerhalb der Gesamtsequenzen, die sehr hohe Ähnlichkeitsgrade aufweisen (**Abb. 4.A.17.**)

A)	
PS3/gp13:	51 IAVSGFTGLIGGLISVEGGLSFHMIIVTSGIS 82
<i>H. pylori</i> /integrales Membranprotein:	8 IAVGLFTGLISGIFGIGGLIIVPIMLATGHS 39
B)	
PS3/gp19:	55 EITPVDFIVIEGVRTQARQKDMVATGKSQTMNSRHLSGNAVDII 98
A118/gp PLY118	32 E ++ ++ E +RT+ +Q V +G SQTMS HL G A+D + 75

Abb. 4.A.17.: Datenbankvergleich der Gene 13_{PS3} und 19_{PS3}
 Dargestellt sind jeweils Auszüge der AS-Sequenzen der Genprodukte.
 IA: identische AS
 IA: AS mit ähnlichen Eigenschaften

Bei der Hybridisierung mit Sonde S11 (Gen 15_{ES18}) konnte kein Signal nachgewiesen werden. Die Sequenzanalyse ergab jedoch, daß auch PS3 ein Allel des bereits bekannten Gens 15_{P22} besitzt (vgl. Abschnitt 4.A.2.6.).

Diese beiden unterschiedlichen Ergebnisse werden verständlich, wenn man den Bereich betrachtet, den die Hybridisierungssonde erfäßt (**Abb.4.A.16.**). Sonde S11 wurde aus dem 5'-Bereich des Phagen ES18 präpariert, in dem zu Gen 15_{P22} eine Übereinstimmung von 96 % besteht. Diese nimmt im 3'-Bereich des Gens ab. Dort zeigt ES18 größere Homologien zu λ . Der Phage PS3 besitzt jedoch im 3'-Bereich von Gen 15, der von Sonde S11 nicht erfäßt wird, große Ähnlichkeit zu P22 (93 %), während im 5'-Bereich weniger Ähnlichkeiten zu beobachten sind.

Auch der stromabwärts von Gen 15 gelegene Bereich weist abgesehen von einer 98 bp-langen Region mit geringer Ähnlichkeit (61 %) zu P22 keinerlei Übereinstimmung auf Sequenzebene zu einem der bekannten lambdoiden Phagen auf. Erst im Bereich der Gene 3

und 2 bestehen wieder Ähnlichkeiten mit den Sequenzen der entsprechenden Gene von P22 (Gen 3: 91 %, Gen 2: 99 %).

4.A.2.6. Sequenzanalyse der Gene 15_{P22} , 15_{λ} , 15_{ES18} , $15_{Phage21}$, 15_{PS3} und 15_{PS34}

Durch die Sequenzvergleiche der Gene *15* der Phagen PS3 und PS34 sowie die Hybridisierungen der übrigen Phagen mit Sonde 11 konnte gezeigt werden, daß alle hier untersuchten Phagen das bereits bekannte Allel von Gen *15* besitzen. Vergleichende Sequenzanalysen der Gene *15* der Phagen P22, λ und ES18 von Schicklmaier wiesen bereits auf eine mosaikartige Struktur dieser Gene hin [*Schicklmaier, 1995*]. In **Abb. 4.A.18.** ist ein Vergleich der bereits bekannten Sequenzen der Gene *15* dieser Phagen mit denen der Phagen 21, PS3 und PS34 dargestellt, der den mosaikartigen Aufbau verdeutlicht. Die Sequenzen enthalten einzelne Elemente, die zwischen den einzelnen Phagen unterschiedliche Homologiegrade besitzen. Während PS34 über die gesamte Sequenz große Ähnlichkeit mit P22 besitzt, zeigt der Phage PS3 nur im 3'-Bereich Übereinstimmungen mit P22. Im 5'-Bereich von Gen *15* besitzt PS3 mit keinem der anderen Phagen Ähnlichkeit.

P22/15.	-----GTGAGTCGT--ATTAAGGCAATTATGCGTCTGTCATTATCTGCATC
PS3/15.	ATGAAAATCAGCCTGAAGTCCGTGATTGTCCAGTTGTAATG-CTGTTGCTAACGGCAAC
PS34/15.	-----GTGAGTCGGT--TAAACCGCATTATCTCCGCTCTGCTTATCTGCATC
ES18/15.	-----GTGAGTCGT--ATTAAGGCAATTATGCGTCTGTCATTATCTGCATC
Phage21/15	-----GTGAGCAGA--GTAAACCGCATTATCTCCGCTCTGCTTATCTGCATC
Lambda/15.	-----ATGAGCAGA--GTACCCGCATTATCTCCGCTCTGCTTATCTGCATC
P22/15.	ATCGTCTGCTTTTCGTTGGGCTGTTAATCATTATCGTGATAACGCCATCACCTACAAAGAG
PS3/15.	GGCATACTCTATCAACGGCAAAATATCAGGATGAATGCGCGAGCGGAATCAGCCGAAAG
PS34/15.	ATCGTCTGCCATTCATGGCGGTTAATCATTACCGTGATAACGCAATCGCCTACAAAGAC
ES18/15.	ATCGTCTGCTCTCATGGGCTGTTAATCATTACCGTGATAACGCCATCGCCTACAAAGAG
Phage21/15	ATCGTCTGCCCTCATGGGCTGTTAATCATTACCGTGATAACGCCATTACCTACAAAGCC
Lambda/15.	ATCGTCTGCTCTCATGGGCTGTTAATCATTACCGTGATAACGCCATTACCTACAAAGCC
P22/15.	CAGCGCGATAA-----AGCCACATCAATCATCGCTGATATGCAG
PS3/15.	CAACCTGGTGGT-----GCCAATCTTAACAATACTGAATATGCAG
PS34/15.	CAGCGTGATAA-----AGCCACATCAATCATCGCTGATATGCAG
ES18/15.	CAGCGCGATACCGTTATTCATAAGCTGACGCTGCGGACCGCGCAATTAACCGCATGACG
Phage21/15	CAGCGCGACAAAATGCCAGAGAAGCTGACGCTGCGGACCGGTTAATTACTGACATACAG
Lambda/15.	CAGCGCGACAAAATGCCAGAGAAGCTGACGCTGCGGACCGCGCAATTACTGACATGACG
P22/15.	AAGCGTCAACGAGATGTAGCAGAAGCTCGATGCCAGATACACAAAGGAGCTTGCTGATGCT
PS3/15.	AAGCGTCAACGTGACGTAGCGAACTCGATGCCAGATACACAAAGGAGCTTGCTGATGCT
PS34/15.	AAGCGTCAACGTGATGTAGCAGAAGCTGACGCCAGATACACAAAGGAGCTTGCTGATGCT
ES18/15.	AAGCGTCAACGTGATGTAGCAGAAGCTGACGCCAGATACACAAAGGAGCTTGCTGATGCT
Phage21/15	ATCGCTCAGCGTGATGTTGCTGCGCTCGATGCAAAATACACGAAGGAGTTAGCTGATGCT
Lambda/15.	ATCGCTCAGCGTGATGTTGCTGCGCTCGATGCAAAATACACGAAGGAGTTAGCTGATGCT
P22/15.	AACGCGACTATCGAAACTCTCCGCGCTGATGTTTCTGCTGGGCGTAAGCGCCTGCAAGTC
PS3/15.	AACGCGACTATCGAAAATCTCCGTTGCTGATGTTTCTGCTGGTCGTAAGCGCCTGCAAGTC
PS34/15.	AAATGCGACTATCGAAAATCTCCGCGCTGATGTTTCTGCTGGTCGTAAGCGCCTGCAAGTC
ES18/15.	AAAGCTGAGAAATGATGCTTTCGCGATGATGTCGCCGCTGGTCGTCCGCTGCTCGTC
Phage21/15	AAAGCTGAAAATGATGCTCTCCGTTGATGATGTTGCCGCTGGTCGTCCGCTGCTCGTC
Lambda/15.	AAAGCTGAAAATGATGCTCTCCGTTGATGATGTTGCCGCTGGTCGTCCGCTGCTCGTC
P22/15.	TCCGCCACCTGTC---CAAAGT-----CAACGACCGGAGCCAGCGGCATGGGCGAT
PS3/15.	GCCGCCACCTGTC---CAAAGT-----CAACGACCGGAGCCGCGGCATGGTCGAT
PS34/15.	TCCGCCACCTGTC---CAAAGT-----CAACGACCGGAGCCAGCGGCATGGGCGAT
ES18/15.	AAAGCGCCACCTGTC---CAAAGT-----CAACGACCGGAGCCAGCGGCATGGGCGAT
Phage21/15	AAAGCGACTCTGTCAGTCAGTGC-----GTGAAGCCACGACTGCCCTCCGCGTGGATAAT
Lambda/15.	AAAGCGACTCTGTCAGTCAGTGC-----GTGAAGCCACGACTGCCCTCCGCGTGGATAAT
P22/15.	GGAGAAAGCCCAAGACTTACAGCAGATGCTGAACTCAATTATTACCGTCTCCGAAGTGGAG
PS3/15.	GGAGAAAGCCCAAGACTTACAGCAAAATGCTGAACTCAATTATTACCGTCTCCGAAGTGGAG
PS34/15.	GGAGAAAGCCCAAGACTTACAGCAGATGCTGAACTCAATTATTACCGTCTCCGAAGTGGAG
ES18/15.	GCAATCCCGCCCAGACTGGCAGACTCCGCTCAACGGGATTATTTCACCCTCAAGAGCGGA
Phage21/15	GCAAGCCTCCCGGACTGGCAGACACCCTGTAACGGGATTATTTCACCCTCAGAGAGAGGG
Lambda/15.	GCAAGCCTCCCGGACTGGCAGACACCCTGTAACGGGATTATTTCACCCTCAGAGAGAGGG
P22/15.	ATCGACAGGATAACCGCGCAGGTTAATACCTGCAGGAGTACATCAGGAGTCAGTGCTTA
PS3/15.	ATCGACAGGATAACCGCGCAGGTTAATACCTGCAGGAGTATGTCAGGACTCAGTGCCCTG
PS34/15.	ATCGACAAAGATAACCGCGCAGGTTAATACCTGCAGGACTACATCAGGACACAAATGCCCTG
ES18/15.	GTGACAAAGAAATGCAAAAACAACCTGGAAGGGGCGCAGGACTATATCAGAACCCAGTGCCAG
Phage21/15	CTGATCACTATGCAAAAACAACCTGGAAGGAACCCAGAAGTATATTAATGAGCAGTGCAGA
Lambda/15.	CTGATCACTATGCAAAAACAACCTGGAAGGAACCCAGAAGTATATTAATGAGCAGTGCAGA
P22/15.	AAATAA
PS3/15.	AAATGA
PS34/15.	AAATAA
ES18/15.	AAATAA
Phage21/15	TAG---
Lambda/15.	TAG---

Abb.4.A.18.: Vergleichende Sequenzanalyse der Gene 15 der Phagen P22, λ, ES18, Phage21, PS3 und PS34

Übereinstimmende Nukleotide sind farbig gekennzeichnet.

4.A.3. Strukturanalyse der Gene 13_{PS3} und 13_{PS34}

Bei den Hologenen handelt es sich um essentielle Gene, die der Phage zur Freisetzung seiner Nachkommen benötigt. Durch die Untersuchung der Phagen-Kollektion des P22-Astes im Rahmen dieser Arbeit konnte an entsprechender Stelle in den Phagengenomen der Phagen PS3 und PS34 jeweils ein ORF identifiziert werden, der weder auf Nukleotid- noch auf Sequenzebene Ähnlichkeiten zu einem der bekannten Hologene aufweist. Aufgrund der identischen Lage analoger Gene im Genom der lambdoiden Phagen wird angenommen, daß es sich bei den beschriebenen ORFs um zwei neue Allele des Gens 13 handelt.

Weitere Anhaltspunkte für diese Vermutung liefern die folgenden Vergleiche:

- Die für die Hologene charakteristischen Strukturen wurden bereits in Abschnitt **4.A.1.** ausführlich beschrieben. Beide „neuen“ Hologene der Phagen PS3 und PS34 besitzen das duale Startmotiv sowie ein dazwischen liegendes Lysin oder Arginin. Auch die stromaufwärts von Gen 13 gelegenen Sekundärstrukturen zur Regulation des zahlenmäßigen Verhältnisses ihrer Genprodukte sind in den Sequenzen der Gene 13 der beiden Phagen vorhanden (**Abb. 4.A.19.**, vgl. auch **Abb. 4.A.3.**).
- Das Hydrophobizitätsprofil des Holins von PS3 zeigt starke Ähnlichkeit zum Profil des Holins von P22 (**Abb. 4.A.20.**), sowohl der C- als auch der N-Terminus sind hydrophil. Vorhersagen der Sekundärstruktur und die berechnete Anzahl der TMD mit verschiedenen Computerprogrammen (siehe Abschnitt **2.20.**) deuten auf das Vorhandensein von zwei bis drei TMD hin (**Tab. 4.A.3.**). Zusammen mit der Länge von gp 13_{PS3} von 106 AS bzw. 102 AS sprechen diese Daten dafür, daß es sich bei dem Holin des Phagen PS3 um ein Holin der **Klasse I** handelt.
- Das Holin des Phagen PS34 ist mit einer Länge von 68 bzw. 65 AS deutlich kleiner. Es besitzt einen hydrophilen C- und einen hydrophilen N-Terminus. Sein Hydrophobizitätsprofil ähnelt, zumindest in der 3'-Hälfte, dem des Phagen 21 (**Abb. 4.A.20.**). Allerdings deuten 3 von 4 Strukturvorhersagen lediglich auf **eine** TMD hin. Dieses Ergebnis wird etwas relativiert, wenn man die gleichen Programme auch auf das Holin des Phagen 21 anwendet. Immerhin sagen auch hier zwei von vier Analyseprogrammen nur eine TMD vorher (**Tab. 4.A.3.**). Faßt man diese Daten zusammen, so muß das Holin von PS34 als zur **Klasse II** zugehörig eingestuft werden.

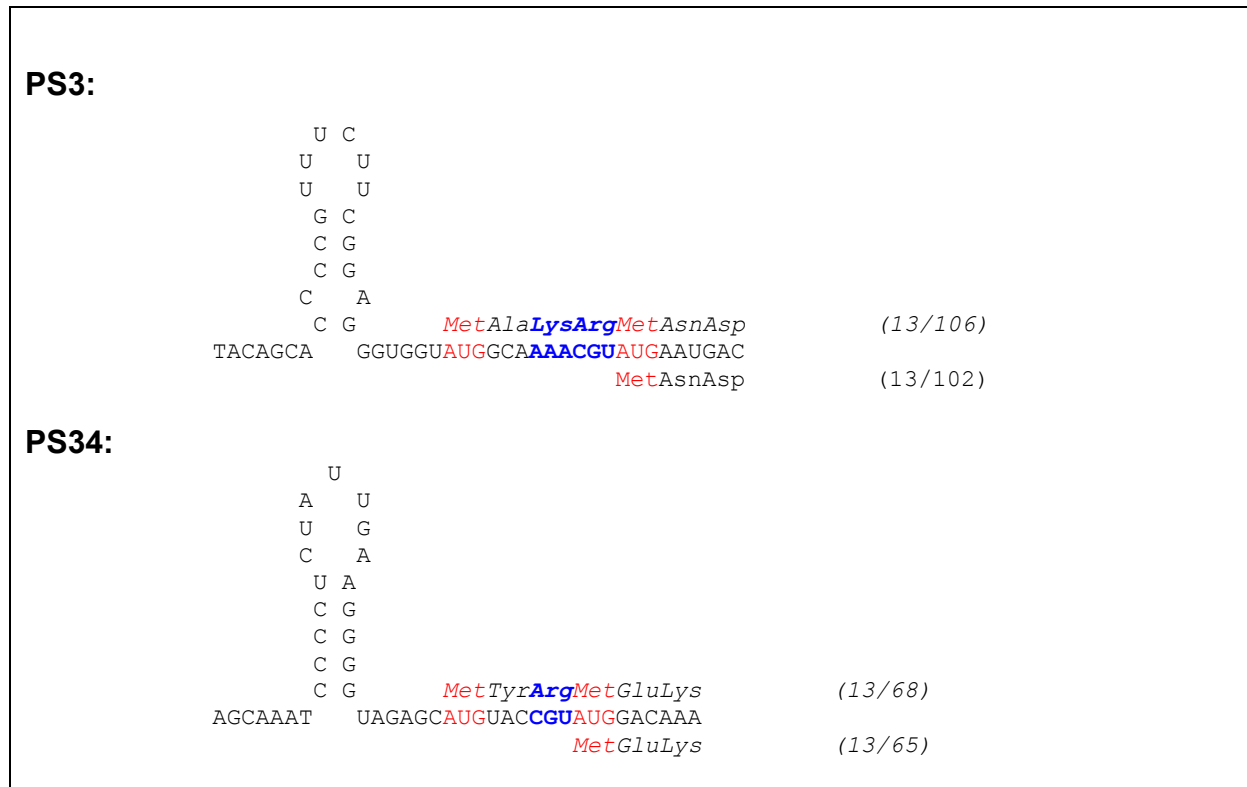


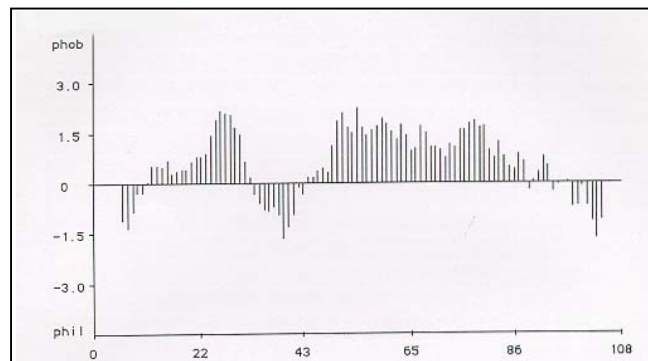
Abb. 4.A.19.: Sekundärstrukturen in den Translations-Initiations-Regionen der Holin-Gene der Phagen PS3 und PS34

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der sdi-Struktur sowie der ersten Basen der Gene 13_{PS3} und 13_{PS34}

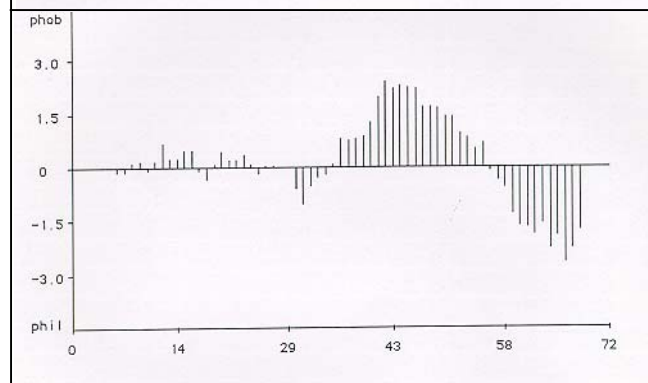
	Lambda		Phage 21		PS3		PS34	
	Anzahl der TMD	Position der TMD	Anzahl TMD	Position der TMD	Anzahl TMD	Position der TMD	Anzahl TMD	Position der TMD
Predict-Protein	3	18-35 45-62 67-84	1	36-53	3	16-32 48-65 70-87	1	25-42
TM-Pred	3	14-34 40-58 61-94	2	7-25 37-54	3	13-29 45-66 74-94	1	30-49
Top-Pred 2	2	39-59 64-81	2	7-27 34-54	3	9-29 47-67 70-90	2	6-26 29-49
SOSUI	2	20-42 46-68	1	31-53	2	12-34 53-75	1	18-40

Tab. 4.A.3.: Vorhersagen der TMD-Anzahl und Positionen mit verschiedenen Computerprogrammen (vgl. 2.20.)

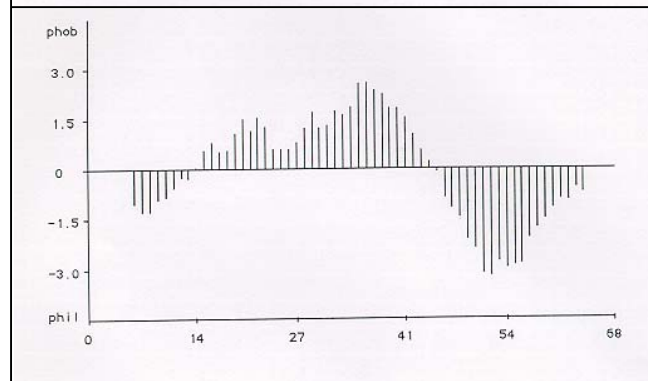
A) P22



B) Phage 21



C) PS34



D) PS3

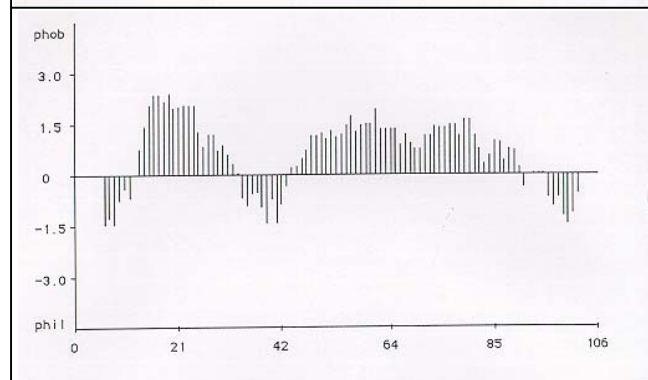


Abb. 4.A.20.: Hydrophobizitätsprofile der Holine der Phagen P22, Phage 21, PS34 und PS3
Die x-Achse gibt jeweils die Anzahl der Aminosäuren an.

