

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel in Kiel

**Funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung
des Lysogeniemoduls des temperenten
Streptococcus thermophilus Phagen TP-J34**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Sabrina Koberg

Kiel, 2017

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel in Kiel

**Funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung
des Lysogeniemoduls des temperenten
Streptococcus thermophilus Phagen TP-J34**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Sabrina Koberg
Kiel, 2017

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Knut J. Heller
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Schönheit
Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2017
Zum Druck genehmigt: 23.03.2017
gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

Für meine Familie und meinen Freund Nils

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Knut J. Heller für die liebevolle und umfangreiche Betreuung seit meiner Diplomarbeit aussprechen. Von seinem enormen Wissen, seinen hilfreichen Ideen und seiner Geduld habe ich sehr profitieren können. Schnell habe ich gemerkt, dass uns eine gewisse Leidenschaft für die Phagengenetik verbindet. Meinem Laborleiter Dr. Horst Neve danke ich für sein Engagement, die gute Betreuung und die Fürsorge. Herrn PD Dr. Charles M. A. P. Franz möchte ich dafür danken, dass er sich immer die Zeit für jeden einzelnen genommen hat und sich stark für eine Zukunft der Doktoranden am MBT eingesetzt hat. Meiner Freundin, Natalia Wagner, auch liebevoll „Schatz“ genannt, möchte ich für eigentlich alles danken. Ohne sie wäre die Zeit im Labor nur halb so schön und vor allem nicht so lustig gewesen. Bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des MBT bedanke ich mich für die wundervolle und familiäre Arbeitsatmosphäre. Sie sind der Grund, warum ich immer mit einem Lächeln zur Arbeit gegangen bin. Insbesondere danke ich Petra Horn und Michaela Steinke sowie den Doktoranden Bo Li, Erik Brinks und Gregor Fiedler, die für mich mehr als nur Arbeitskollegen/innen geworden sind, für die tolle Zeit. Dr. Diana Meske und Dr. Jan Kabisch möchte ich dafür danken, dass sie immer Ansprechpartner für mich waren und allen ein Gefühl des Zusammenhalts vermittelt haben. Außerdem geht mein Dank an Angela Back für die Anfertigung der TEM-Phagenbilder. Weiterhin danke ich Dr. Wilhelm Bockelmann, Dr. Christina Böhnlein, Dr. Gyu-Sung Cho, Gesa Gehrke, Kirsten Gonda, Britta Kaminski, Inka Lammertz, Gisela Paasch, Frauke Repenning und Niels Rösch für die tolle Zusammenarbeit. Auch allen Azubis, Praktikanten/innen, Bachelorstudenten/innen und Masterstudenten/innen, die ich hier nicht alle aufzählen kann, möchte ich dafür danken, dass sie immer frischen Wind in das Institut gebracht haben. Leider ist hier nicht genügend Platz, um von den vielen schönen Betriebsausflügen, Weihnachtsfeiern, Konferenzen, Frühstücks- und Kochszenarien am MBT zu erzählen. Natürlich bedanke ich mich bei meiner Mama, meinen Großeltern, meinem Onkel und meiner Tante sowie bei meiner Cousine und meinem Cousin für die Geborgenheit und das schöne Gefühl zu wissen, dass sie unendlich stolz auf mich sind und immer an mich glauben. Ganz besonders und von Herzen danke ich meinem Freund Nils, der mein größter Halt war, mir mit konstruktiver Kritik oftmals weitergeholfen hat und der in schwierigen Zeiten immer für mich da war. Ich widme diese Arbeit meinem Papa, den ich unendlich doll vermisse.

Danke

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft verfasst. Sie wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, wurde nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Kiel, den

Sabrina Koberg

Teile der während dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse wurden in dem folgenden Artikel veröffentlicht:

Koberg, Sabrina, Mohamed, M. D. A, Faulhaber, K., Neve, H., Heller, K. J. (2015). Identification and characterization of *cis*- and *trans*-acting elements involved in prophage induction in *Streptococcus thermophilus* J34. *Mol Microbiol* 98(3):535-552.

Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen der Nuklein- und Aminosäuren erfolgen gemäß der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Weiterhin gelten die Abkürzungen der SI-Einheiten (*Le Système International d'Unités*), die nachfolgend nicht gesondert aufgeführt sind.

aa	Aminosäure(n)
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ant/Ant	Antirepressor
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
attB	Bakterien-Anheftungsstelle (<i>bacterial attachment site</i>)
attP	Phagen-Anheftungsstelle (<i>phage attachment site</i>)
ATP- γ -S	Adenosin-5'-[γ -thio]triphosphat-Tetralithiumsalz
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
coh/Coh	Cro-homologer Repressor
cos	kohäsive Enden (<i>cohesive site</i>)
crh/Crh	CI-Repressor homolog
CRISPR-Cas	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats loci coupled to CRISPR-associated genes</i>
dam	Desoxyadenosin-Methylase
DEPC	Diethyldicarbonat
DMK	Deutsches Milchkontor GmbH
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig (<i>double-stranded</i>)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
DUF	<i>domain of unknown function</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
Em ^R	Erythromycin-Resistenz
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ExPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>

Gp	Genprodukt
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
<i>hdiR/HdiR</i>	<i>heat and DNA damage inducible regulator</i>
HPSF	<i>high purity salt free</i>
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
<i>int/Int</i>	Integrase
kDa	Kilodalton
<i>ltp/Ltp</i>	Lipoprotein des temperenten Phagen TP-J34
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MMC	Mitomycin C
MOR	<i>modulator of repression</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte (<i>optical density</i>)
<i>orf/ORF</i>	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
<i>pac</i>	<i>packaging site</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PbE	Plauebildende Einheiten
PBS	phosphatgepufferte Saline
PEG	Polyethylenglycol
<i>ProtParam</i>	<i>protein parameters</i>
<i>PSIPRED</i>	<i>PSI-blast based secondary structure PREDiction</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
<i>recA/RecA</i>	ATP-abhängige DNA-Rekombinase
<i>rir/Rir</i>	Repressor-inaktivierender Regulator
Rm ^R	Rifampicin-Resistenz
siRNA	kleine, eingreifende RNA (<i>small interfering RNA</i>)
Sm ^R	Streptomycin-Resistenz
sp.	Spezies
spp.	Plural von sp.
ss	einzelsträngig (<i>single-stranded</i>)
ssp.	Subspezies/ Unterart

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
T _M	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TP-J34	temperenter Phage von <i>S. thermophilus</i> J34
TP-778	temperenter Phage von <i>S. thermophilus</i> SK778
UTR	untranslatierte Region

Nukleinbasen:

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Aminosäurecode:

A Ala	Alanin
M Met	Methionin
C Cys	Cystein
N Asn	Asparagin
D Asp	Asparaginsäure
P Pro	Prolin
E Glu	Glutaminsäure
Q Gln	Glutamin
F Phe	Phenylalanin
R Arg	Arginin
G Gly	Glycin
S Ser	Serin
H His	Histidin
T Thr	Threonin
K Lys	Lysin
V Val	Valin
L Leu	Leucin
W Trp	Tryptophan
Y Tyr	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Milchsäurebakterien und ihre Bedeutung für den Menschen.....	1
1.2	Bakteriophagen – Segen und Fluch zugleich.....	3
1.2.1	Systematik und Morphologie der Bakteriophagen.....	3
1.2.2	Vermehrung der Bakteriophagen.....	5
1.2.3	Bakteriophagen und ihr Nutzen für Mensch und Umwelt.....	10
1.2.4	Bakteriophagen als Problem für die Milchindustrie.....	11
1.3	Der temperente S. thermophilus Phage TP-J34.....	14
1.3.1	Lysogenie vs. Lyse - Das Lysogeniemodul des Phagen TP