4.A.4. Funktionalitätstest der Genprodukte 13 der Phagen PS3 und PS34

4.A.4.1. Klonierung der Hologene 13 der Phagen PS3 und PS34

Schon die in 4.A.2. und 4.A.3. beschriebene Lage der ORFs der vermeintlichen Gene 13_{PS3} und 13_{PS34} an analoger Position zu Gen 13_{P22} im Genom von P22 lieferte einen ersten Hinweis darauf, daß es sich um zwei neue Allele des Gens 13 der Lysisgenkassette lambdoider Bakteriophagen handelt. Der in 4.A.3. durchgeführte Vergleich der strukturellen Merkmale der Gene deutete ebenfalls darauf hin. Im Folgenden sollte diese Vermutung durch einen Funktionalitätstest geprüft und gegebenenfalls bestätigt werden. Um die Funktionalität der neuen Holin-Proteine zu testen, mußten zunächst die Hologene in einen geeigneten Vektor kloniert werden, in dem anschließend eine Expression der Genprodukte möglich war. Die Funktion der Holine liegt in der Läsion der Cytoplasmamembran. Dadurch kommt es zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials, der auch ohne Mitwirken des Genproduktes von Gen 19 (Endolysin) für die Zellen in den meisten Fällen letal ist (vgl. **Abb. 4.A.4.**). Die heute häufig verwendeten *Multi-copy*-Vektoren (100 und mehr Kopien/Zelle) besitzen in den meisten Fällen den *lac*-Promotor *lacP*, unter dessen Kontrolle die eingefügten Inserts stehen. Eine Expression der unter der Kontrolle dieses Promotors stehenden Gene kann durch Induktion des Repressors *lacI* (z. B. durch IPTG) erreicht werden. Befindet sich die *lac*-Promotor-Region jedoch auf einem Plasmid mit hoher Kopienzahl, so "titrieren" die vielen Operator-Kopien den chromosomal-kodierten Repressor aus. Es kommt zur konstitutiven *lac*-mRNA-Synthese [Winnacker, 1990]. Mit anderen Worten: selbst in einer optimal reprimierten Zelle (ohne Induktor) würden immer noch genügend Kopien der toxischen Hologene gebildet, um die Zelle abzutöten. Aus diesem Grund scheiterten alle Versuche, die Hologene von PS3 und PS34 in einen dieser Vektoren einzusetzen, diesen erfolgreich in eine *E. coli*-Zelle einzuführen und hier eine Expression der Holinproteine vollständig zu reprimieren, was für das Überleben der Zelle essentiell wäre. Schließlich wurde auf ein 1985 von Stanssens et al. beschriebenes Kontrollsystem zur Genexpression zurückgegriffen [Stanssens et al., 1985], das bereits erfolgreich zur Klonierung letaler Genprodukte eingesetzt wurde (Witte, persönliche Mitteilung). Das hierbei verwendete Plasmid pPLcAT10 ist ein Derivat des *Middle-copy*-Vektors pBR322 (ca. 30 Kopien/Zelle) und trägt den P_L -Promotor von λ unmittelbar vor seiner Shine-Dalgarno-Sequenz und der *Cloning-site* (**Abb. 4.A.21.**) Durch Einführen des Plasmids in Zellen des *E. coli*-Stamms POP2135, die auf ihrem Chromosom den

temperatur-sensitiven λ -Repressor $cl857$ kodieren, konnte ein System entwickelt werden, das eine stabile Repression der Genexpression der letalen Hologene erlaubt.

Der temperatursensitiv λ -Repressor $cl857$ ist bei einer Temperatur von 28°C aktiv, der λ -Promotor P_L auf dem Vektor $pPLcAT10$ wird vollständig reprimiert und die von ihm aus gesteuerte Transkription völlig unterdrückt. Bei einer Temperatur von 42°C liegt der Repressor hingegen in inaktiver Form vor, die keine Verbindung zum Operator mehr eingehen kann (**Abb. 4.A.21.**). Die Initiation der Transkription kann nach Temperaturerhöhung daher unbehindert stattfinden und zur Bildung des gewünschten Genproduktes führen. Die Induktion benötigt also in diesem Fall, im Gegensatz zu dem zuvor geschilderten *lac*-System keinen Zusatz von Induktoren, sondern lediglich eine Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C . Die Klonierung der Hologene der beiden Phagen PS3 und PS34 erfolgte bei einer Temperatur von 28°C , um eine vorzeitige Produktion der letalen Holinproteine zu vermeiden.

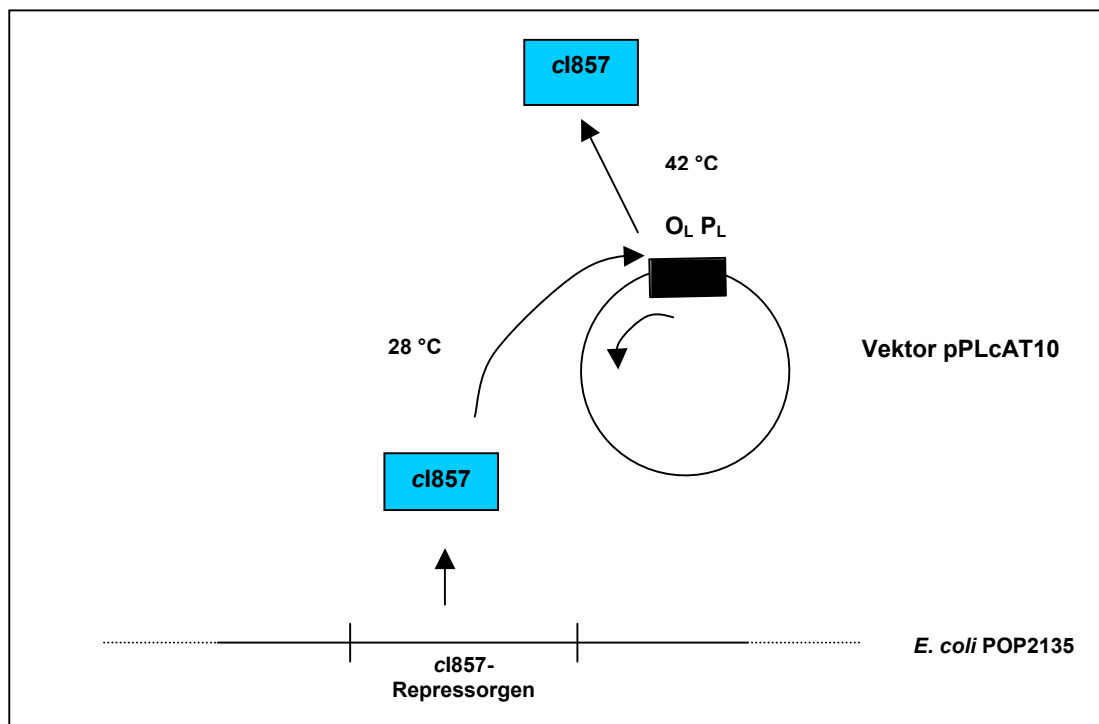


Abb. 4.A.21.: Einsatz eines temperatur-sensitiven Repressors zur Kontrolle des Promotors P_L (modifiziert nach [Winnacker, 1990])

Der chromosomal kodierte, thermolabile Repressor $cl857$ bindet bei einer Temperatur von 28°C an den auf dem Plasmid liegenden Operator-Bereich O_L und verhindert so die Transkription vom Promotor P_L aus. Durch Temperaturerhöhung auf 42°C wird der Repressor inaktiviert und verlässt den Operatorbereich, die Transkription kann ungehindert stattfinden.

Wie aus **Abb. 4.A.22.** ersichtlich, besitzt das Plasmid pPLcAT10 nur wenig geeignete Restriktionsschnittstellen zur Ligation eines Inserts. Für eine effektive Expression ist vor allem der Abstand des Startcodons zur Shine-Dalgarno-Sequenz entscheidend. Dieser sollte zwischen 5 und 13 Nukleotiden betragen, das Optimum liegt bei 9 Nukleotiden [Gold, 1988].

Da in einem entsprechenden Abstand der Hologene beider Phagen keine passenden Schnittstellen existierten, wurden die Gene mittels PCR aus der Gesamt-Phagen-DNA amplifiziert. Die hierzu verwendete Pfu-Polymerase (*Stratagene*) besitzt durch ihre 3'-5'-*Exonuklease-Proofreading*-Aktivität eine zwölfmal geringere Fehlerrate als DNA-Polymerasen ohne *Proof-reading*-Aktivität.

Damit im Anschluß an die PCR und Aufreinigung der Produkte eine Ligation in geeignete Schnittstellen des Vektors pPLcAT10 möglich war, wurden für die PCR-Reaktion Primer ausgewählt, die nicht hundertprozentig komplementär zur ursprünglichen Sequenz der Phagen-DNA waren, sondern durch Basenfehlpaarungen die gewünschten Schnittstellen lieferten (**Abb. 4.A.23.**: PAZ13/34-F6 und PAZ13/34-R7 bzw. PAZ13/3-F und PAZ13/3-R).

Durch die Wahl unterschiedlicher Schnittstellen auf beiden Seiten von Gen 13 wurde gewährleistet, daß die Inserts immer nur in einer Richtung in den Vektor eingefügt werden konnten. Da PCR-Reaktionen immer *blunt-ends* liefern, mußte vor dem Einsetzen der Fragmente in den Vektor ein Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen durchgeführt werden (**Abb. 4.A.22.**).

Nach Ligation der PCR-Fragmente in den Vektor pPLcAT10 wurde das Plasmid in *E. coli* POP2135 eingeführt und die plasmidhaltigen Zellen wurden auf LB-Platten mit Ampicillin selektioniert. Durch das auf dem Vektor liegende Ampicillin-Resistenzgen sollten auf den Platten nur diejenigen Zellen wachsen, die den Vektor aufgenommen hatten. Ob diese vektorhaltigen Zellen gleichzeitig im Besitz eines Inserts waren, konnte nur durch Sequenzierung der Vektor-DNA geprüft werden. Durch Sequenzierung der vollständigen Inserts in zwei Richtungen wurde sichergestellt, daß die Sequenz des klonierten Gens fehlerfrei war. Die Klone, die die Hologene der Phagen PS3 und PS34 enthielten, wurden als pAA50/1 (Gen 13_{PS3}) und pAA47/1 (Gen 13_{PS34}) bezeichnet.

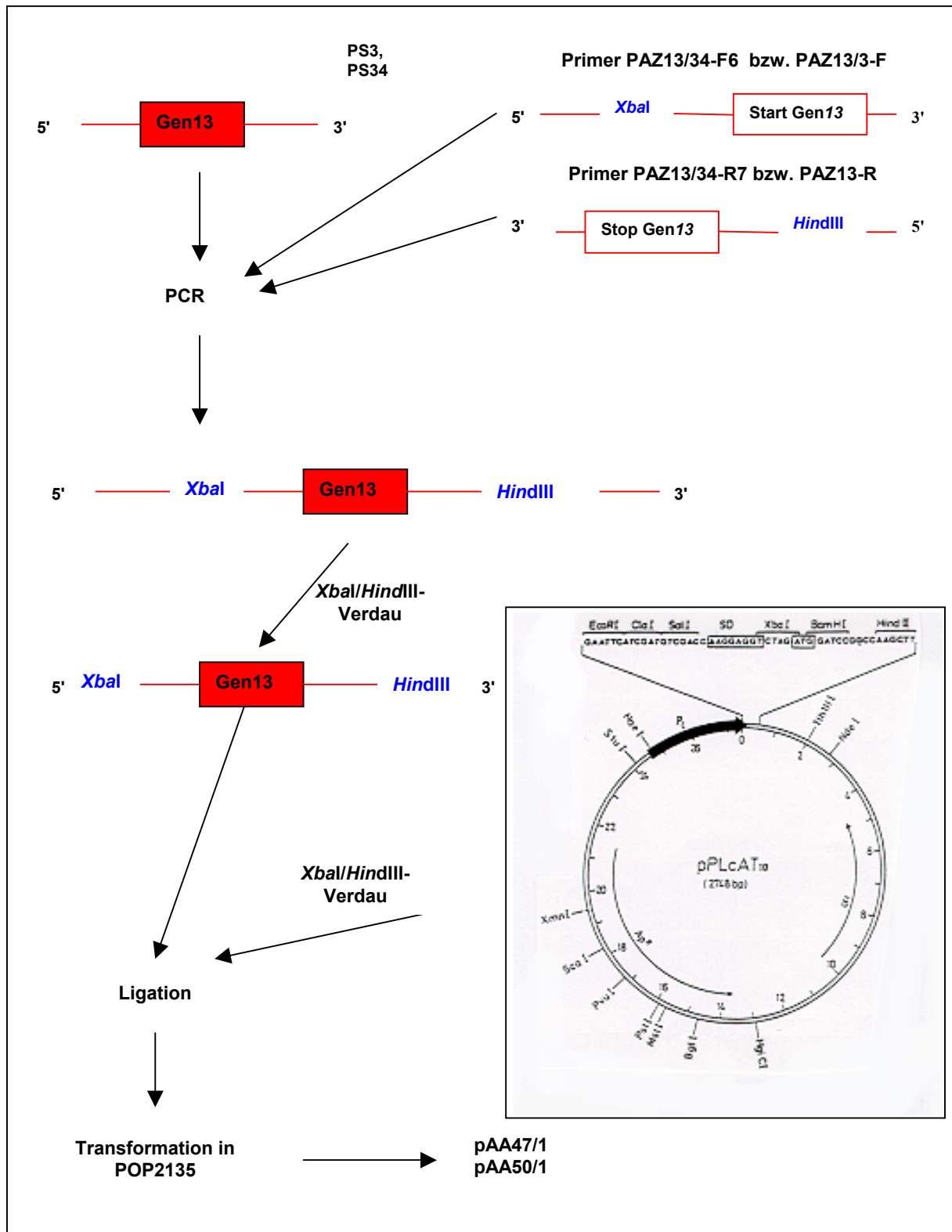


Abb. 4.A.22.: Klonierung der Hologene 13 der Phagen PS3 und PS34

Die Phagen-DNA ist rot dargestellt, die durch Fehlpaarung der Primer entstandenen Restriktionsschnittstellen sind blau gekennzeichnet.

```

PAZ13/34-F6:           XbaI
                    5' CTATGAAGCTCTAGAGCATGTA 3'

PS34/13:              Gen 13 →
5' ...CCCCTCTATGAAGGGGTAGAGCATGTACC.....ATAGCGTAATACGCGGCGATAAGTGGCGGGGCTATTGC...3'
3' ...GGGGAGATACTTCCCATCTCGTACATGG.....TATCGCATATATGCGCCGCTATTCACCGCCCCGATAACG...5'

                                     3' CGCCGCTATTTCGAAGCCCCGAT 5'
                                               HindIII      PAZ13/34-R7

```

Abb.4.A.23.:**Primerauswahl für PCR am Beispiel von Gen 13 von PS34**

Dargestellt ist die Originalsequenz von PS34 sowie die beiden Primer PAZ13/34-F6 und PAZ13/34-R7. In der Originalsequenz sind die Basen, die in den Primern ausgetauscht wurden rot gekennzeichnet, in den Primern sind die daraus resultierenden Schnittstellen rot markiert.

4.A.4.2. Komplementationstest

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 42°C oder ein Temperatur-*shift* von 28°C auf 42°C während des Hochwachstums von pAA47/1 bzw. pAA50/1 sollte zur Expression von Gen 13 und damit zum Absterben der Zellen führen. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Zellen sowohl bei 28°C als auch 42°C Wachstum zeigten. Aus diesem Grund mußte zunächst die Funktionalität der Genprodukte der beiden klonierten Hologene angezweifelt werden.

Am Ende des lytischen Zyklus eines Phagen liegen in einer Wirtszelle 1000 bis 5000 Holinmoleküle vor [Zagotta und Wilson, 1990; Chang et al., 1995; Bläsi und Young, 1996]. Das verwendete Plasmid pPLcAT10 ist jedoch ein *Middle-copy*-Plasmid mit ca. 30 Kopien pro Zelle. Es war also denkbar, daß die Molekülanzahl der Holine, die bei 42°C in pAA47/1 bzw. pAA50/1 gebildet wurde, nicht ausreichte, um das Membranpotential der Wirtszelle ernsthaft zu gefährden.

Da kein anderer Vektor mit einer höheren Kopienanzahl, unter gleichzeitiger Kontrolle des λ -P_L-Promotors durch den λ -Repressor cI857, zur Verfügung stand, wurde zur Überprüfung der Funktionalität der beiden Hologene von PS3 und PS34 der im Folgenden beschriebene **Komplementationstest** durchgeführt:

Der Phage λ Sam7 besitzt eine Amber-Mutation in seinem Hologin, dem S-Gen. Er kann in einer normalen *E. coli*-Wirtszelle zwar vermehrt werden, die reifen Phagenpartikel können jedoch die Zelle nicht mehr verlassen, da die Lyse des Bakteriums ohne das Genprodukt des

S-Gens nicht stattfinden kann. λ Sam7 kann jedoch auf einem sogenannten supF-Stamm (z. B. *E. coli* LE392 oder *E. coli* NM538) vermehrt **und** freigesetzt werden. Ein supF-Stamm enthält das Suppressor-Gen *supF*. Dieses kodiert für eine Tyrosin-tRNA, die in der Proteinbiosynthese Amber-Codons (UAG) erkennt und dort anstelle eines Kettenabbruchs die Aminosäure Tyrosin einfügt. Damit entsteht im Falle von λ Sam7 wieder ein funktionsfähiges Holinprotein, die Wirtszelle kann lysiert und die Phagennachkommen können freigesetzt werden.

Für die Phagen P22 und λ konnte gezeigt werden, daß die Genprodukte der fast identischen Holingene sich gegenseitig komplementieren können [Rennell und Poteete, 1985]. Außerdem sind sowohl das S-Protein des Phagen 21 als auch das T-Protein des Phagen T4 in der Lage, die λ -Holin-Nonsense-Mutante Sam7 zu komplementieren [Bonovich und Young, 1992; Lu und Henning, 1992]. Deshalb war anzunehmen, daß auch die Holine der Phagen PS3 und PS34 in der Lage sind, das defekte S-Gen von λ Sam7 zu ersetzen.

Der eigentliche Komplementationstest lief folgendermaßen ab:

Damit in der heranwachsenden Kultur von Anfang an Holine gebildet wurden, wurde das gesamte Experiment bei 42 °C durchgeführt. Eine Flüssigkultur von pAA47/1 bzw. pAA50/1 wurde bis zu einer $OD_{580nm} = 0,8$ herangezogen, aliquotiert, mit unterschiedlichen Verdünnungen eines λ Sam7-Lysates infiziert und auf LB-Platten mit Ampicillin in Topagar ausgeplattiert. Als Positivkontrolle wurde eine Titerbestimmung von λ Sam7 auf den *E. coli*-Stämmen LE392 (*supF*⁺) sowie auf JM83 (*supF*⁻) vorgenommen. Als Negativkontrollen wurde pPLcAT10 ohne Insert in POP2135 sowie pAA47/1 bzw. pAA50/1 ohne Zugabe von λ Sam7-Lysat mitgeführt. Nach Inkubation der Platten über Nacht zeigten sich Phagenplaques auf den Platten mit den Kulturen pAA47/1 und pAA50/1 sowie auf den Platten der Positivkontrolle. Die Negativkontrollen lieferten keine Plaques. Um sicherzugehen, daß es sich bei den entstandenen Plaques auf den Platten mit den Kulturen pAA47/1 und pAA50/1, die nur sehr niedrige Titer aufwiesen, nicht um Revertanten handelte, wurde im Anschluß aus Einzelplaqueausstichen parallel eine Titerbestimmung auf die beiden *E. coli*-Stämme LE392 (*supF*⁺) sowie auf JM83 (*supF*⁻) durchgeführt. Als Kontrolle wurde erneut ein λ Sam7-Lysat mitgeführt. Die Titer der aus dem Komplementationstest isolierten Phagen auf LE392 lagen fünf Zehnerpotenzen höher als die Titer auf JM83, der Titer von λ Sam7 erreichte auf LE392 Werte, die um vier Zehnerpotenzen höher lagen als auf JM83. Die Tatsache, daß auch auf JM83 Plaques nachweisbar waren, beruht auf der relativ hohen spontanen Rückmutationsrate der Amber-Mutation in λ Sam7.

Die Daten aus den Experimenten mit pAA47/1 sind in **Tab. 4.A.4.** und **Tab. 4.A.5.** dargestellt, die Werte aus den Versuchen mit pAA50/1 lagen in der gleichen Größenordnung. Durch den wesentlich höheren Titer der im Komplementationstest entstandenen Phagen auf dem Supressorstamm LE392 im Vergleich zum Titer auf JM83 konnte gezeigt werden, daß es sich hierbei nicht um Revertanten, sondern um λ Sam7-Phagen handelte.

Titerbestimmung von λ Sam7 auf			POP2135	pPLcAT10	pAA47/1		
JM83 (<i>supF</i>)	LE392 (<i>supF</i> ⁺)	Δ			eingesetzte Zellen	eingesetzte λ Sam7-Phagen	erhaltene Plaques
$2,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$	$\sim 10^4$	-	-	$5,36 \times 10^7$	3×10^6	450

Tab. 4.A.4.: Ergebnis des Komplementationstests von Gen 13_{PS34}

Titerbestimmung von λ Sam7 auf			Titerbestimmung eines Einzelplaqueausstichs von λ Sam7 auf pAA47/1 auf		
JM83 (<i>supF</i>)	LE392 (<i>supF</i> ⁺)	Δ	JM83 (<i>supF</i>)	LE392 (<i>supF</i> ⁺)	Δ
$2,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$	$\sim 10^4$	$3,8 \times 10^6$	3×10^{11}	$\sim 10^5$

Tab. 4.A.5.: Titerbestimmung eines Einzelplaqueausstichs von λ Sam7 auf pAA47/1 im Anschluß an den Komplementationstest

Mit dem hier durchgeführten Komplementationstest wurde gezeigt, daß die Hologene der Phagen PS3 und PS34 für funktionsfähige Proteine kodieren, die in der Lage sind, das defekte S-Gen von λ Sam7 zu komplementieren.

Zusammen mit den Strukturanalysen aus **4.A.3.** sowie den in **4.A.2.** beschriebenen Positionen der ORFs im Vergleich zur Position des Lysisgens 13_{P22} im Genom von P22 kann nun davon ausgegangen werden, daß es sich bei den neu entdeckten Genen 13 der Phagen PS3 und PS34 tatsächlich um weitere, bisher unbekannte Allele des Hologens handelt.

4.A.5. Modulkombinationen innerhalb der Lysisgenkassette lambdoider Bakteriophagen

Durch die vorangegangenen Untersuchungen der Lysisgene von 46 *Salmonella*-Phagen wurden folgende Allele nachgewiesen:

- Für **Gen 15** konnte kein neues Allel gezeigt werden. Die untersuchten Phagen besitzen, mit mehr oder weniger großen Abweichungen, alle das bereits bekannte Allel des Phagen P22. Dies konnte bei den meisten Phagen durch Hybridisierung mit Sonde S11 (Gen 15_{ES18}) oder wie im Fall von PS3 durch Sequenzanalyse gezeigt werden. Dennoch bestehen in den Nukleotidsequenzen der verschiedenen Gene 15 deutliche Unterschiede (vgl. Abschnitt 4.A.2.6.).
- PS 3 besitzt ein neues Allel von **Gen 19**, für das keine Homologien zu einem bekannten Endolysingen innerhalb der lambdoiden Familie gefunden wurden. Allerdings zeigt gp 19_{PS3} Ähnlichkeiten zu der Endopeptidase PLY118 des *Listeria monocytogenes*-Phagen A118. Damit wurde diese Endolysingruppe zum ersten Mal bei lambdoiden Phagen gefunden. Alle anderen Phagen besitzen das Endolysingen des Phagen 21, dessen Vorkommen zwar im λ -Ast bekannt ist, es wurde jedoch hier zum ersten Mal innerhalb des P22-Astes der Familie nachgewiesen.
- Für **Gen 13** wurden zwei neue Allele entdeckt. PS3 besitzt ein Holingen, das weder Homologien zu einem bekannten Gen der Lambdoiden besitzt noch in einem anderen der geprüften Phagen nachgewiesen werden konnte. Gp13_{PS3} weist Ähnlichkeiten mit einem hypothetischen integralen Membranprotein von *Helicobacter pylori* auf. Alle anderen Phagen besitzen das Holingen des Phagen PS34, für das ebenfalls keine Ähnlichkeiten zu einem bekannten Holingen der lambdoiden Phagen entdeckt wurden, dessen gp aber Übereinstimmungen mit dem regA-Protein von *Serratia marcescens* und einer Holin-Proteinsequenz von *Haemophilus somnus* besitzt.

Insgesamt sind nach heutigem Stand also folgende Allele der Gene der Lysisgenkassette in lambdoiden Phagen bekannt (**Abb. 4.A.25.**):

• Gen 15:	1 Allel	• Gen 13:	4 Allele: a) P22
• Gen 19:	4 Allele: a) P22		b) Phage 21
	b) Phage 21		c) PS3
	c) λ		d) PS34
	d) PS3		

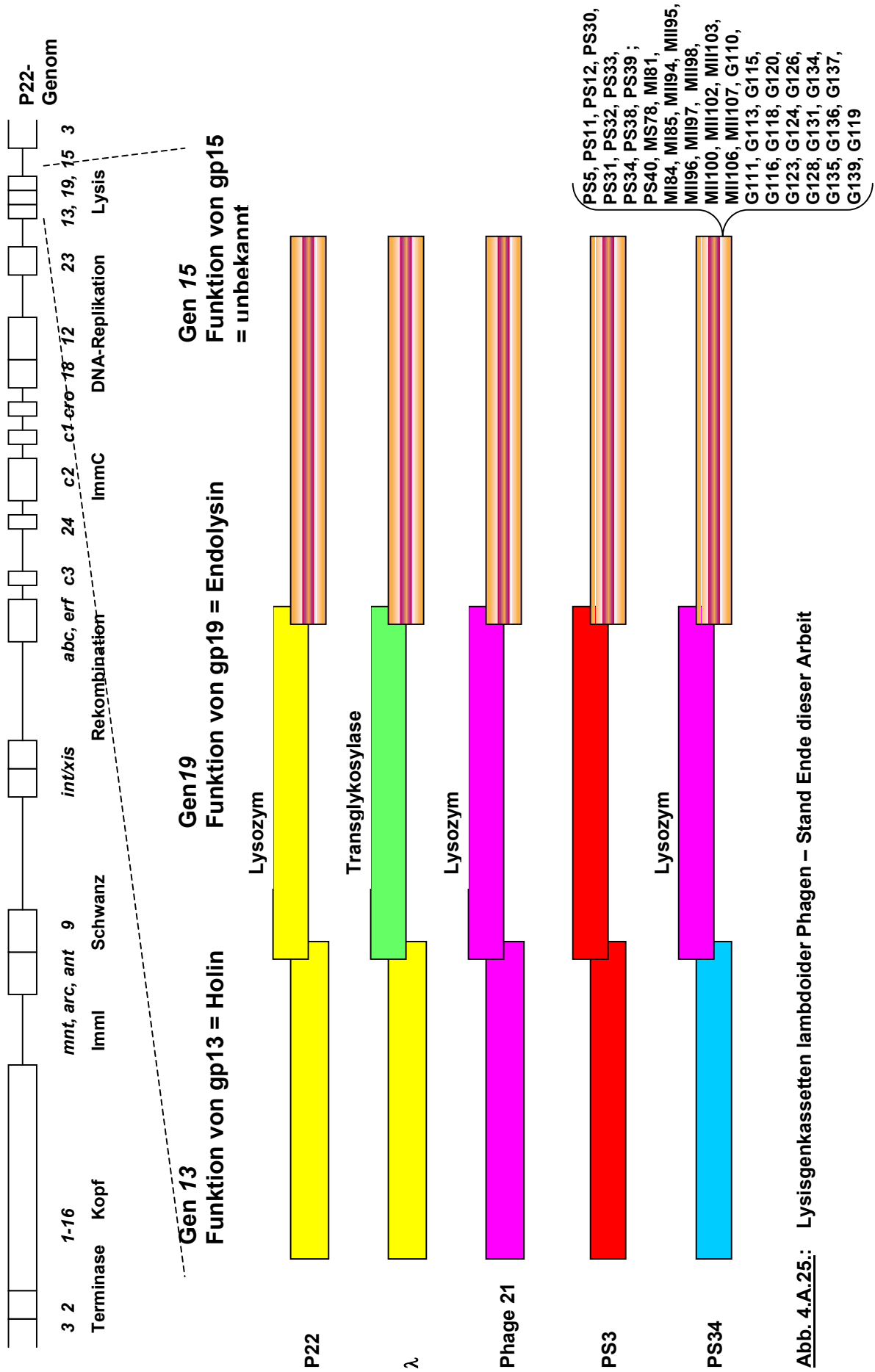


Abb. 4.A.25.: Lysiskassetten lambdoider Phagen – Stand Ende dieser Arbeit

4.B. Diskussion

Trotz der Vielzahl der heute bekannten Bakteriophagen besteht keinerlei Zweifel darüber, daß die beschriebenen Isolate nur einen äußerst geringen Teil der insgesamt existierenden bakteriellen Viren ausmachen [Suttle *et al.*, 1985]. Diese Tatsache wird zusätzlich noch durch die große genetische Variabilität innerhalb der einzelnen Familien kompliziert. 1980 entwickelte Botstein auf der Basis experimenteller Daten aus dem lambdoiden Phagensystem ein Modell der Phagen-Evolution, das die überraschend hohe genetische Variabilität innerhalb der lambdoiden Familie erklärte [Botstein, 1980].

Seiner **Modultheorie** zufolge entstehen neue Phagentypen einfach und schnell durch den Austausch funktioneller Genomsegmente (Module) infolge von Rekombinationsprozessen. Erst die Tatsache, daß alle lambdoiden Phagen den gleichen Genomaufbau besitzen, gibt ihnen die Möglichkeit, funktionelle Segmente zur Erhöhung der Diversität auszutauschen, ohne daß die Gefahr besteht, dabei essentielle Bereiche des Genoms zu verlieren.

Botstein postulierte in seiner Modultheorie, daß diese Austauschereignisse **die** treibende Kraft für die Phagenevolution sind, da die Evolution auf der Ebene der Module es den Phagen ermöglicht, sich effizient an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Die Evolution findet dabei weniger auf der Ebene des intakten Phagen als vor allem auf der Ebene der Module statt. Die Evolution auf Nukleotidebene wird als Folge von Diversifikationsvorgängen innerhalb der einzelnen Segmente angesehen, die jeweils bestimmte Funktionen erfüllen. Dabei behält jedes Segment seine funktionelle Kompatibilität und die zur Rekombination notwendigen homologen Sequenzen, so daß die Neuordnung der einzelnen Segmente problemlos ist und häufig stattfindet.

Da sich auf diese Art nicht nur die große Vielfalt innerhalb der lambdoiden Familie [Casjens *et al.*, 1992a] erfolgreich erklären läßt, sondern auch die anderer Phagenfamilien (z. B. der T4-Phagen von *E. coli* [Kutter *et al.*, 1996; Monod *et al.*, 1997]), wurde die modulare Theorie der Phagenevolution sehr schnell als Standardhypothese für die Evolution der Bakteriophagen im Allgemeinen akzeptiert.

Die Rekombination zwischen lambdoiden Phagen in **natürlichen Populationen** ist bereits seit längerer Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Bereits 1971 vermutete Hershey aufgrund von Heteroduplexanalysen, daß die verschiedenen „ λ -Arten“ durch Rekombinationsvorgänge miteinander in Verbindung stehen [Hershey, 1971], Fragen bzgl. der Häufigkeit und Signifikanz dieser Vorgänge in der Populationsbiologie von lambdoiden Phagen konnten durch seine Experimente jedoch nicht beantwortet werden. Untersuchungen einer Sammlung von lambdoiden *Salmonella*-Phagen aus Naturisolaten neueren Datums ergaben

schließlich, daß für die Neukombination von funktionsfähigen Phagen innerhalb der lambdoiden Familie ein enormes Variationspotential an austauschbaren Modulen zur Verfügung steht [Schicklmaier, 1995].

4.B.1. Die Lysisgenkassette der lambdoiden Bakteriophagen

In Teil **4.A.** der vorliegenden Arbeit wurden die Allelhäufigkeiten und -kombinationen innerhalb **einer** Genkassette, der **Lysisgenkassette**, in einer Phagenkollektion aus Naturisolaten von *Salmonella typhimurium* untersucht. Die von Schicklmaier [Schicklmaier, 1995] durchgeführte Studie der Genomzusammensetzung der *Salmonella*-Phagen ließ darauf schließen, daß mit den bis dahin bekannten Varianten der einzelnen Lysisgene noch nicht die gesamte Palette an verfügbaren Modulen abgedeckt war. Nur 11 von 57 Phagen besaßen die gleichen Lysisgene wie P22. Die restlichen 46 Phagen zeigten Abweichungen zu den bekannten Genen der Phagen P22 und λ (vgl. **4.A.2.**).

Durch die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten alle noch nicht identifizierten Allele der Lysisgenkassette dieser Phagenkollektion aufgeklärt werden.

Die Allele des Gens 13 der lambdoiden Bakteriophagen:

Zu Beginn dieser Arbeit waren zwei Allele des Holingens bei lambdoiden Phagen bekannt: Das S-Gen $_{\lambda}$, das zum Gen 13_{P22} auf Nukleotidebene eine Übereinstimmung von 89 % aufweist, und das S-Gen $_{\text{Phage } 21}$, das zu den beiden ersten keinerlei Ähnlichkeit besitzt. Durch die Untersuchung der Phagen-Kollektion des P22-Astes im Rahmen dieser Arbeit konnten an entsprechender Stelle in den Phagengenomen zwei ORFs identifiziert werden, die weder auf Nukleotid- noch auf Sequenzebene Ähnlichkeiten zu einem der bekannten Holingene aufweisen (Teil **4.A.2.**). Aufgrund der Lage der ORFs wurde angenommen, daß es sich hierbei um zwei neue Allele des Gens 13 handeln muß. Der in Teil **4.A.4** entwickelte Funktionstest für Holine sowie die Strukturanalysen in Teil **4.A.3.** bestätigen diese Vermutung.

Während das Holingen von PS3 (13_{PS3}) nur ein einziges Mal nachgewiesen werden konnte, besaßen 45 der 46 untersuchten Phagen das gleiche Allel von Gen 13 wie PS34 (13_{PS34}).

Die Allele des Gens 19 der lambdoiden Bakteriophagen:

Zu Beginn dieser Arbeit waren innerhalb der lambdoiden Familie drei verschiedene Allele des Gens 19 bekannt: die Transglykosylase des Phagen λ sowie die beiden nicht identischen Lysozyme von P22 und vom Phagen 21. Durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnte dieses Spektrum um ein Allel erweitert werden. Der Phage PS3 besitzt an äquivalenter Position in seinem Genom, zwischen den Leserahmen der Gene 13 und 15 einen ORF. Die Position des ORF sowie die nachgewiesene Ähnlichkeit zu dem PLY118-Protein des *Listeria monocytogenes*-Phagen A118 lassen vermuten, daß es sich hierbei um ein neues Allel von Gen 19 handelt. Ein Funktionstest für gp 19 stand nicht zur Verfügung. Gp PLY118_{A118} wurde 1995 von Loessner et al. entdeckt und als Endopeptidase identifiziert [Loessner et al., 1995]. Innerhalb der lambdoiden Familie wurde bis zum heutigen Zeitpunkt bei keinem Vertreter außer PS3 eine Endopeptidase als lytisches Enzym nachgewiesen.

Eine Ähnlichkeit zur Transglykosylase des Phagen λ konnte bei keinem der geprüften Phagen nachgewiesen werden.

Alle anderen Phagen der Kollektion besitzen das Lysozym des Phagen 21 (R_{Phage21}). Damit gelang es zum ersten Mal, dieses Gen bei Phagen des P22-Astes der lambdoiden Familie nachzuweisen.

Die Allele des Gens 15 der lambdoiden Bakteriophagen:

Für das Gen 15 konnte kein neues Allel nachgewiesen werden. Alle hier untersuchten Phagen besitzen das bisher einzige, bereits bekannte, Allel von Gen 15, daß mit mehr oder weniger großen Abweichungen in allen bis heute untersuchten Vertretern der Lambdoiden vorhanden ist. Eine Sequenzanalyse der Gene 15 der Phagen P22, λ und ES18 zeigte, daß diese Gene eine mosaikartige Struktur besitzen [Schicklmaier, 1995], in der einzelne Elemente enthalten sind, die zwischen den einzelnen Phagen unterschiedliche Homologiegrade besitzen. Dies konnte auch durch die vergleichende Sequenzanalyse der Gene 15 der Phagen PS3, PS34, P22, ES18, Phage 21 und λ in Teil 4.A.2.6. bestätigt werden. Die homologen Elemente erlauben es den Phagen, Regionen hoher Ähnlichkeit als Austauschelemente im Sinne von Mikrohomologien zu nutzen. Sequenzvergleiche der 15er Gene der Phagen P22, λ und HK97 sind bereits als Hinweis für intragenische *Cross-over*-Ereignisse gedeutet worden [Casjens et al., 1992a].

Innerhalb des Leserahmens von Gen *Rz* wurde beim Phagen λ ein weiteres Lysegen, *Rz1*, identifiziert, das für ein Lipoprotein der äußeren Membran kodiert [Hanych et al., 1993; Taylor et al., 1996]. Auch in den Phagen P22, Phage 21, ES18, PS3 und PS34 konnte jeweils ein weiterer ORF in der kodierenden Sequenz von Gen 15 nachgewiesen werden (**Abb. 4.B.1.**).

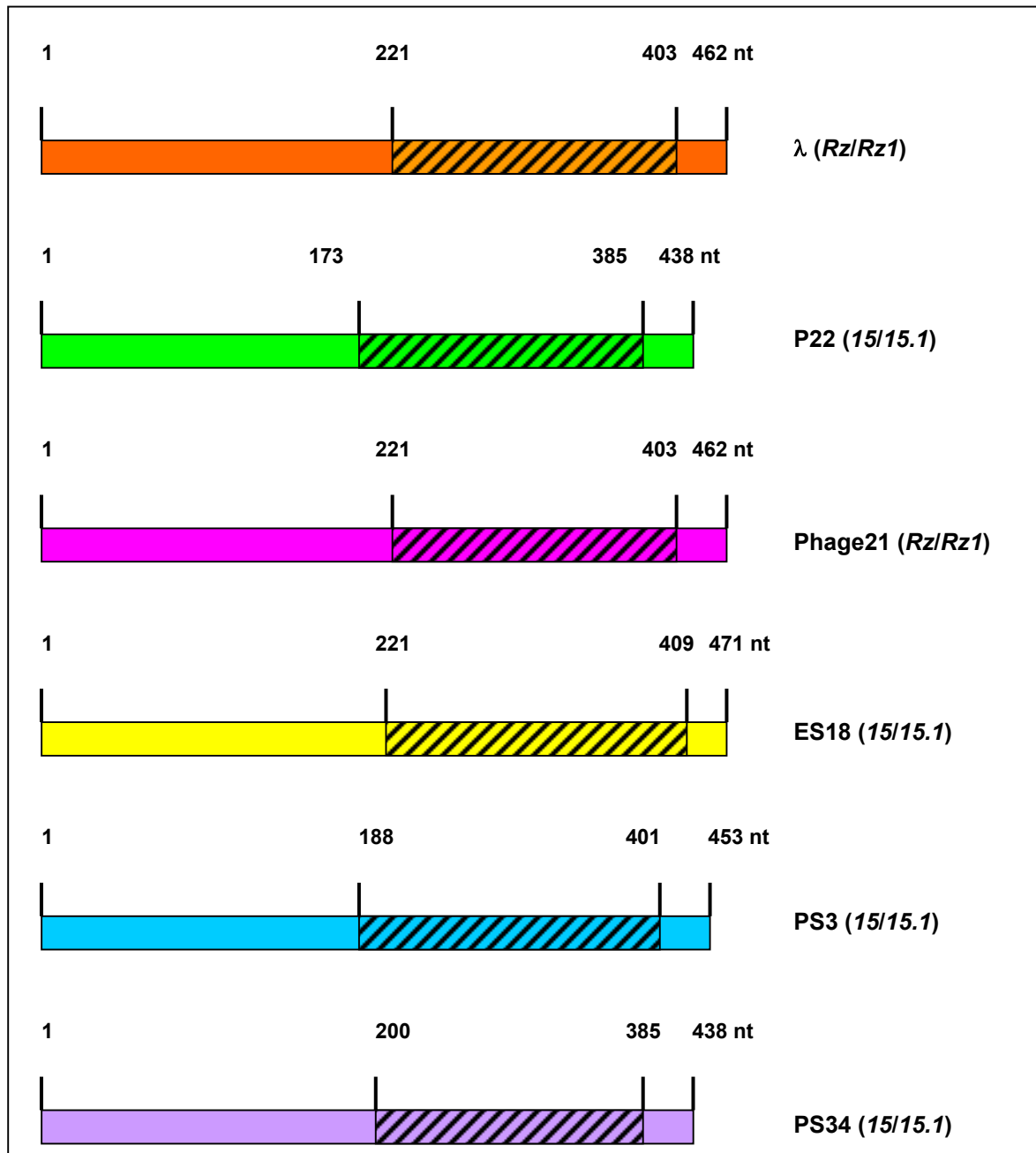


Abb. 4.B.1.: ORFs innerhalb der kodierenden Sequenzen der Gene 15 der Phagen λ , P22, Phage 21, ES18, PS3 und PS34
 nt = Nukleotide
 straffierte Flächen = ORFs innerhalb der kodierenden Sequenzen der Gene 15

Modulkombinationen innerhalb der Lysisgenkassette:

Damit ergibt sich für die gesamte Phagen-Kollektion folgende Zusammensetzung der Lysisgenkassette (**Abb. 4.B.2.**):

11 Phagen besitzen die P22-Allele der Gene 19_{P22} und 13_{P22} und somit die gleiche Genkombination innerhalb der Lysisgenkassette wie P22 selbst. 45 Phagen besitzen das Lysozymgen des Phagen 21 (R_{Phage21}) in Kombination mit dem bislang noch nicht bekannten Allel des Hologens 13 (13_{PS34}). Zu diesen Phagen gehört auch der Phage G119, der als Prophage in den Superinfektionsexperimenten in Teil 3 dieser Arbeit eingesetzt wurde. Nur der Phage PS3, der außer den Kopfgenen auch ansonsten wenig Gemeinsamkeiten mit einem der bekannten lambdoiden Phagen aufweist (**Abb. 4.A.2.**), besitzt sowohl ein weiteres neues Allel von Gen 19 (19_{PS3}) als auch ein neues Allel von Gen 13 (13_{PS3}). Beide Gene wurden bislang weder bei einem Vertreter der beiden Äste der lambdoiden Phagen noch bei einer anderen Familie gefunden.

Innerhalb der Lysisgenkassette existieren damit nach heutigem Wissensstand 4 Allele für Gen 13, 4 Allele für Gen 19 und ein Allel für Gen 15. Dies bedeutet, daß theoretisch 16 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten denkbar sind. Insgesamt wurden bis heute 5 dieser Kombinationen in natürlichen lambdoiden *Salmonella*-Phagen nachgewiesen. Da die Genprodukte der einzelnen Lysisgene der Kassette ihre Funktion völlig unabhängig von den beiden Partnern ausführen können und die Komplementationsfähigkeit einzelner Allele der Kassette gezeigt werden konnte (vgl. Abschnitt 4.A.4.2.), sollte theoretisch jede Kombination lebensfähige Phagen hervorbringen. Hierfür sprechen auch zwei P22/G119-Hybridphagen aus den Superinfektionsexperimenten in Teil 3 dieser Arbeit, die das Lysozymgen des Phagen 21 (R_{Phage21}) in Kombination mit dem Hologen von P22 (13_{P22}) besitzen (in **Abb. 3.A.10.**: HM-Gruppe 2). Zumindest unter Laborbedingungen konnte somit die Lebensfähigkeit einer weiteren Kombinationsmöglichkeit der bekannten Allele innerhalb der Lysisgenkassette nachgewiesen werden.

Die natürlichen Isolate der Gattung *Salmonella*, aus denen die 56 Phagen isoliert wurden, die für die Analysen in dieser Arbeit und die vorangegangenen Untersuchungen von Schicklmaier zur Verfügung standen, stammten aus verschiedensten Quellen (Mensch, Pferd, Huhn, Schwein, Opossum, Truthahn, Katze, Hund, Rind, Hase, Reiher, Abwasser) und Habitaten (9 Herkunftsländer) und wurden über einen Zeitraum von beinahe 30 Jahren gesammelt. Teilweise handelt es sich um Isolate, die aus räumlich begrenzten Gebieten innerhalb zeitlich begrenzter Abschnitte isoliert wurden, teilweise stehen die



















Kombinations-Nr.		A		B	C
1				P22	10
2				λ	0
3				Phage 21	0
4				PS34	45
5				PS3	1
6				rekombinante Nachkommen von G119 und P22	2

Abb. 4.B.2.: Kombinationen der Lysigene in den untersuchten *Salmonella*-Phagen

- A:** Lysigene, farbig gekennzeichnet
B: erstmals nachgewiesen bei
C: Anzahl der Vertreter in der untersuchten Phagenkollektion

Abstammungsgebiete und Isolationszeiträume in keinerlei Verbindung zu einander. Zur besseren Übersicht ist in **Tab. 4.B.1.** die Herkunft der *Salmonella*-Isolate in den einzelnen Kombinationsgruppen der Lysisgenkassette dargestellt. Eine detaillierte Auflistung der einzelnen Phagen findet sich in Abschnitt **2.1.2.**

In keiner der nachgewiesenen Lysisgenkombinationen läßt sich ein Zusammenhang zwischen dem Isolationsgebiet, -zeitraum, -stamm oder der Quelle und der Zusammensetzung der Lysigene feststellen.

Lysisgenkombination	Gen 13_{PS34}, Gen 19_{Phage21}, Gen 15_{P22}
Phagen	PS5, PS10, PS12, PS30, PS31, PS32, PS33, PS34, PS38, PS39, PS40, MI78, MI81, MI84, MI85, MII94, MII95, MII96, MII97, MII98, MII100, MII102, MII103, MII106, MII107, G110, G111, G112, G113, G115, G116, G118, G119, G120, G123, G124, G126, G127, G128, G131, G134, G135, G136, G137, G139
<i>Salmonella</i> -Stämme	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. heidelberg</i> , <i>S. typhimurium Copenhagen</i>
Quellen	Pferd, Opossum, Huhn, Schwein, Hund, Mensch, Truthahn, Katze, Rind
Herkunft	USA (verschiedene Gebiete), Mexiko, Mongolei, Deutschland, Israel
Isolationszeitraum	1986-1994
Lysisgenkombination	Gen 13_{P22}, Gen 19_{P22}, Gen 15_{P22}
Phagen	PS4, PS21, PS22, PS41, PS43, PS44, PS45, PS46, PS49, G121
<i>Salmonella</i> -Stämme	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. saintpaul</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. typhimurium Copenhagen</i>
Quelle	Hase, Reiher, Mensch, Rind, Katze, Abwasser
Herkunft	USA (verschiedene Gebiete), Frankreich, Afrika, Mittlerer Osten, Großbritannien
Isolationszeitraum	<1965-1990
Lysisgenkombination	Gen 13_{PS3}, Gen 19_{PS3}, Gen 15_{P22}
Phagen	PS3
<i>Salmonella</i> -Stämme	<i>S. typhimurium</i>
Quelle	Pferd
Herkunft	USA
Isolationszeitraum	1987

Tab. 4.B.1.: Abstammung der hinsichtlich ihrer Lysisgenkassette untersuchten Phagen

Die Verteilung der einzelnen Gene und Genkombinationen innerhalb der Lysisgenkassette läßt jeweils drei verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu. Dies soll an Hand der folgenden drei Beispiele verdeutlicht werden:

1. Mögliche Ursachen für das Vorhandensein der großen Zahl der Vertreter von Kombination 4 in **Abb. 4.B.2.** (Lysisgene des Phagen PS34: Gen 13_{PS34}, Gen 19_{Phage21} und Gen 15_{P22}):

- Der bereits angesprochene Austausch eines Lysisgens (Gen 19) zwischen einem Vertreter des P22-Astes und des λ -Astes der lambdoiden Familie könnte sich bereits vor längerer Zeit vollzogen haben und dann im Laufe der Jahre zwischen den Generationen konserviert worden sein.
 - Denkbar wäre auch, daß diese Kombination einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Kombinationen hat und sich in relativ kurzer Zeit gegenüber anderen möglichen Kombinationen durchsetzen konnte. Ein Argument hierfür liefern auch die Ergebnisse der Superinfektionsexperimente zwischen G119 und P22 in Teil 3 dieser Arbeit. Die weitaus größte Gruppe (60%) der rekombinanten Nachkommen der beiden Phagen aus den Superinfektionsexperimenten besitzt im Bereich der Lysisgenkassette dieselbe Modulzusammensetzung wie die größte Gruppe der Phagen aus der Kollektion natürlicher *Salmonella*-Isolate. Bei ersten handelt es sich um diejenigen Phagen, die sich im Verlauf der Experimente über mehrere Generationen hin als dominante Gruppe gegenüber anderen möglichen Modulkombinationen durchgesetzt hat. Dabei muß beachtet werden, daß es sich bei diesem Zeitraum evolutiv gesehen natürlich trotzdem um einen kurzen Zeitraum handelt.
 - Der Vollständigkeit halber sollte eine weitere, theoretisch denkbare Erklärungsmöglichkeit für das häufige Auftreten einer bestimmten Modulkombination erwähnt werden: Es sollte stets nach einem Zusammenhang zwischen räumlicher und zeitlicher Isolation der Wirtsstämme gesucht werden. In dem hier vorliegenden Beispiel konnte ein solcher Zusammenhang jedoch nicht nachgewiesen werden (**Tab. 4.B.1.**).
2. Mögliche Ursachen für das einmalige Auftreten von Kombination 5 der Lysisgenkassette in **Abb. 4.B.2.** (Phage PS3: Gen 13_{PS3}, Gen 19_{PS3} und Gen 15_{P22}):
- Dies könnte zum einen ein Hinweis darauf sein, daß die beiden Lysisgene 13_{PS3} und 19_{PS3} oder ihre Kombination dem Genpool der lambdoiden Phagen erst seit kurzer Zeit angehören und sich in der vorhandenen Zeit noch nicht weiter verbreiten konnten.
 - Genauso gut wäre es aber möglich, daß die beiden Lysisgene oder ihre Kombination für ihren Besitzer einen Selektionsnachteil darstellen und sich aus diesem Grund bis heute nicht in dem Maße durchsetzen konnten wie z. B. die Lysisgenkombinationen der Phagen PS34 oder P22.
 - Theoretisch wäre auch hier ein Zusammenhang zum Isolationzeitraum oder -ort denkbar. Aufgrund der verfügbaren Daten lassen sich diesbezüglich jedoch keine Aussagen treffen.

3. Mögliche Ursachen für den fehlenden Nachweis einer Ähnlichkeit zur Transglykosylase von λ bei den geprüften Phagen:
- Gen R_λ gehört dem Genpool der Lambdoiden erst seit relativ kurzer Zeit an.
 - Andere Endolysintypen besitzen gegenüber der Transglykosylase von λ Selektionsvorteile.
 - λ gehört zum λ -Ast der Familie. Zwar konnte ein Austausch eines Lysisgens zwischen den beiden Ästen beobachtet werden, dennoch ist aufgrund von Wirtsbarrieren nicht damit zu rechnen, daß ein solcher Austausch häufig stattfindet. In diesem Fall wäre es also durchaus denkbar, daß räumliche und zeitliche Isolationsbedingungen eine größere Rolle spielen als in den ersten beiden Fällen.

In allen geschilderten Beispielen steht jeweils der **zeitliche Aspekt** dem **selektiven Aspekt** gegenüber. Zum zeitlichen Aspekt muß die Frage beantwortet werden, seit wann ein Allel oder eine Allelkombination dem Genpool angehört und wieviel Zeit es (sie) hatte, um sich gegenüber anderen durchzusetzen. Im Gegensatz dazu gehört zum selektiven Aspekt die Frage, ob ein Allel oder eine Allelkombination Selektionsvor- oder -nachteile gegenüber einem(r) anderen besitzt. In jedem einzelnen Fall muß zusätzlich überprüft werden, ob ein Zusammenhang zu den jeweiligen Isolationsbedingungen besteht.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, daß innerhalb der Lysisgenkassette zwar ein großes Variationspotential vorhanden ist, ein Austausch der Lysisgene in der Natur jedoch bei weitem nicht so häufig vorkommt, wie man es an Hand dieses Potentials erwarten könnte.

Bestimmte Modulkombinationen besitzen offensichtlich Selektionsvorteile gegenüber anderen und setzen sich sogar gegenüber denjenigen Kombinationen durch, die zu Beginn einer Superinfektion (z. B. aufgrund eines gehäuften Vorkommens homologer Sequenzen) vermehrt auftreten. Der Selektionsgedanke auf Modulebene ist nicht neu. Bereits Botstein bezeichnete jedes in der Natur vorkommende Virus als vorteilhafte Modulkombination, selektionierte auf die optimale Funktion in einer bestimmten ökologischen Nische [Botstein, 1980]. Neu dagegen ist der Gedanke, daß Modulkombinationen, die zunächst vermehrt auftreten, da sie entweder vorteilhafter sind oder aufgrund besserer flankierender Homologien leichter durch Rekombination entstehen, im Laufe der Generationen durch andere Kombinationen verdrängt werden, die langfristig gesehen die größeren Überlebenschancen besitzen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der ebenfalls eine Rolle bei der unterschiedlichen Häufigkeit der einzelnen Lysisgenkombinationen spielen könnte, ist das Vorkommen oder Fehlen bestimmter Linkersequenzen, die den zentralen Punkt der Linkerhypothese von Susskind und Botstein [*Susskind und Botstein, 1978*] bilden. Auf diesen Punkt wird im nächsten Kapitel detailliert eingegangen.

4.B.2. Die Modultheorie von Botstein am Beispiel der Lysisgenkassette lambdoider Bakteriophagen

Der Modulbegriff:

Seit ihrer Formulierung im Jahre 1980 wird die Theorie der modularen Evolution von Botstein allgemein als Standardhypothese für die Evolution der Bakteriophagen akzeptiert. Im Laufe der Jahre zeigte sich jedoch, daß die ursprüngliche Theorie in einigen Punkten verschiedener Ergänzungen bedarf.

So weiß man heute, daß der Begriff des Moduls in seiner ursprünglichen Definition von Botstein nicht ausreichend ist. Botstein verstand unter Modulen austauschbare genetische Elemente, die bestimmte biologische Funktionen erfüllen und somit eine funktionelle Einheit darstellen. Es wurde gezeigt, daß die austauschbaren Regionen sehr unterschiedliche Ausdehnungen haben können, die von Gengruppen über einzelne Gene bis hin zu Gensegmenten reichen. Diese Beobachtungen sind nicht neu; bereits vergleichende Sequenzanalysen [*Moore et al., 1981*] sowie Heteroduplexanalysen [*Highton et al., 1990*] in lambdoiden Phagen deuteten auf Übergänge zwischen homologen und heterologen DNA-Segmenten innerhalb von Genen hin. Neuere Untersuchungen zeigen, daß auch bei Phagen außerhalb des lambdoiden Systems die kleinste Austauschereinheit auf der Genebene oder sogar darunter zu finden ist [*Brüssow et al., 1998; Neve et al., 1998*]. Diese Feststellungen stimmen nicht exakt mit der klassischen Moduldefinition überein, da die austauschbaren Einheiten offensichtlich kleiner sind als die funktionellen Komplexe. Aufgrund der Ergebnisse bei der Analyse von *Streptococcus thermophilus*-Phagen schlagen Neve et al. [*Neve et al., 1998*] die Einführung eines neuen Begriffes vor: Während der Modulbegriff in Zukunft zur Bezeichnung eines Sets von funktionell verwandten Phagengenen verwendet werden soll, soll der Begriff des „Rekombinons“ dazu dienen, die austauschbaren DNA-Segmente zu beschreiben.

Dies würde jedoch bedeuten, daß eine völlig neue Definition des allgemein verwendeten und anerkannten Wortes „**Modul**“ benötigt wird. Es erscheint hingegen sinnvoll, die beiden Begriffe „Modul“ und „Modulkassette“ in der folgenden Form zu verwenden: Der Begriff „**Modul**“

wird weiterhin in seiner ursprünglichen Form als genetisch austauschbares Element eingesetzt und als Ergänzung wird die Bezeichnung „**Modulkassette**“ eingeführt. Dieser steht für eine Gruppe von Modulen, die aufgrund ihrer Funktionen in engem Zusammenhang stehen. Dies soll anhand der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lysisgene verdeutlicht werden: Alle drei Lysisgenprodukte können ihre jeweilige Funktion völlig unabhängig voneinander ausüben. Zumindest die Gene 13 und 19 sind jedoch durch das Zusammenspiel ihrer Genprodukte zur Lyse der Zelle und damit zur erfolgreichen Freisetzung der Phagennachkommen unbedingt erforderlich. Im Falle der Lysisgene erscheint es deshalb sinnvoll, die einzelnen Gene als eigenständige austauschbare genetische Einheiten oder Module zu bezeichnen und die Gesamtheit der Lysisgene als Modulkassette oder Gruppe von Modulen, die auf Grund ihrer Funktion eine zusammenhängende Einheit bilden.

Die Linker-Hypothese:

Bereits 1978, bevor das gesamte Genom des Phagen λ sequenziert war, bezeichneten Susskind und Botstein das lambdaoide Genom als ein Set funktioneller Module, die in allen natürlich vorkommenden Vertretern der lambdaoiden Familie vorhanden sind [Susskind und Botstein, 1978]. Sie postulierten, daß diese Module eine Reihe von verschiedenen Allelen in den unterschiedlichen Phagen besitzen und durch funktionslose *Linker*-Segmente voneinander getrennt werden. Diese sind in den einzelnen Phagen in homologer Form an fixierten Punkten im Genom zu finden und dienen lediglich als mögliche Rekombinationspunkte. Durch homologe Rekombination kann es so zur Neuentstehung von Modulkombinationen (d.h. neuen Phagen) kommen. Diese sogenannte *Linker*-Hypothese birgt jedoch einige Schwierigkeiten:

Falls die *Linker*-Sequenzen tatsächlich funktionslos sind, wäre der einzige Selektionsdruck für ihre Konservierung die Fähigkeit, an Austauschvorgängen zur Konstruktion neuer vorteilhafter Kombinationen teilzunehmen. Dieser Selektionsdruck wäre allerdings vergleichsweise gering. Außerdem stellte sich mittlerweile heraus, daß die inzwischen vollständig bekannte Sequenz des λ -Genoms nur sehr wenig funktionslose DNA enthält, die als *Linker*-Sequenz dienen könnte. Allerdings liefert die *Linker*-Hypothese eine Erklärung für die abrupten Übergänge zwischen Regionen hoher Übereinstimmung und nicht-homologen Sequenzen durch extreme Unterschiede in den Sequenzen zu einer oder beiden Seiten der homologen Segmente in den Elternphagen.

Eine Alternative zur Modultheorie und der damit zusammenhängenden Linkerhypothese wurde 1983 von Benedik et al. entwickelt [Benedik et al., 1983]. Sie verneinten die Existenz von Linkersegmenten und postulierten, daß die in allen Phagen vorhandenen homologen Sequenzen von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen und die notwendigen Rekombinationsprozesse bereits vor langer Zeit stattgefunden haben. Die heute stattfindenden Austauschvorgänge kämen demnach nur durch die zufällig noch vorhandene Existenz der homologen Bereiche in einzelnen Phagenpaaren zustande und nicht durch deren Konservierung als Linkersegmente. Nach Benedik müßte man davon ausgehen, daß die lambdoiden Phagen über immer größere Abschnitte immer weiter auseinander driften, da kein ersichtlicher Grund für das Verharren in einem gemeinsamen Genpool vorhanden wäre.

Daß gerade die homologe Rekombination eine wichtige Rolle in der Evolution von Phagen spielt, zeigen die folgenden Beispiele:

- Untersuchungen der Schwanzfasergene in lambdoiden *E. coli*-Phagen ergaben, daß in den hierfür zuständigen Genbereichen verschiedene konservierte Bereiche in so unterschiedlichen Phagen wie λ , P2, P1, T4, T7 und Mu existieren [Haggard-Ljungquist et al., 1992; Casjens et al., 1992a].
- Bei *Streptococcus*-Phagen wird ein zweistufiger Evolutionsprozeß postuliert, der aus einer, evolutiv gesehen, älteren Phase der Entstehung der Basisgenomstruktur durch homologe Rekombinationsvorgänge und einer zweiten neueren Phase der Diversifikation durch Punktmutationen, Deletionen und Insertionen besteht [Desiere et al., 1998].

Durch Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Allele der Lysisgene 13, 19 und 15 sowie ihrer benachbarten Regionen mit den bereits bekannten Sequenzen der Phagen P22, Phage 21 und λ konnten verschiedene Bereiche mit hohen Übereinstimmungen zwischen den bekannten Allelen der einzelnen Gene identifiziert werden. Die Lage dieser ähnlichen Sequenzen, die als mögliche Linkersegmente zur Rekombination dienen könnten, ist in **Abb. 4.B.4.** dargestellt. So findet sich in 5'-Bereich von Gen 19 der Phagen P22, Phage 21 und PS34 ein Bereich, der über 10-18 bp große Übereinstimmungen zeigt. Dieser Bereich könnte ein Beweis für die Existenz von Mikrohomologien innerhalb kodierender Sequenzen sein. Bemerkenswert ist, daß die entsprechenden Homologien nicht in allen untersuchten Phagen gleichzeitig auftauchen. Die Phagen λ und PS3 besitzen diesen Bereich nicht und zeigen auch zueinander keinerlei Ähnlichkeiten. Links von Gen 13 findet sich in den Phagen P22, λ und PS34 eine 200 bis 250 bp lange ähnliche Sequenz, die ebenfalls als möglicher

Rekombinationspunkt dienen könnte. In diesem Bereich befindet sich jeweils eine der sogenannten *chi*-ähnlichen Sequenzen der Phagen λ und P22 (vgl. **Abb. 4.A.9.**). In *E. coli* sind die nur 8 bp langen *Chi*-Sequenzen bevorzugte Stellen bei der Rekombination, die im Durchschnitt einmal alle 5000 bp im *E. coli*-Genom vorkommen. Sie werden von dem multifunktionellen rec-BCD-Enzym erkannt, das dann einen endonukleolytischen Schnitt vier bis sechs Nukleotide 3'-wärts der *chi*-Sequenz setzt. Veränderungen in der Konsensus-Sequenz oder ihr Fehlen verringern die Rekombinationshäufigkeit beträchtlich. Die Phagen P22 und λ besitzen weder *chi*-Sequenzen noch können sie den rec-BCD-Weg der Rekombination nutzen. Statt dessen sind sie durch die dsDNA-Exonuklease-Aktivität des Enzyms gefährdet. Deshalb werden unmittelbar im Anschluß an die Infektion der Wirtszelle phageneigene Proteine als Gegenmaßnahmen gebildet. Diese werden bei P22 durch das *abc*-Gen (**Anti-Rec-BCD**), in λ das analoge *gam*-Gen [Murphy, 1994] kodiert. In beiden Phagen existieren jedoch vier der bereits erwähnten *chi*-ähnlichen Sequenzen, die teilweise durch eine einzige Basensubstitution in die aktive *chi*-Form überführt werden können, die dann vom RecBCD-System des Wirtes erkannt wird [Smith et al., 1981]. Eine dieser *chi*-ähnlichen Sequenzen ist, wie bereits erwähnt, Bestandteil des stromaufwärts von Gen 13 gelegenen 200-250 bp großen Bereichs, der in den Phagen P22, λ und PS34 große Übereinstimmungen besitzt (**Abb. 4.B.4.**).

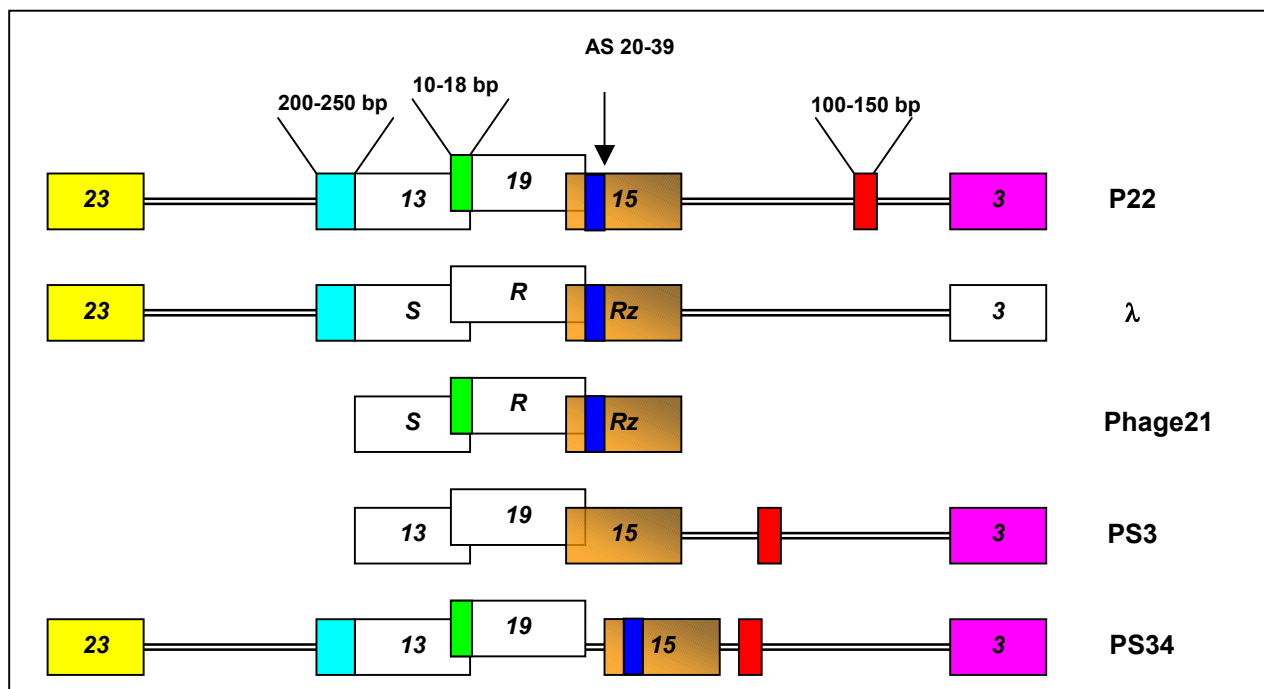


Abb. 4.B.4.: Mögliche Rekombinationspunkte zur Kombination der Lysisgene

Gen 15 selbst bietet durch seinen mosaikartigen Aufbau eine ganze Reihe von möglichen Rekombinationspunkten. Campbell diskutiert unter anderem die Möglichkeit, daß die Terminator-Initiatorsequenz ATGA in den beiden überlappenden Genen *R* und *Rz* des Phagen λ als Mikrohomologie am Austausch der beiden Gene mit anderen Phagen beteiligt sein könnte [Campbell, 1994]. Von Casjens et al. wurde in den Phagen P22, λ , PA2, Phage 21 und HK97 ein homologer Bereich in den Codons 20 - 39 von Gen 15 nachgewiesen, der ebenfalls als Mikrohomologie diskutiert wird [Casjens et al., 1992a]. Diese Beobachtungen decken sich mit den Sequenzvergleichen dieser Region des Phagen PS34 mit der entsprechenden Region von P22 in dieser Arbeit. In PS3 existiert dieser Bereich nicht (**Abb. 4.A.18.**: Basen 60 – 117).

Auch innerhalb der etwas weiter entfernt liegenden benachbarten Bereiche der Lysisgene, z. B. in Gen 23 oder in Gen 3, finden sich genügend Sequenzhomologien, die als Austauschpunkte für die Lysisgenkassette oder Teile davon dienen können. In Teil 5 dieser Arbeit wird durch Sequenzvergleich ausgewählter Phagen gezeigt, daß vor allem Gen 3 unter den lambdoiden Phagen des P22-Astes hochkonserviert ist. In den Phagen P22, PS3 und PS34 findet sich außerdem ein 3'-wärts von Gen 15 gelegener 100-150 bp großer sehr ähnlicher Bereich innerhalb der nicht-kodierenden Region zwischen den Genen 15 und 3, der ebenfalls geeignet für homologe Rekombinationsereignisse scheint.

Auffällig ist, daß die Phagengruppe mit den am häufigsten vertretenen Lysisgenen (Gen 13_{PS34}, Gen 19_{Phage 21}, Gen 15_{P22}) sämtliche möglichen Rekombinationspunkte besitzt, während die nur einmal auftretende Kombination (Gen 13_{PS3}, Gen 19_{PS3}, Gen 15_{P22}) nur einen der identifizierten Rekombinationspunkte (vgl. Abschnitt 4.B.1., **Abb. 4.B.2.**) aufweist. Hier könnte ein weiterer Grund für die bereits in Abschnitt 4.B.1. angesprochene unterschiedliche Häufigkeit der einzelnen Modulkombinationen der Lysisgenkassette zu finden sein.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die einzelnen Allele der Gene der Lysisgenkassette prinzipiell gegeneinander ausgetauscht werden können, so daß wieder lebensfähige Phagennachkommen entstehen. Die nachgewiesenen homologen Sequenzen, die als mögliche Rekombinationspunkte dienen können, sind jedoch nicht in allen untersuchten Phagen vorhanden. Jedes Phagenpaar einzeln betrachtet besitzt jedoch genügend homologe Sequenzen, die einen Austausch von Genen oder Gensegmenten der Lysisgenkassette zwischen ihnen ermöglichen. Mit anderen Worten, jeder Phage kann prinzipiell mit jedem der bekannten Allele der Lysisgene überleben und die Wirtszelle lysieren, er kann aber nicht jedes Gen von jedem Phagen in einem einzigen Schritt übernehmen. Ein Ablauf

über mehrere Zwischenstufen, an denen verschiedene Phagen beteiligt sind, wäre jedoch ohne weiteres denkbar. In den benachbarten Regionen der Lysisgene existieren ausreichende Übereinstimmungen auf der Sequenzebene, um die gesamte Kasette auszutauschen.

Das Vorhandensein von *Linker*-Sequenzen im **klassischen** Sinne als funktionslose Sequenzen muß demnach zumindest für die Gene der Lysiskasette aus folgenden Gründen modifiziert werden:

- Die homologen Sequenzen, die den Phagen als mögliche Punkte zum Austausch verschiedener Gene über homologe Rekombination dienen können, liegen nicht nur zwischen den funktionellen Modulen (unabhängig von der Definition eines Moduls), sondern auch innerhalb der einzelnen Gene.
- Die *Linker*-Sequenzen besitzen sehr unterschiedliche Ausdehnungen, zumeist handelt es sich aber um kleinere Sequenzbereiche, die in der Literatur als Mikrohomologien beschrieben werden.
- Zwischen einzelnen Phagenpaaren lassen sich zwar homologe Bereiche nachweisen, diese sind jedoch nicht, wie ursprünglich vermutet, in **allen** Phagen konserviert.

4.B.3. Wieviele verschiedene lambdaoide Bakteriophagen können theoretisch existieren?

Mit der Untersuchung der Anzahl der verschiedenen modularen Allele und ihrer Kombinationsmöglichkeiten innerhalb der Lysisgenkasette macht die vorliegende Arbeit einen ersten Schritt zur Beantwortung der zu Beginn dieser Arbeit gestellten Frage: „**Wieviele verschiedene lambdaoide Bakteriophagen können theoretisch existieren?**“.

Es konnte gezeigt werden, daß allein für die Lysisgenkasette theoretisch 16 verschiedene Varianten entstehen können, von denen allerdings nur fünf Kombinationen in natürlichen Populationen nachgewiesen werden konnten. Es besteht jedoch kein Grund zu der Annahme, daß die anderen nicht ebenfalls lebensfähig wären, wie durch die Rekombinationsversuche in Teil 3 deutlich wird. In **Abb. 4.B.3.** sind die bis heute bekannten Allele einiger Modulkassetten dargestellt. Dabei sind die verschiedenen Allele der einzelnen Gene jeweils durch unterschiedliche Farben hervorgehoben. Aufgeführt werden neun Genomabschnitte, für die jeweils die Existenz unterschiedlicher Allele nachgewiesen wurde. Die Anzahl der in der Literatur beschriebenen funktionellen Einheiten ist teilweise noch größer. In einem Artikel über

die Evolution von Bakteriophagen sprechen Cajsens et al. allein 11 verschiedene Segmente an, die sie als übergeordnete funktionelle Einheiten auffassen, die wiederum aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind [Cajsens et al., 1992a]. Highton identifizierte durch Heteroduplexanalysen sogar 35 Einheiten, von denen die meisten ebenfalls verschiedene alternative Formen besitzen [Highton et al., 1990]. Selbst unter der Voraussetzung, daß einige der identifizierten Segmente teilweise die gleichen Module beschreiben, wird an dieser Stelle bereits deutlich, daß für den Austausch ein enormes Variationspotential zur Verfügung stehen muß. Für eine Reihe von Modulen wurde ein Austausch bereits nachgewiesen [Botstein und Herskowitz, 1974; Hilliker und Botstein, 1976; diese Arbeit].

Bis heute wurden 5 Allele für die Kopf- und Verpackungsgene, 9 Allele für die Repressorspezifitäten der ImmC-Region sowie 3 bzw. 4 Allele für die DNA-Replikationsgene beschrieben (**Abb. 4.B.3.**) [Campbell, 1994; Schicklmaier, 1995]. In den nicht-essentiellen Regionen (SieA, SieB, Imml) kann es vorkommen, daß ein Phage kein Allel für das entsprechende Gen besitzt. Dies ist durch leere, weiße Kästchen dargestellt und stellt ebenfalls eine weitere Variationsmöglichkeit dar. Unter der Voraussetzung, daß ein Austausch der verschiedenen Allele der einzelnen Segmente innerhalb der Familie der Lambdoiden tatsächlich in jedem Fall zur Entstehung neuer, lebensfähiger Phagen führt, erhält man durch einfache Rechnung 662.080 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. Man kann davon ausgehen, daß von den in der Natur vorkommenden lambdoiden Bakteriophagen bis zum heutigen Zeitpunkt höchstwahrscheinlich nur ein geringer Teil isoliert und charakterisiert wurde. Deshalb ist anzunehmen, daß der tatsächliche Genpool der lambdoiden Familie in Wirklichkeit noch sehr viel größer ist. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, daß Rekombinationsprozesse zum Austausch von funktionellen Einheiten in der Natur bei weitem nicht so häufig vorkommen oder zu lebensfähigen Nachkommen führen, wie dies an Hand der Vielzahl der existierenden Allele der einzelnen Module theoretisch möglich wäre. Offensichtlich findet eben auch auf der Modulebene eine Selektion zugunsten der erfolgreichsten Kombinationen statt, die dann an die Nachkommen weitervererbt werden.

5. Evolution auf Nukleotidebene bei lambdoiden Bakteriophagen

Die Evolution der Phagen findet nach der Modultheorie von Botstein [*Botstein, 1980*] hauptsächlich auf der Ebene der Module statt. Es besteht jedoch kein Zweifel darüber, daß auch die Module mutativen Einflüssen unterliegen und auch bei Phagen eine Evolution im klassischen Sinn auf Nukleotidebene stattfindet. So zeigt das einzige bis heute bekannte Allel des Gens 15 der Lysisgenkassette lambdoider Bakteriophagen eine Reihe von Basensubstitutionen, die sich u.a. durch Mutationen erklären lassen.

Zur Untersuchung der Evolution auf der Ebene einzelner Basen empfiehlt sich die Auswahl einer aus mehreren Genen bestehenden funktionellen Einheit, deren Genprodukte aufgrund ihrer eng zusammenhängenden Funktionen nicht voneinander getrennt werden können. In einem solchen Fall muß davon ausgegangen werden, daß die Nukleotidsequenz der gesamten Kassette wesentlich höher konserviert ist als dies z. B. in der, bereits in Teil 4 ausführlich beschriebenen, Lysisgenkassette der Fall ist. Die hier beteiligten Genprodukte können ihre Funktionen völlig unabhängig voneinander erfüllen. Eine Gruppe von eng miteinander verzahnten Genen und Genprodukten befindet sich bei den lambdoiden Phagen in dem stromabwärts an die Lysisgenkassette angrenzenden Bereich, der die zur Verpackung der Phagen-DNA notwendigen Gene sowie die Gene für die Kopfstruktur enthält. Die unterschiedlichen Verpackungsmechanismen der Phagen P22 und λ wurden bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben. Die Genprodukte der Kopf- und Schwanzregionen dieser beiden Phagen sind so exakt aufeinander abgestimmt, daß ein Austausch einzelner Genprodukte (Subfunktionen) nicht möglich ist [*Campbell und Botstein, 1983*]. Man kann also davon ausgehen, daß die Identifizierung eines zu dieser funktionellen Einheit gehörenden Genes Rückschlüsse auf die anderen an der Verpackung beteiligten Gene und Genprodukte zuläßt. Mit anderen Worten: Besitzen zwei Phagen ein identisches Gen der Kassette, so stimmen höchstwahrscheinlich auch alle anderen Gene der Region überein, sie bilden ein Modul.

Wenn auch innerhalb der Verpackungsregion der Austausch einzelner Gene nicht möglich ist, bleibt den Phagen dennoch die Möglichkeit, ihre vollständigen Verpackungs- und Morphogeneseregionen untereinander auszutauschen. Ein solcher Vorgang könnte z. B. bei dem bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit beschriebenen natürlichen lambdoiden Hybridphagen ES18 stattgefunden haben. Während die rechte Hälfte seines Genoms der von P22 sehr ähnlich ist, muß die linke Hälfte, in der auch die für die Verpackung und Morphogenese verantwortlichen Gene liegen, von einem anderen Vertreter der lambdoiden Familie abstammen. Obwohl ES18 von seinem Aussehen her eher dem Phagen λ gleicht, han-

delt es sich dennoch um einen allgemein transduzierenden Phagen, der genauso wie P22 seine DNA nach einem *headful*-Mechanismus verpackt.

Die Organisation der einzelnen Gene im Operon für die späten Gene, zu denen neben den Genen für die Verpackung und Kopfstruktur auch die Lysogene gehören, wurde bei den lambdoiden Phagen im Laufe der Evolution beibehalten. Ein Vergleich der Phagen P22 und λ zeigt, daß bei beiden stromabwärts an die Lysogene zunächst eine ca. 2000 bp große nicht-essentielle Region anschließt. Hierauf folgen die Gene für die Verpackung und Morphogenese (**Abb. 5.A.1.**).

Innerhalb der Verpackungsregion liegen bei beiden Phagen zunächst die für die DNA-Verpackung notwendigen Gene 3_{P22} und 2_{P22} bzw. $Nu1_{\lambda}$ und A_{λ} , die Gene 1_{P22} bzw. B_{λ} für das *portal protein*, die Gene 8_{P22} bzw. $Nu3_{\lambda}$ für die Gerüstproteine, die Gene 5_{P22} bzw. D_{λ} und E_{λ} für die Hüllenproteine sowie die Kopfgene 4_{P22} und 10_{P22} bzw. Fl_{λ} . Zusätzlich besitzt der Phage λ die Gene W_{λ} , C_{λ} und Fl_{λ} , die zwischen den bereits aufgeführten Genen liegen.

Zwischen den Genen und Genprodukten der Phagen P22 und λ und auch des Phagen 21 sind weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäureebene Übereinstimmungen nachweisbar [Backhaus, 1985; Eppler, 1991]. Allerdings konnten Casjens et al. Ähnlichkeiten in den Hydrophobizitätsprofilen und den Sekundärstrukturen der Proteine $Nu1_{\lambda}$, $1_{\text{Phage 21}}$ und 3_{P22} zeigen [Casjens et al., 1987].

Gp 3_{P22} ist für die Erkennung der *pac-site* auf der Phagen-DNA und damit für den Start des Verpackungsprozesses verantwortlich. In einem Bereich von 120 Basen um die *pac-site* herum wird an einer von sechs möglichen Positionen ein endonukleolytischer Schnitt gesetzt. Hierbei entsteht das linke P22-DNA-Ende des ersten Verpackungszyklus. Die *pac-site* selbst liegt in der kodierenden Region von Gen 3. Unmittelbar an Gen 3 schließt sich überlappend Gen 2 an. Die Genprodukte beider Gene bilden zumindest teilweise einen Komplex und sind notwendig für die erfolgreiche Bildung der Enden sowie die DNA-Verpackung während der Zusammensetzung der Nachkommenviren.

Dank der relativ geringen Sequenzspezifität des gp 3 besitzt P22 die, bereits in der Einleitung beschriebene, Fähigkeit zur allgemeinen Transduktion. Gp 3 erkennt nämlich nicht nur die echte *pac-site*, sondern auch *pac*-ähnliche Signale auf dem Bakterienchromosom und auf Plasmiden. Dadurch ist prinzipiell die Verpackung jedes chromosomal- und plasmidkodierten bakteriellen Gens möglich.

In vorangegangenen Experimenten wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Phagen ihre Fähigkeit zur allgemeinen Transduktion nachgewiesen [Schicklmaier, *persönliche Mitteilung*]. Man kann davon ausgehen, daß alle Phagen des P22-Astes, die die

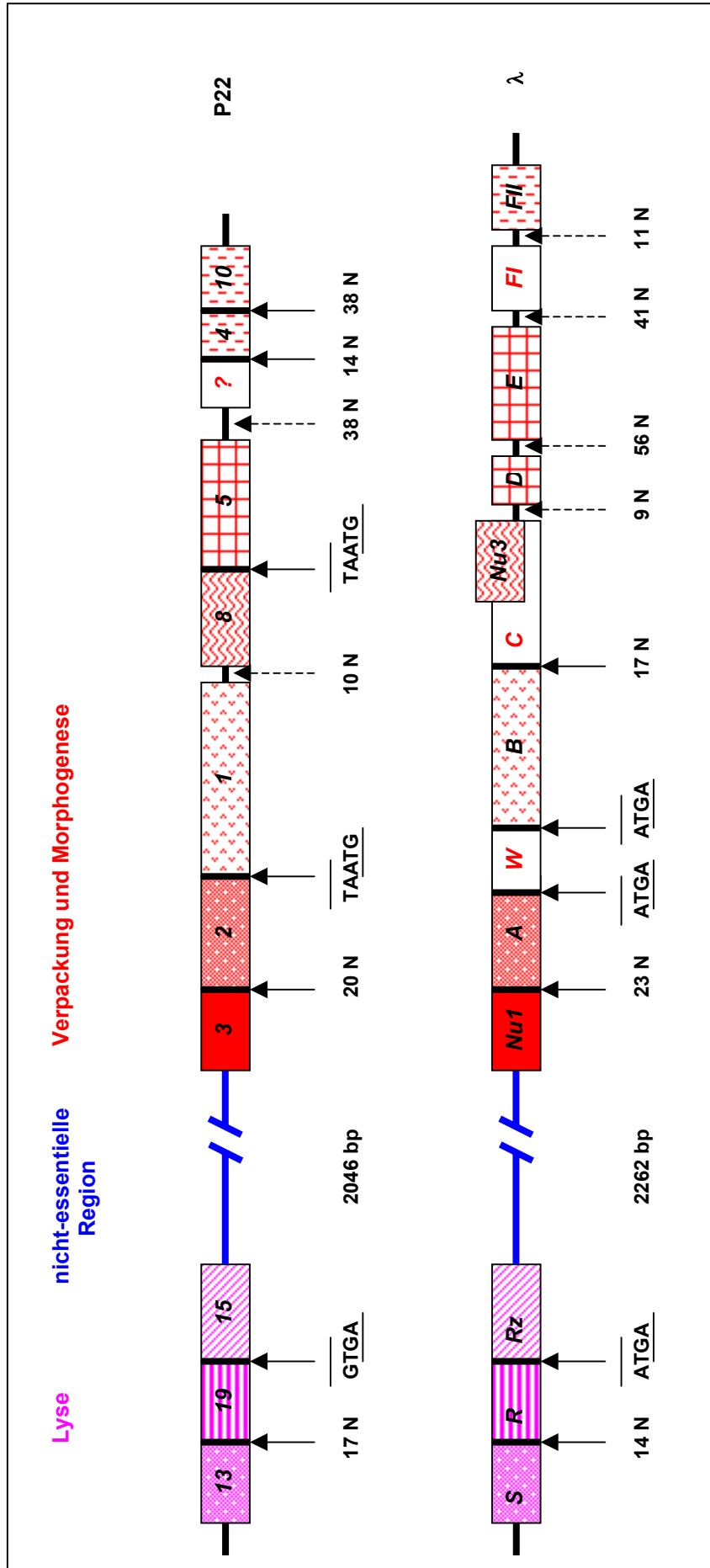


Abb. 5.A.1.: Organisation der Lysis- und Verpackungsgene im späten Operon der Phagen P22 und λ
 Gene mit analogen Funktionen sind durch gleiche Hintergrundmuster gekennzeichnet. Die Funktionen der ohne Hintergrundmuster dargestellten Gene sind unbekannt.
 —————> überlappende Leserahmen benachbarter Gene
 - - - - -> nicht-überlappenden Leserahmen benachbarter Gene

Fähigkeit zur allgemeinen Transduktion besitzen, im Besitz einer *pac-site* sind. Nach einer Infektion durch den Wildtyp von P22 tragen ca. 2 % der freigesetzten Partikel ein DNA-Fragment des Wirts in der Größe des P22-Chromosoms anstelle von Phagen-DNA [Ebel-Tsipis et al., 1972]. Mutationen, die die Frequenz der Transduktanten beeinflussen, wurden nicht nur in P22 [Schmieger, 1971; Schmieger, 1972], sondern auch in den Phagen P1 [Wall und Harriman, 1974; Yamamoto, 1982], T1 [Borchert und Drexler, 1980] und T4 [Wilson et al., 1979] nachgewiesen. Es zeigte sich, daß eine ganze Reihe der Mutationen in P22 zu einer Erhöhung der normalen Transduktionsrate führten [Casjens et al., 1987]. Diese Mutanten werden deshalb als **HT**-Mutanten (**H**igh frequency of **T**ransduction) bezeichnet. In den durch die HT-Mutanten infizierten Wirtszellen finden mehr Verpackungsinitiationen auf dem Wirtschromosom statt als in Zellen, die durch den normalen P22-Wildtyp infiziert werden [Casjens et al., 1992b]. Der DNA-Verpackungsprozeß der HT-Mutationen kann folgendermaßen beeinflußt sein:

- Veränderung der *pac-site* oder der benutzen *pac*-Schnittstellen in der kodierenden Sequenz von Gen 3
- Verringerung der ohnehin schon geringen Sequenzspezifität des gp 3 bei der Erkennung der *pac-site* und dadurch Verursachung zufälliger Verpackungsereignisse an anderen Stellen der Phagen-DNA durch die Benutzung anderer *pac-sites*.

Zur Untersuchung der Evolution auf Nukleotidebene in einer Genkassette, die aufgrund der zusammenhängenden Funktionen ihrer Genprodukte als hoch-konserviert gilt, sollten in Teil **5** der vorliegenden Arbeit die Nukleotidsequenzen der Gene 3 verschiedener Phagen des P22-Astes der lambdoiden Familie verglichen werden. Bei vorangegangenen Untersuchungen von Schicklmaier [Schicklmaier, 1995] stellte sich heraus, daß alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Phagen ein Hybridisierungssignal mit der Sonde S7 (**Tab. 3.A.1.** und **Abb. 3.A.1.**) für Gen 1_{P22} lieferten (**Abb. 4.A.3.**). Die Funktionen der einzelnen an der Verpackung beteiligten Genprodukte sind so exakt aufeinander abgestimmt, daß ein Austausch von Subfunktionen nicht möglich ist. Deshalb konnte, wie bereits erläutert, davon ausgegangen werden, daß alle Phagen, die im Besitz von Gen 1_{P22} sind, auch die übrigen an der Verpackung beteiligten Gene von P22 besitzen, also auch Gen 3.

5.A. Ergebnisse

5.A.1. Sequenzanalyse der Gene 3 lambdoider Phagen

Die Nukleotidsequenzen der Gene 3 der Phagen PS3 und PS34 wurden bereits in Abschnitt 4.A. ermittelt. Zur Sequenzierung von Gen 3_{PS3} wurde der Primer **Gen3-R** verwendet. Ein Vergleich der Sequenzen der Gene 3 der Phagen PS3, PS34 und P22 ergab eine hundertprozentige Übereinstimmung in dem Bereich der drei Phagen, in dem der Primer bindet. Analog dazu wurde durch Sequenzvergleich des Anfangsbereichs von Gen 3 der drei Phagen P22, PS3 und PS34 der Primer **Gen3-F** ausgewählt. Die Lage beider Primer ist in **Abb. 5.A.2.** dargestellt. Da es sich bei Gen 3 um eine hoch-konservierte Region handelt, war anzunehmen, daß diese Primer in den meisten der hier untersuchten Phagen ebenfalls binden. Sequenziert wurden die Phagen PS11, PS30, MI85 und G119. Diese Phagen stammen ebenfalls aus der bereits in Teil 3 und 4 untersuchten Kollektion des P22-Astes der lambdoiden Familie und stellen eine willkürliche Auswahl dar. Gen 3 hat eine Länge von 489 Basen. Die Sequenzierung in beide Richtungen ausgehend vom linken und rechten Ende deckte den gesamten Bereich des Gens ab.

Abb. 5.A.2. und **Abb. 5.A.3.** zeigen einen Vergleich der Nukleotidsequenzen bzw. der Aminosäuresequenzen der untersuchten Phagen mit den publizierten Sequenzen von P22 und LP7. Die Sequenz des Gens 3 von LP7 wurde 1992 von Petri und Schmieger veröffentlicht und zeigt eine Übereinstimmung von 91% zu P22 auf Nukleotidebene [Petri und Schmieger, 1992].

Insgesamt konnten 47 Basensubstitutionen im Vergleich zu den Sequenzen von P22 und LP7 beobachtet werden, aber nur 6 davon führten in unterschiedlichen Phagen zu einem Austausch in der Aminosäuresequenz. Dies lag zum Teil auch daran, daß die meisten Basenaustausche die dritte Position des Triplets betrafen.

	Gen3-F →																				60				
P22	ATG	GC	E	GCA	CCA	AAG	GGC	AAC	CGA	TT	T	TGG	GAG	GCC	CGC	AGT	AG	T	CAT	GGG	CG	A	AAT	CC	T
LP7	ATG	GCA	GCA	CCA	AAG	GGC	AAC	CGA	TT	C	TGG	GAG	GCC	CGC	AGT	AG	C	CAT	GGG	CG	T	AAC	CC	G	
PAZ3	ATG	GCA	GCA	CCA	AAG	GGC	AAC	CGA	TT	C	TGG	GAG	GCC	CGC	AGT	AG	C	CAT	GGG	CG	T	AAC	CC	G	
PAZ11	ATG	GCA	GCA	CCA	AAG	GGC	AAC	CGA	TT	C	TGG	GAG	GCC	CGC	AGT	AG	C	CAT	GGG	CG	T	AAC	CC	G	
PAZ30	ATG	GCA	GCA	CCA	AAG	GGC	AAC	CGA	TT	T	TGG	GAG	GCC	CGC	AGT	AG	T	CAT	GGG	CG	A	AAC	CC	T	
PAZ34	ATG	GCA	GCA	CCA	AAG	GGC	AAC	CGA	TT	T	TGG	GAG	GCC	CGC	AGT	AG	T	CAT	GGG	CG	A	AAC	CC	T	
PAZ85	ATG	GCA	GCA	CCA	AAG	GGC	AAC	CGA	TT	C	TGG	GAG	GCC	CGC	AGT	AG	C	CAT	GGG	CG	T	AAC	CC	G	
PAZ119	ATG	GCA	GCA	CCA	AAG	GGC	AAC	CGA	TT	C	TGG	GAG	GCC	CGC	AGT	AG	C	CAT	GGG	CG	T	AAC	CC	G	
	***	**		***	***	***	***	***	**		***	***	***	***	***	**		***	***	***	***	**		**	

120
 P22 AAA TTC GAA TCG CCT GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAA
 LP7 AAA TTC GAG TCG CCT GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAG
 PAZ3 AAA TTC GAG TCG CCT GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAG
 PAZ11 AAA TTC GAG TCG CCT GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAG
 PAZ30 AAA TTC GAA TCG CCT GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAA
 PAZ34 AAA TTC GAA TCG CCT GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAA
 PAZ85 AAA TTC GAG TCG CCT GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAG
 PAZ119 AAA TTC GAG TCG CCA GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAG
 *** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

180
 P22 GCT AAC CC G CTA TGG GAG ATG AAG GC T TTC TC TAT CA G GGT GAA GT T A TA CAA GAG CCT
 LP7 GCT AAC CCA CTA TGG GAG ATG AAG GC T TTC TCA TAT CAA GGA GAA GT T ACA CAA GAG CCT
 PAZ3 GCT AAC CCA CTA TGG GAG ATG AAG GC T TTC TCA TAT CAA GGA GAA GT T ACA CAA GAG CCT
 PAZ11 GCT AAC CCA CTA TGG GAG ATG AAG GC T TTC TCA TAT CAA GGA GAA GT T ACA CAA GAG CCT
 PAZ30 GCT AAC CCA CTA TGG GAG ATG AAG GC T TTC TCA TAT CA G GGA GAA GT T ACA CAA GAG CCT
 PAZ34 GCT AAC CCA CTA TGG GAG ATG AAG GC T TTC TCA TAT CA G GGA GAA GT T ACA CAA GAG CCT
 PAZ85 GCT AAC CCA CTA TGG GAG ATG AAG GC T TTC TCA TAT CAA GGA GAA GT T ACA CAA GAG CCT
 PAZ119 GCT AAC CCA CTA TGG GAG ATG AAG GC T TTC TCA TAT CAA GGA GAA GT T ACA CAA GAG CCT
 *** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

240
 P22 AT G GCC AAG ATG G G GC G ATG ACC AT T ACT GG C CT C AC T CT G TTC A T GAT GTG ACG CTT
 LP7 AT T GCC AAG ATG AGG GC G ATG ACC AT C ACT GGG CTA ACG CTA TTC CTC GAT GTG ACG CTT
 PAZ3 AT T GCC AAG ATG AGG GC G ATG ACC AT C ACT GGG CTA ACG CTA TTC CTC GAT GTG ACG CTT
 PAZ11 AT T GCC AAG ATG AGG GC G ATG ACC AT C ACT GGG CTA ACG CTA TTC CTC GAT GTG ACG CTT
 PAZ30 AT G GCC AAG ATG AGG GCA ATG ACC AT C ACT GGG CTA ACG CTA TTC CTC GAT GTG ACG CTT
 PAZ34 AT C GCC AAG ATG AGG GCA ATG ACC AT C ACT GGG CTA ACG CTA TTC CTC GAT GTG ACG CTT
 PAZ85 AT T GCC AAG ATG AGG GC G ATG ACC AT C ACT GGG CTA ACG CTA TTC CTC GAT GTG ACG CTT
 PAZ119 AT T GCC AAG ATG AGG GC G ATG ACC AT C ACT GGG CTA ACG CTA TTC CTC GAT GTG ACG CTT
 ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

300
 P22 GA A ACA TGG CG C A CA TA T CG C CT G A GA GAA GA T TTA TCT GA A GTC GTT ACG CGA GCA GA A
 LP7 GAG ACA TGG CGA CAA TAC AGG GTG A GA GAA GAC TTA TCT GAG GTC GTT ACG CGA GCA GAG
 PAZ3 GAG ACA TGG CGA CAA TAC AGG GTG A GA GAA GAC TTA TCT GAG GTC GTT ACG CGA GCA GAG
 PAZ11 GAG ACA TGG CGA CAA TAC AGG GTG A GA GAA GAC TTA TCT GAG GTC GTT ACG CGA GCA GAG
 PAZ30 GA A ACA TGG CG C A CA TA T CG A AT G CGA GAA GA T TTA TCT GAG GTC GTT ACG CGA GCA GAG
 PAZ34 GA A ACA TGG CG C A CA TA T CG A AT G CGA GAA GA T TTA TCT GAG GTC GTT ACG CGA GCA GAG
 PAZ85 GAG ACA TGG CGA CAA TAC AGG GTG A GA GAA GAC TTA TCT GAG GTC GTT ACG CGA GCA GAG
 PAZ119 GAG ACA TGG CGA CAA TAC AGG GTG A GA GAA GAC TTA TCT GAG GTC GTT ACG CGA GCA GAG
 ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

360
 P22 CAG GTC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TC T GGC GCA GCC G T GAC CTT CTC AAC GCT AAC ATC
 LP7 CAA ATC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TC C GGC GCA GCC GA T GAT CTT CTC AAC GCT AAC ATC
 PAZ3 CAA ATC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TC C GGC GCA GCC G T GAT CTT CTC AAC GCT AAC ATC
 PAZ11 CAA ATC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TC C GGC GCA GCC G T GAT CTT CTC AAC GCT AAC ATC
 PAZ30 CAA ATC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TC C GGC GCA GCC G T GAC CTT CTC AAC GCT AAC ATC
 PAZ34 CAA ATC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TC C GGC GCA GCC G T GAT CTT CTC AAC GCT AAC ATC
 PAZ85 CAA ATC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TC C GGC GCA GCC G T GAT CTT CTC AAC GCT AAC ATC
 PAZ119 CAA ATC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TC C GGC GCA GCC G T GAT CTT CTC AAC GCT AAC ATC
 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

420
 P22 AT G GCC CG G GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA G TT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
 LP7 AT C GCC CG C GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA TTT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
 PAZ3 AT C GCC CG C GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA TTT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
 PAZ11 AT C GCC CG C GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA TTT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
 PAZ30 ATA GCC CG T GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA G TT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
 PAZ34 ATA GCC CG T GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA G TT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
 PAZ85 AT C GCC CG C GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA TTT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
 PAZ119 AT C GCC CG C GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA TTT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *



5.B. Diskussion

Die in Abschnitt **5.A.** durchgeführte Sequenzanalyse der Gene 3 einiger lambdoider Phagen zeigt, daß Unterschiede in den Sequenzen der Gene 3 bestehen. Diese sind über die gesamte kodierende Region verteilt. Die Homologiegrade zu den Phagen P22 und LP7 sind in **Tab. 5.B.1.** dargestellt. Sie liegen aufgrund der starken Konserviertheit der Gene der Verpackungsregion mit 91 - 99 % erwartungsgemäß hoch und verursachen nur wenige AS-Substitutionen. Insgesamt besitzen die Gene 3 der analysierten Phagen mehr Übereinstimmungen mit LP7 als mit P22.

Phage	Homologie zu P22 (%)	Anzahl abweichender Basen	Anzahl AS-Austausche	Homologie zu LP7 (%)	Anzahl abweichender Basen	Anzahl AS-Austausche
P22	100	-	-	91	43	7
LP7	91	43	7	100	-	-
PS3	91	41	5	99	3	1
PS11	91	41	5	99	3	1
PS30	95	26	3	95	25	3
PS34	95	26	3	95	25	3
MI85	91	41	5	99	2	1
G119	91	42	4	99	3	2

Tab. 5.B.1.: Homologiegrade der Gene 3 der untersuchten Phagen im Vergleich zu P22 und LP7

Gen 3 ist in zweierlei Weise an der DNA-Verpackung beteiligt:

1. Auf Nukleotidebene durch die Bereitstellung der *pac-site* und der *pac*-Schnittstellen als Erkennungssequenzen für gp3 und andere Proteine.
2. Auf Proteinebene für den Start des Verpackungsprozesses durch die Erkennung der *pac-site*.

Sowohl Änderungen in der Nukleotid- als auch in der Aminosäuresequenz können Auswirkungen auf die Transduktionshäufigkeit der betroffenen Phagen haben. Die Lage der Sequenzabweichungen der Gene 3 der untersuchten Phagen untereinander und im Vergleich zu P22 und LP7 läßt Konsequenzen in Bezug auf ihre jeweiligen Verpackungsprozesse vermuten.

Änderungen auf **Nukleotidebene**, die keine AS-Substitution zur Folge haben, könnten dann einen Einfluß haben, wenn in dem betroffenen Bereich Erkennungssequenzen wie die *pac-site* oder Schnittstellen liegen.

Eine mögliche Sequenz der *pac-site* von P22 (5' AAGATTTATCTG 3') wurde 1987 von Casjens et al. aufgrund von vergleichenden Sequenzanalysen zweier HT-Mutanten mit P22 veröffentlicht [Casjens et al, 1987].

Vergleichende Sequenzanalysen der Gene 3 und Unterschiede in den Transduktionsraten verschiedener chromosomal- und plasmidkodierter Marker zwischen den Phagen P22 und LP7 deuteten zum einen darauf hin, daß LP7 nicht exakt die gleiche *pac-site* erkennt wie P22 und zum anderen, daß die Erkennungsregion des *pac*-Signals komplizierter ist und nicht nur eine bestimmte Basenabfolge darstellt. Es könnte sich vielmehr um ein zweiteiliges Signal handeln oder eine zusätzliche Beeinflussung der spezifischen Erkennung durch eine zweite Sequenz in einiger Entfernung [Petri und Schmieger, 1990]. So fand Backhaus heraus, daß innerhalb der kodierenden Sequenz von Gen 3 eine ganze Reihe von direkten und indirekten Sequenzwiederholungen liegen. Er nahm an, daß eventuell diese symmetrischen Sequenzelemente als Signale für den Erkennungsprozeß der *pac-site* dienen können, dem dann als separater Prozeß die Schnittreaktion folgt [Backhaus, 1985].

Die Analyse einer HT-Mutante von P22 mit veränderter Erkennungsspezifität von gp 3 deutet außerdem auf die Beteiligung einer weiteren, 110 bp stromaufwärts der *pac*-Konsensussequenz gelegenen, Region (+110-Region) bei der Initiation der Verpackung hin, die ebenfalls in der kodierenden Sequenz von Gen 3 liegt [Schmieger, H., 1972; Casjens et al., 1987].

Auch in den hier untersuchten Phagen finden sich in der unmittelbaren Umgebung der +110-Region einige Basensubstitutionen sowie eine AS-Substitution gegenüber P22 (**Abb. 5.B.1.**). Welche sonstigen Sequenzen oder Strukturen noch eine Rolle spielen könnten, ist nach wie vor unklar.

Da die exakte *pac-site* von P22 bislang noch nicht ermittelt wurde, wird im Folgenden zum Vergleich die vermeintliche *pac*-Sequenz von Casjens et al. [Casjens et al., 1987] herangezogen. Die Sequenzen der möglichen *pac-sites* der in dieser Arbeit untersuchten Phagen stimmen entweder mit der von P22 (zwei Phagen) oder mit der von LP7 (vier Phagen) überein (**Abb. 5.B.2.**).

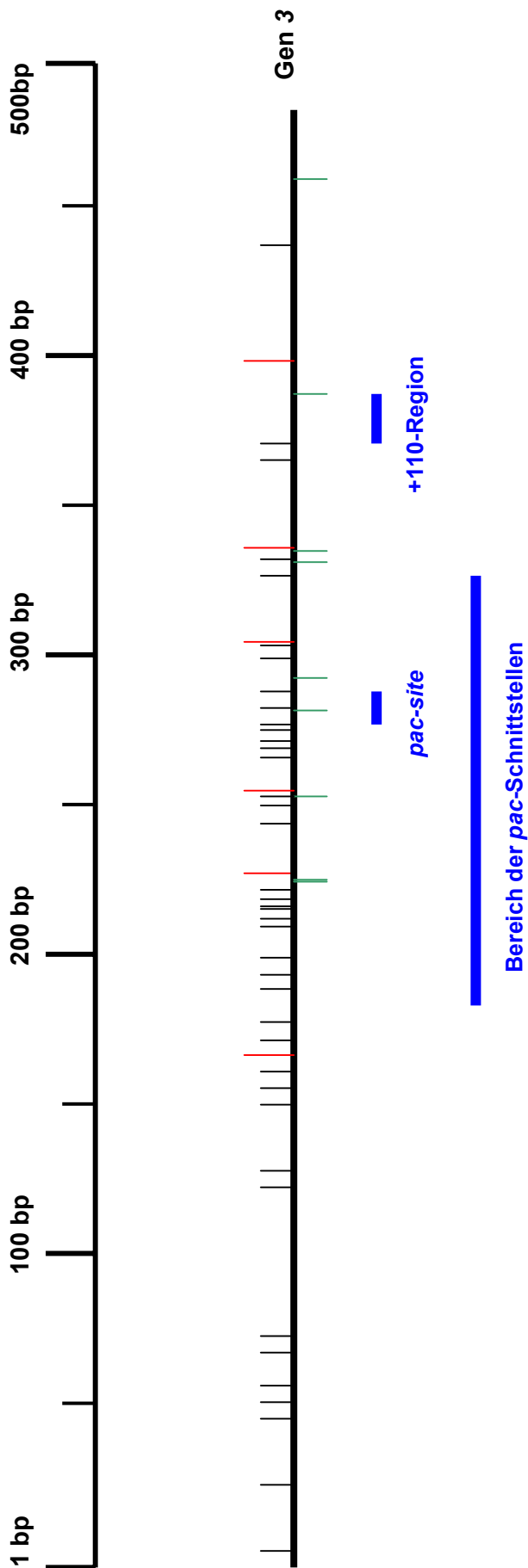


Abb. 5.B.1.: Position der Basensubstitutionen in den Genen 3 der untersuchten Phagen sowie in verschiedenen HT-Mutanten

- Position der Basensubstitutionen, die die AS-Sequenz des Proteins nicht verändern
- Position der Basensubstitutionen, die eine AS-Substitution in der Proteinsequenz bewirken
- Position der Basensubstitutionen verschiedener HT-Mutanten

P22:	5 \	AAGATT	TTATCTG	3 \
PS30:	5 \	AAGATT	TTATCTG	3 \
PS34:	5 \	AAGATT	TTATCTG	3 \
PS3:	5 \	AAGACT	TTATCTG	3 \
PS11:	5 \	AAGACT	TTATCTG	3 \
MI85:	5 \	AAGACT	TTATCTG	3 \
G119:	5 \	AAGACT	TTATCTG	3 \
LP7:	5 \	AAGACT	TTATCTG	3 \

Abb. 5.B.2.: Sequenzen der vermeintlichen *pac-site* der untersuchten Phagen

Sollte es sich bei der von Casjens et al. veröffentlichten Sequenz tatsächlich um die *pac-site* handeln, so sagt allein die Tatsache, daß alle hier untersuchten Phagen eine der beiden *pac*-Sequenzen von P22 oder LP7 besitzen, nicht viel darüber aus, ob alle allgemein transduzierenden Phagen der lambdoiden Familie bei der Verpackung die gleichen Strukturen erkennen oder die DNA an gleichen Positionen im Gen 3 geschnitten wird.

Das linke DNA-Ende des ersten Verpackungszyklus entsteht nicht durch einen endonukleolytischen Schnitt an der *pac-site* selbst, sondern an einer von sechs möglichen Positionen, die in einem Bereich von ca. 120 Basen um die *pac-site* herum liegen. Dies beweisen Ergebnisse aus dem Jahre 1985 von Backhaus [Backhaus, 1985]. Die dort ermittelten Schnittpositionen zeigten eine charakteristische Verteilung (**Abb. 5.B.3.**). Hierbei ist auffallend, daß sich diese Schnittpositionen nicht als exakte Sequenzen definieren lassen, sondern sich jeweils um bestimmte Positionen herum mit einer bestimmten Schnitthäufigkeit anordnen. Dabei sind die zentralen und häufigsten Schnitte jeweils 2 bp voneinander entfernt. Eine eindeutige Konsensussequenz im Schnittbereich selbst kann dabei nicht identifiziert werden. Auch in der um die *pac-site* gelegenen 120 bp große Region, in der die endonukleolytischen Schnitte für das 5'-Ende des ersten Verpackungsprodukts gesetzt werden, findet sich in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Phagen im Vergleich zu P22 eine Anhäufung von Basensubstitutionen (**Abb.5.B.1.**).

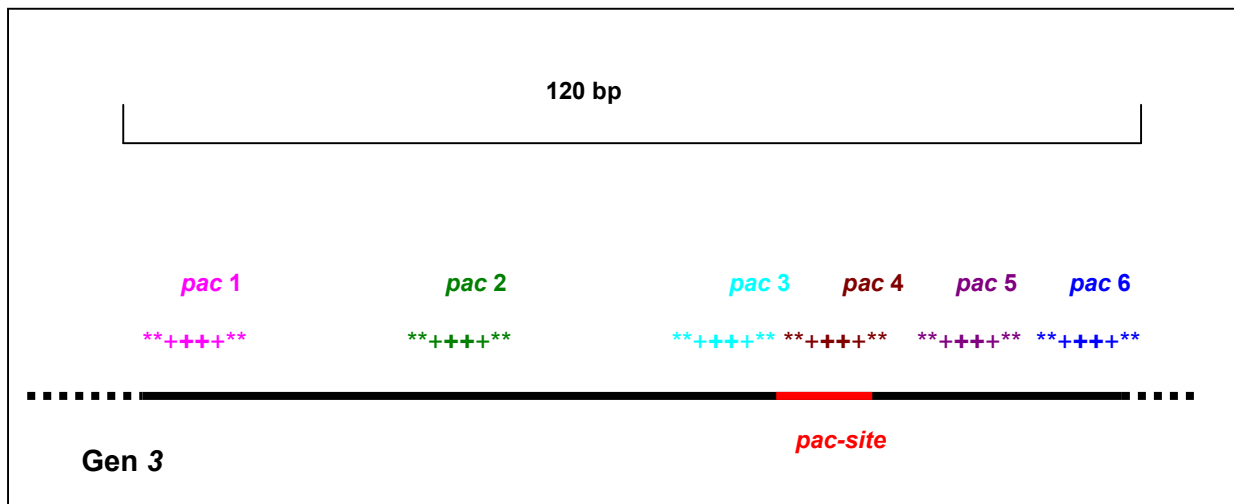


Abb. 5.B.3: Verteilung der *pac*-Schnittstellen in Gen 3 von P22 (modifiziert nach [Backhaus, 1985])
 **++++ zeigt die zum Zentrum hin erhöhte Schnittwahrscheinlichkeit um bestimmte Positionen herum an.

Abweichungen in der **Aminosäuresequenz** von gp 3 könnten zur Folge haben, daß das Protein die *pac-site* oder die entsprechenden Schnittstellen mit unterschiedlicher Effizienz erkennt und sich so die Transduktionshäufigkeit ändert. Dies ist z. B. bei den bereits erwähnten HT-Mutanten der Fall.

Die für die verschiedenen Phänotypen der HT-Mutanten verantwortlichen Mutationen liegen zumeist in der 3'-gelegenen Hälfte von Gen 3 (**Abb. 5.B.1.**), viele davon ebenfalls im 120 bp-Bereich um die *pac-site* herum. Die Basensubstitutionen in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Phagen liegen nur in einem Fall exakt an einer entsprechenden Position der Substitutionen einer HT-Mutante: Durch Austausch einer Base an Position 253 erfolgt ein AS-Austausch in Position 85 von Thr_{P22} zu Ser_{HT-Mutante} und zu Gln_{LP7, PS3, PS11, PS85, PS119}.

Ein Vergleich der Nukleotid- und AS-Sequenzen der Gene 3 der Phagen P22 und LP7 mit den Positionen der Substitutionen von HT-Mutanten von P22 veranlaßte Petri und Schmieger zu der Annahme, daß im Bereich der Basen 330 bis 340 eine Proteindomäne liegt, die einen Einfluß auf die Benutzung der *pac*-Schnittstellen hat (**Abb. 5.B.2.**) [Petri und Schmieger, 1990]. Auch in diesem Bereich finden sich in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Phagen verschiedene Basensubstitutionen.

Die nachgewiesenen Basensubstitutionen sind in der Regel in der dritten Position des Triplets für die jeweiligen AS zu finden. Diese sogenannten neutralen Mutationen haben keinerlei Auswirkung auf die AS-Sequenz des Proteins. Deshalb findet keine Selektion für

oder gegen eine Basensubstitution in der dritten Position des AS-Codons statt. Letzteres ist in einer stark konservierten Region zu erwarten.

Festzustellen bleibt, daß viele der hier nachgewiesenen Basensubstitutionen in Bereichen liegen, denen aufgrund vorangegangener Analysen eine Rolle bei der DNA-Verpackung der lambdoiden Phagen zugeschrieben wird. Um weitergehende Aussagen machen zu können, müßten allerdings eingehendere Untersuchungen folgen, in denen

- a) die Transduktionshäufigkeit der einzelnen Phagen und
- b) die exakten Schnittpositionen des ersten Verpackungsproduktes ermittelt werden sollten.

Wie bereits erwähnt, besitzen Phagen, die nach dem *headful*-Mechanismus verpacken, aufgrund der geringen Sequenzspezifität von gp3 die Fähigkeit zur allgemeinen Transduktion. Die allgemeine Transduktion ist einer der Mechanismen, die eine wichtige Rolle beim horizontalen Gentransfer spielen. Dieser wiederum gewinnt gerade in der heutigen Zeit, in der Nutzen und Risiken an der Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die natürliche Umgebung vermehrt diskutiert werden, verstärkt an Bedeutung.

Hier stellt sich die Frage, ob die Transduktion als Mechanismus des horizontalen Gentransfers jemals völlig verhindert werden kann. Falls sich durch weitergehende Untersuchungen herausstellen sollte, daß die gefundenen geringfügigen Änderungen in der Sequenz der Gene 3 tatsächlich einen Einfluß auf die Transduktionshäufigkeit der entsprechenden Phagen haben, muß diese Frage verneint werden.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Evolutionsmechanismen zu leisten, die zur Entstehung der enormen Vielfalt der lambdoiden Phagen geführt haben. Die einzelnen, in sich geschlossenen Teile, bieten einen Einblick in die Variabilität von Phagengenomen und die Anpassungsfähigkeit des Systems Phage. Dazu wurde die modulare Architektur der Phagengenome unter verschiedenen Gesichtspunkten analysiert:

- In einer natürlichen Phagenpopulation aus Naturisolaten von *Salmonella typhimurium* wurde die Modulzusammensetzung innerhalb einer bestimmten Gruppe von Genen, der **Lysisgenkassette**, untersucht (Teil 4 der vorliegenden Arbeit).

Dabei zeigte sich, daß innerhalb dieser Kassette prinzipiell ein großes Variationspotential vorhanden ist, das jedoch in der Natur bei weitem nicht in dem Maße genutzt wird, wie es auf Grund der Anzahl der existierenden modularen Allele zu erwarten wäre. Dies gilt auch für die theoretisch errechenbare Anzahl lambdoider Phagen insgesamt im Vergleich zur Anzahl bisher nachgewiesener Modulkombinationen. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die einzelnen Allele der Gene der Lysisgenkassette grundsätzlich gegeneinander ausgetauscht werden können, so daß wieder lebensfähige Phagennachkommen entstehen. Auch homologe Sequenzen, die als mögliche Rekombinationspunkte dienen könnten, konnten durch vergleichende Sequenzanalysen in einzelnen Phagenpaaren nachgewiesen werden.

Offensichtlich spielen jedoch weitere Faktoren eine Rolle. Hier sind zum einen Selektionsvor- oder -nachteile eines Allels oder einer Allelkombination zu nennen, aber auch der zeitliche Aspekt darf nicht vernachlässigt werden (Seit wann gehört ein Allel oder eine Allelkombination dem Genpool an und wieviel Zeit hatte es (sie), um sich gegenüber anderen durchzusetzen?). Ein Faktor, der ebenfalls in jedem einzelnen Fall beachtet werden muß, ist die jeweilige Isolationsbedingung des Phagen.

- Die Frage, wie häufig ein Phage von der Möglichkeit des Modultransfers tatsächlich Gebrauch macht, war Gegenstand von Teil 3 der vorliegenden Arbeit. Dazu wurde durch Simulation von Superinfektionen unter Laborbedingungen die Häufigkeit untersucht, mit der unterschiedliche superinfizierende Phagen durch Rekombination auf den Genpool eines Prophagen zurückgreifen. Hierbei zeigte sich, daß die zu Beginn durch Rekombinationsereignisse bevorzugt entstehenden Modulkombinationen nicht mit den Kombinationen identisch sind, die sich im Laufe der Generationen durchsetzen. Verantwortlich hierfür könnten sowohl gehäuft auftretende homologe Sequenzen als auch Selektionsmechanismen sein.

Eine wichtige Rolle kommt auch der zweiten Immunitätsregion ImmI zu, die P22 zusätzlich zur ImmC-Region, besitzt. Durch die Induktion des in der Wirtszelle etablierten Prophagen und Herbeiführung seiner Replikation, besitzen Phagen, die im Besitz eines Antirepressors sind, die Möglichkeit, vermehrt auf den Genpool des Prophagen zurückzugreifen. Auch die Tatsache, daß die meisten der neu entstandenen Phagenrekombinanten im Laufe der Zeit den Antirepressor von P22 "übernommen" haben, spricht dafür, daß Phagen, die einen Antirepressor besitzen, langfristig einen Selektionsvorteil gegenüber Phagen ohne zweite Immunitätsregion haben. Ungeklärt bleibt die Frage, warum dann bislang innerhalb der lambdoiden Familie kein Antirepressor mit einer anderen Spezifität gefunden wurde und auch nur eine geringe Anzahl an Phagen, die den Antirepressor von P22 besitzen. Denkbar wäre, daß der Antirepressor evolutiv gesehen neueren Ursprungs ist und dem Genpool der lambdoiden Familie erst seit kurzem angehört. Rekombinationsprozesse unter geeigneten Laborbedingungen stellen einen häufig ablaufenden Prozeß dar. Allerdings lag die Anzahl der tatsächlich stattgefundenen Rekombinationsereignisse insgesamt höchstwahrscheinlich wesentlich höher als die Anzahl der nachgewiesenen rekombinanten Phagen. Dies liegt zum einen daran, daß nur ein geringer Teil der Regionen, in denen Austauschereignisse möglich waren, überhaupt getestet werden konnte. Zum anderen führten vermutlich nicht alle entstandenen Modulkombinationen zu lebensfähigen Phagennachkommen, sondern ein Teil davon fiel Selektionsmechanismen zum Opfer.

- Zur Untersuchung der Evolution bei Phagen im klassischen Sinn auf Nukleotidebene wurden in Teil 5 dieser Arbeit die Gene 3 der Verpackungsregion verschiedener lambdoider Phagen analysiert. Die Genprodukte dieser Region können aufgrund ihrer eng zusammenhängenden Funktionen nicht voneinander getrennt werden, so daß ein Austausch einzelner Gene nicht möglich ist. Die nachgewiesenen Sequenzunterschiede in den Genen 3 der untersuchten Phagen lassen sich durch Mutationen auf der Ebene einzelner Basen erklären. Beispiele für mutative Veränderungen finden sich auch in Genen, die im Sinne der Modultheorie von Botstein funktionelle Einheiten darstellen. So zeigt das einzige bis heute bekannte Allel des Gens 15 der Lysisgenkassette lambdoider Bakteriophagen eine Reihe von Basensubstitutionen, die sich u. a. durch Mutationen erklären lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die große Vielfalt der lambdoiden Phagen durch unterschiedliche Mechanismen entstanden sein muß. Hierbei spielen Mutationen auf der Ebene einzelner Nukleotide die gleiche Rolle wie bei allen anderen Lebewesen auch. Allerdings bietet die Evolution auf der Ebene einzelner Module den Phagen eine zusätzliche Möglichkeit, sich schnell und effizient an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Dabei

muß jedoch beachtet werden, daß die Entstehung und die Etablierung von neuen Modulkombinationen unterschiedlichen Gesetzmäßigkeiten folgen. Die Selektionsmechanismen, die bei der klassischen Evolution auf der Ebene einzelner Nukleotide greifen, spielen auch bei der Evolution auf der Modulebene eine wichtige Rolle. Nicht jede neu entstandene Modulkombination führt automatisch zu lebensfähigen Phagennachkommen und nicht jede lebensfähige Kombination kann sich dann im Laufe der Generationen tatsächlich gegenüber anderen Kombinationen durchsetzen. So wird es durchaus verständlich, daß trotz des enormen Variationspotentials, das den lambdoiden Phagen aufgrund der Vielzahl der nachgewiesenen Allele in den einzelnen Kassetten zur Verfügung steht, insgesamt bis heute nur ein geringer Teil der theoretisch denkbaren Modulkombinationen nachgewiesen werden konnte.

7. Literaturverzeichnis

- Ackermann, H. W. und Eisenstark, A. (1974)
The present state of phage taxonomy.
Intervirology 3: 210-219
- Ackermann, H. W. (1983)
Current problems in bacterial virus taxonomy.
In: A critical appraisal of virus taxonomy.
Matthews, R. E. F. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, FL: 105-121
- Ackermann, H. W. (1991)
Phagentaxonomie 1990: Stand und Probleme.
BIOforum 11: 419-426
- Ackermann, H. W., DuBow, M. S., Jarvis, A. W., Jones, L. A., Krylov, V. N., Maniloff, J., Rocourt, J., Saffermann, R. S., Schneider, J., Seldin, L., Sozzi, T., Stewart, P. R., Werquin, M. und Wünsche, L. (1992)
The species concept and its application to tailed phages.
Arch. Virol. 124: 69-82
- Ackermann, H. W. (1996)
Frequency of morphological phage descriptions in 1995.
Arch. Virol. 1996, 141 (2): 209-218
- Adams, M. H. (1959)
Phage taxonomy.
In: Bacteriophages.
Interscience Publishers, Inc., New York: 420-437
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990)
Basic local alignment search tool.
J. Mol. Biol. 215: 403-410
- Anderson, T. F. (1960)
On the fine structures of the temperate bacteriophages P1, P2 and P22.
In: Proceedings of the European Regional Conference on Electron Microscopy,
Vol. II, Delft, Holland: 1008-1011
- Anilionis, A. und Riley, M. (1980)
Conservation and variation of nucleotide sequences within related bacterial genomes:
Escherichia coli strains.
J. Bact. 143: 355
- Backhaus, H. und Petri, J. B. (1984)
Sequence analysis of a region from the early right operon in phage P22
including the replication genes 18 and 12.
Gene 32: 289-303
- Backhaus, H. (1985)
DNA packaging initiation of *Salmonella* bacteriophage P22: Determination of cut sites
within the DNA sequence coding for gene 3.
J. Virol. 55: 458-465

- Beckner, M. (1959)
The biological way of thought.
Columbia University Press, New York: 21, 59-80
- Benedik, M., Mascarenhas, D. und Campbell, A. (1983)
The integrase promotor and T_1' terminator in bacteriophages λ and 434.
Virology 126: 658-668
- Bezdek, M. und Amati, P. (1967)
Properties of P22 and a related *Salmonella typhimurium* phage. I. General features and host specificity.
Virology 31: 272-278
- Bienkowska-Szewczyk, K., Lipinska, B. und Taylor, A. (1981)
The R gene product of bacteriophage λ is the murein transglycosylase.
Mol. Gen. Genet. 184: 111-114
- Bläsi, U. und Young, R. (1996)
Two beginnings for a single purpose: the dual start holins in the regulation of phage lysis.
Mol. Microbiol. 21(4): 675-682
- Bonovich, M. T. und Young, R. (1992)
Dual start motif in two lambdaoid S genes unrelated to λ S.
J. Bact. 173: 2897-2905
- Borchert, L. und Drexler, H. (1980)
T1 genes which affect transduction.
J. Virol. 33: 1122-1128
- Botstein, D., Wadell, C. H. und King, J. (1973)
Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in *Salmonella* phage P22.
I. Genes, proteins, structures and DNA maturation.
J. Mol. Biol. 80: 669-695
- Botstein, D. und Herskowitz, I. (1974)
Properties of hybrids between *Salmonella* phage P22 and coliphage λ .
Nature 251: 584-589
- Botstein, D. (1980)
A theory of modular evolution for bacteriophages.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 354: 484-491
- Bradley, D. E. (1967)
Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocines.
Bacteriol. Rev. 31: 230-314
- Brüssow, H., Bruttin, A., Desiere, F., Lucchini, S. and Foley, S. (1998)
Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages - a review.
Virus Genes 16: 95-105

- Campbell, A. (1962)
Episomes.
Adv. Genet. 11: 101-145
- Campbell, A. und Botstein, D. (1983)
Evolution of the lambdoid phages.
In: Lambda II.
Hendrix, R., Roberts, J., Stahl, F. und Weisberg, R. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA: 365-380
- Campbell, A. (1988)
Phage evolution and specification.
In: The Bacteriophages.
Calendar, R. (Hrsg.), Plenum Press, New York, USA: 1-14
- Campbell, A. (1994)
Comparative molecular biology of lambdoid phages.
Ann. Rev. Microbiol. 48: 193-222
- Casjens, S. R. und Hendrix, R. (1974)
Comments on the arrangement of morphogenetic genes of bacteriophage lambda.
J. Mol. Biol. 90: 20
- Casjens, S., Huang, W. M., Hayden, M. und Parr, R. (1987)
Initiation of bacteriophage P22 DNA packaging series: Analysis of a mutant that alters the DNA target specificity of the packaging apparatus.
J. Mol. Biol. 194: 411-422
- Casjens, S., Hatfull, G. und Hendrix, R. (1992a)
Evolution of dsDNA tailed-bacteriophage genomes.
Sem. Virol. 3: 383-397
- Casjens, S., Sampson, L., Randall, S., Eppler, K., Wu, H., Petri, J. B., Schmieger, H. (1992)
Molecular genetic analysis of bacteriophage P22 gene 3 product, a protein involved in the initiation of headful DNA packaging.
J. Mol. Biol. 227: 1086-1099
- Chang, C.-Y., Nam, K., Bläsi, U. und Young, R. (1993)
Synthesis of two bacteriophage lambda S proteins in an in vivo system.
Gene 133: 9-16
- Chang, C.-Y., Nam, K. und Young, R. (1995)
S gene expression and the timing of lysis by bacteriophage λ .
J. Bacteriol 177: 3283-3294
- Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, J. W. und Studier, F.W. (1994)
The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4034-4038
- Davidson, N. und Szybalski, W. (1971)
Physical and chemical characteristics of lambda DNA.
In: The Bacteriophage Lambda.
Hershey, A. D. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA: 45-82

- Desiere, F., Lucchini, S. und Brüssow, H. (1998)
Evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage genomes by modular exchanges followed by point mutations and small deletions and insertions.
Virology 241: 345-356
- D'Hérelle, F. (1917)
Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.
C.R. Seances Acad. Sci., Ser. D., Sci. Natur (Paris) 165: 373-375
- D'Hérelle, F. (1921)
Le bactériophage. Son rôle dans l'immunité.
Masson, Paris: 10 und 93
- Ebel-Tsipis, J., Botstein, D. und Fox, M. (1972)
Generalized transduction by phage P22 in *Salmonella typhimurium*: I. The molecular origin of transducing DNA.
J. Mol. Biol. 71: 433-448
- Eppler, K., Wyckoff, E., Goates, J., Parr, R. und Casjens, S. (1991)
Nucleotide sequence of the bacteriophage P22 genes required for DNA packaging.
Virology 183: 519-538
- Fayard, B., Haefliger, M. und Accolas, J.-P. (1993)
Interactions of temperate bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* with lysogenic indicators affect phage DNA restrictions patterns and host ranges.
J. Dairy Res. 60: 385-399
- Fiandt, M., Hradecna, Z., Lozeron, H. A. und Szybalski, W. (1971)
Electron micrographic mapping of deletions, insertions, inversions, and homologies in the DNAs of coliphages Lambda and Phi80.
In: The Bacteriophage Lambda.
Hershey, A. D. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA: 329-354
- Franklin, N. C. (1985)
Conservation of genome form but not sequence in the transcription antitermination determinants of bacteriophages λ , ϕ 21, and P22.
J. Mol. Biol. 181: 75
- Friedman, D. I. und Ponce-Campos, R. (1975)
Differential effect of phage regulator functions on transcription from various promoters: evidence that the P22 gene 24 and the λ gene N products distinguish three classes of promoters.
J. Mol. Biol. 98: 537-549
- Friedman, D. I. (1988)
Regulation of phage gene expression by termination and antitermination of transcription.
In: The Bacteriophages. Calendar, R. (Hrsg.), Plenum Press, New York, USA: 263-319
- Gemski, P., Baron, L. S. und Yamamoto, N. (1972)
Formation of hybrids between coliphage λ and *Salmonella* phage P22 with a *Salmonella typhimurium* hybrid sensitive to these phages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3110-3114

- Gold, L. (1988)
Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*.
Ann. Rev. Biochem. 57: 199-233
- Haggard-Ljungquist, E., Halling, C. und Calendar, R. (1992)
DNA-sequences of the tail fiber genes of bacteriophage P2: Evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages.
J. Bact. 174 (5): 1462-1477
- Hanych, B., Kedzierska, S., Walderich, B., Uznanski, B. und Taylor, A. (1993)
Expression of the *Rz* gene and the overlapping *Rz1* reading frame present at the right end of the bacteriophage lambda genome.
Gene 129: 1-8
- Hershey, A. D. (1971)
Comparative molecular structure among related phage DNAs.
Carnegie Inst. Washington, Yearbook 1970: 3-7
- Highton, P. J., Chang, Y., Macotte, W. R. Jr. und Schnaitman, C. A.. (1985)
Evidence that the outer membrane proteine *nmpC* of *Escherichia coli* K-12 lies within the defective *qsr'* prophage.
J. Bact. 162: 256
- Highton, P. J., Chang, Y. und Myers, R. J. (1990)
Evidence for the exchange of segments between genomes during the evolution of lambdoid bacteriophages.
Mol. Microbiol. 4: 1329-1340
- Hilliker, S. und Botstein, D. (1976)
Specificity of genetic elements controlling regulation of early functions in temperate bacteriophages.
J. Mol. Biol. 106: 537-566
- Hochschild, A., Irwin, N. und Ptashne, M. (1983)
Repressor structure and the mechanism of positive control.
Cell 32: 319-325
- Hofer, B., Ruge, M. und Dreiseikelmann, B. (1995)
The superinfection exclusion gene (*sieA*) of bacteriophage P22: Identification and overexpression of the gene and localization of the gene product.
J. Bact. 177 (11): 3080-3086
- Huber, J. (1989)
Vergleichende molekulare Untersuchungen der Genomanordnung der *Salmonella*-Phagen ES18 und P22: Identifikation von homologen Bereichen und Charakterisierung eines Genmoduls.
Diplomarbeit
Fakultät für Biologie / Ludwig-Maximilians-Universität München
- Israel, J. V., Anderson, T. F. und Levine, M. (1967)
In vitro morphogenesis of phage P22 from heads and base-plate parts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 284-291

- Johnson-Boaz, R. und Young, R. (1994)
A dominant mutation in the bacteriophage lambda S gene causes premature lysis and an absolute defective plating phenotype.
Mol. Microbiol. 13L 495-504
- Kaiser, K. (1980)
The origin of Q-independent derivatives of phage λ .
Mol. Gen. Genet. 179: 547-554
- Kaiser, K. und Murray, N. E. (1979)
Physical characterisation of the 'Rac prophage' in *E. coli* K-12.
Mol. Gen. Genet. 175: 159-174
- Kaiser, K. und Murray, N. E. (1980)
On the nature of *sbcA* mutations in *E. coli* K-12.
Mol. Gen. Genet. 179: 555
- Katsura, I. (1983)
Tail assembly and injection.
In: Lambda II.
Hendrix, R., Roberts, J., Stahl, F. und Weisberg, R. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA: 331-346
- King, J., Lenk, E. V. und Botstein, D. (1973)
Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in *Salmonella*-phage P22.
II. Morphogenetic pathway.
J. Mol. Biol. 80: 697-731
- Klaus, S., Krüger, D. H. und Meyer, J. (1992)
Bakterienviren.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Kutter, E., Gachechiladze, K., Poglazov, A., Marusich, E., Shneider, M., Aronsson, P., Napuli, A., Porter, D. und Mesyanzhino, V. (1996)
Evolution of T4-related phages.
Virus Genes 11: 285-297
- Lederberg (1951)
Lysogenicity in *E. coli* K-12.
Genetics 36: 560-564
- Lederberg, J. und Tatum, E. L. (1946)
Gene recombination in *E. coli*.
Nature 158: 558
- Loessner, M. J., Wendlinger, G. und Scherer, S. (1995)
Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence of conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes.
Mol. Microbiol. 16: 1231-1241
- Lu, M.-J. und Henning, U. (1992)
Lysis protein T of bacteriophage T4.
Mol. Gen. Genet. 235: 253-258
- Luria, S. E., Darnell, J. E. Jr., Baltimore, D. und Campbell, A. (1978)
General Virology, 3. Auflage, John Wiley, New York

- Lwoff, A. und Tournier, P. (1966)
The classification of viruses.
Ann. Rev. Microbiol. 20: 45-74
- Margolin, P. (1987)
Generalized transduction.
In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology.
Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. und
Umbarger, H. E. (Hrsg.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., USA:
1154-1176
- Matthews, R.E.F. (1985)
Viral taxonomy for the nonvirologist.
Ann. Rev. Microbiol. 39: 451-574
- Maurin, J., Ackermann, H. W., Lebeurier, G. und Lwoff, A. (1984)
Un système des virus - 1983.
Ann. Virol. Inst. Pasteur 135E: 105-110
- Mayr, E. (1940)
Speciation phenomena in birds.
Amer. Natur. 74: 249-278
- Mayr, E. (1982)
The growth of biological thought. Diversity, evolution, and inheritance.
Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge: 251-297
- Miller, R. V. und Kokjohn, T. A. (1987)
Cloning and characterization of the c1 repressor of *Pseudomonas aeruginosa*
bacteriophage D3: a functional analog of phage lambda cI protein.
J. Bact. 169: 1847-1852
- Model, P. und Russel, M. (1988)
Filamentous bacteriophage.
In: The Bacteriophages.
Calendar, R. (Hrsg.), Plenum Press, New York, USA: 375-456
- Monod, C., Repoila, F., Kutateladze, M., Tétart, F und Kritsch, H. M. (1997)
The genome of the pseudo T-even bacteriophages, a diverse group that resembles
T4.
J. Mol. Biol. 267: 237-249
- Moore, D. D., Denniston, K. J. und Blattner, F. R. (1981)
Sequence organization of the origins of DNA replication in lambdoid coliphages.
Gene 14: 91-101
- Murphy, K. C. (1994)
Biochemical characterization of P22 phage-modified *Escherichia coli* Rec BCD
enzyme.
J. Biol. Chem. 269: 22507-22516
- Neve, H., Zenz, K. I., Desiere, F., Koch, A., Heller, K. J. und Brüssow, H. (1998)
Comparison of the lysogeny modules from the temperate *Streptococcus thermophilus*
bacteriophages TP-J34 and Sfi 21: Implications for the modular theory of phage
evolution.
Virology 241: 61-72

- Petri, J. B. und Schmieger, H. (1990)
Isolation of fragments with *pac* function for phage P22 from LP7 DNA and comparison of packaging gene 3 sequences.
Gene 98: 47-55
- Petri, J. B. und Schmieger, H. (1992)
Sequence comparison among DNA fragments from different sources with *pac* site function for the packaging apparatus of *Salmonella* phage P22.
Intervirology 33: 103-108
- Poteete, A. R. (1988)
Bacteriophage P22.
In: The Bacteriophages.
Calendar, R. (Hrsg.), Plenum Press, New York, USA: 647-682
- Pschyrembel (1998)
Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage
Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Ptashne, M. (1989)
Genregulation.
Springer Verlag, Berlin
- Raab, R., Neal, G., Garrett, J., Grimaila, R., Fusselman, R. und Young, R. (1986)
Mutational analysis of bacteriophage lambda lysis gene S.
J. Bacteriol. 167: 1035-1042
- Raab, R., Neal, G., Sohaskey, C., Smith, J. und Young, R. (1988)
Dominance in lambda S mutations and evidence for translational control.
J. Mol. Biol. 199: 95-105
- Ranade, K. und Poteete, A. (1993)
Superinfection exclusion (*sieB*) genes of bacteriophages P22 and λ .
J. Bact. 175 (15): 4712-4718
- Rennell, D. und Poteete, A. R. (1989)
Genetic analysis of bacteriophage P22 lysozyme structure.
Genetics 123: 431-440
- Rennell, D. und Poteete, A. R. (1985)
Phage P22 lysis genes: nucleotide sequences and functional relationships with T4 and lambda genes.
Virology 143: 280-289
- Riley, M. und Anilionis, A. (1980)
Conservation and variation of nucleotide sequences within related bacterial genomes: *Enterobacteriaceae*.
J. Bact. 143: 366
- Romero, A., Lopez, R. und Garcia, P. (1990)
Sequence of the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage HB-3 amidase reveals high homology with the major host autolysin.
J. Bact. 172: 5064-5070
- Roth, J. R. und Hoppe, I. (1971)
Genetics 71: 553

- Sauer, R. T., Yocum, R. R., Doolittle, R. F., Lewis, M. und Pabo, C. O. (1982)
Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure.
Nature 298: 447-451
- Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D.F. und Petersen, G. B. (1982)
Nucleotide sequence of bacteriophage Lambda DNA.
J. Mol. Biol. 162: 729-773
- Schicklmaier, P. (1995)
Allgemein transduzierende Bakteriophagen bei *Salmonella typhimurium*: Häufigkeit ihres Vorkommens in Naturisolaten und ihre verwandtschaftlichen Beziehungen.
Dissertation
Fakultät für Biologie / Ludwig-Maximilians-Universität München
- Schicklmaier, P. und Schmieger, H. (1997)
Sequence comparison of the genes for immunity, DNA replication, and cell lysis of the P22-related *Salmonella* phages ES18 and L.
Gene 195: 93-100
- Schicklmaier, P., Wieland, T. und Schmieger, H. (1999)
Molecular characterization and module composition of P22-related *Salmonella* phage genomes.
J. Biotechnol. 73 (2-3): 185-194
- Schlegel, H. G. (1992)
Allgemeine Mikrobiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Schmieger, H. (1971)
A method for detection of phage mutants with altered transducing ability.
Mol. Gen. Genet. 110: 378-381
- Schmieger, H. (1972)
Phage P22 mutants with increased or decreased transduction abilities.
Mol. Gen. Genet. 119: 75-88
- Schmieger, H. (1982)
Packaging signals for phage P22 on the chromosome of *Salmonella typhimurium*.
Mol. Gen. Genet. 187: 516-518
- Sellherr, U. (1997)
Untersuchung der Immunität von Phagen aus klinischen Isolaten von *Salmonella typhimurium*.
Diplomarbeit
Fakultät für Biologie / Ludwig-Maximilians-Universität München
- Simon, M. N., Davis, R. W. und Davidson, N. (1971)
Heteroduplexes of DNA molecules of lambdoid phages: Physical mapping of their base sequence relationships by electron microscopy.
In: The Bacteriophage Lambda.
Hershey, A. D. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA: 313-328

- Skalka, A. und Hanson, P. (1972)
Comparison of the distributions of nucleotides and common sequences in deoxyribonucleic acid from selected bacteriophages.
J. Virol. 9: 583ff.
- Smith, G. R., Comb, M., Schultz, D. W., Daniels, D. L. und Blattner, F. R. (1981)
Nucleotide sequence of the chi recombinational hot spot chi+D in bacteriophage lambda.
J. Virol. 37: 336-342
- Smith, D. L. (1998)
Purification and biochemical characterization of the bacteriophage λ holin.
Ph.D. dissertation
Texas A&M University, College Station
- Stanssens, P., Remaut, E. und Fiers, W. (1985)
Alterations upstream from the Shine-Dalgarno region and their effect on bacterial gene expression.
Gene 36: 211-223
- Strathern, A. und Herskowitz, I. (1975)
Defective prophage in *Escherichia coli* K-12 strains.
Virology 67: 136
- Susskind, M. M. und Botstein, D. (1975)
Mechanism of action of *Salmonella* phage P22 antirepressor.
J. Mol. Biol. 98: 413-424
- Susskind, M. M. und Botstein, D. (1978)
Molecular Genetics of Bacteriophage P22.
Microbiol. Rev. 42: 385-413
- Susskind, M. M. und Youderian, P. (1983)
Bacteriophage P22 antirepressor and its control
In: Lambda II.
Hendrix, R., Roberts, J., Stahl, F. und Weisberg, R. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA: 347-362
- Suttle, C., Chan, A. und Cottrell, M. (1985)
Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity.
Nature 347: 467-469
- Szybalski, W. und Szybalski, E. H. (1974)
Visualization of the evolution of viral genomes.
In: Viruses, Evolution and Cancer.
Academic Press Inc., New York, USA: 563-582
- Taylor, A., Kedzierska, S. und Wawrzynów, A. (1996)
Bacteriophage λ lysis gene product modified and inserted into *Escherichia coli* outer membrane: Rz1 lipoprotein.
Microbial Drug Resistance 2: 147-153.
- Valenzuela, D. und Ptashne, M. (1989)
P22 repressor mutants deficient in co-operative binding and DNA loop formation.
EMBO Journal 8 (13): 4345-4350

- Vogel, W. und Schmieger, H. (1986)
Selection of bacterial *pac* sites recognized by *Salmonella* phage P22.
Mol. Gen. Genet. 205: 563-567
- Wall, J. und Harriman, P. (1974)
Phage P1 mutants with altered transduction abilities for *Escherichia coli*.
Virology 59: 532-544
- Weisberg, R. A. (1987)
Specialized transduction.
In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology.
Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. und
Umberger, H. E. (Hrsg.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., USA:
1169-1176
- Wilson, J., Young, K. und Edlin, G. (1979)
High frequency generalized transduction by bacteriophage T4.
Nature (London) 280: 80-82
- Winnacker, E.-L. (1990)
Gene und Klone.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Yamamoto, N. (1969)
Genetic evolution of bacteriophage, I. Hybrids between unrelated bacteriophages P22
and Fels2.
Proc. Nat. Acad. Soc. 62 (1): 63-69
- Yamamoto, Y. (1982)
Phage P1 mutant with decreased abortive transduction.
Virology 118: 329-344
- Young, R. (1992)
Bacteriophage lysis: mechanism and regulation.
Microbiol. Rev. 56: 430-481
- Young, R. und Bläsi, U. (1995)
Holins: form and function in bacteriophage lysis.
FEMS Microbiol. Rev. 17: 191-205
- Zagotta, M T. und Wilson, D.B. (1990)
Oligomerization of the bacteriophage lambda S protein in the inner membrane of
Escherichia coli.
J. Bact. 172: 912-921
- Zinder, N. D. und Lederberg, J. (1952)
Genetic exchange in *Salmonella*.
J. Bact. 64: 679-699

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken,

bei Herrn Prof. Dr. Schmieger, der mir das Thema überlassen hat und meine Arbeit stets mit unzähligen wertvollen Tips, vielen konstruktiven Vorschlägen und ständiger Gesprächsbereitschaft begleitet hat. Erwähnen möchte ich aber auch das hervorragende Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe, an dem er aufgrund seines kollegialen Führungsstils erheblich beteiligt war.

bei Petra Schicklmaier für ihre unermüdliche wertvolle Hilfe bei vielen theoretischen und praktischen Fragen.

bei Brigitte Zavari und Ute Bergmann für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung in allen Laborfragen und bei zahlreichen Experimenten. Beiden möchte ich aber vor allem für ihre Freundschaft auf privater Ebene danken, die mir oftmals über „den harten Laboralltag“ hinweg geholfen hat.

bei Elisabeth Moser für die vielen konstruktiven Gespräche.

bei meinen Großpraktikanten Michael John, Holger Laux, Gerrit Vollmer und Sabine Därr für ihre engagierte Mitarbeit und die vielen verwertbaren Ergebnisse für diese Arbeit.

bei Michaela Sander, Helmut Rausch und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das nette Arbeitsklima und viele gute gemeinsame Mittagessen.

bei Ingrid und Frank für das Babysitten in der langen Endphase dieser Arbeit.

TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Name : Annette Zimmer, geb. Arnold
Geburtsdatum : 28.09.1966
Geburtsort : Trier
Familienstand : verheiratet / 1 Tochter
Staatsangehörigkeit : deutsch

Schulbildung:

1972 – 1976: Grundschule St. Matthias, Trier
1976 – 1985: Treviris-Gymnasium-Trier

Abschluss:
22.06.1985: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

01.09.1985 – 31.08.1987: Staatliche Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin, Trier

Abschluss:
25.09.1987: Medizinisch Technische Laboratoriumsassistentin (MTLA)

Berufstätigkeit:

01.02.1988 - 30.09.1988: St. Josef-Krankenhaus, Zell/Mosel als MTLA

01.06.1994 - 31.12.1999: Lehrstuhl für Genetik und Mikrobiologie der Universität München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schmieger,
01.06.1994 - 31.12.1994: Promotionsstipendium der Ludwig-Maximilians-Universität München
01.01.1995 – 31.12.1999: wissenschaftliche Mitarbeiterin

Studium:

01.10.1988 – 15.03.1994: Universität Kaiserslautern
Studienfach: Biologie/Diplom

Abschluss:
15.03.1994: Diplom-Biologin

21.06.1994 - 30.09.1999: Ludwig-Maximilians-Universität München
Studienfach: Promotion Biologie

Scheuring, 20.05.2001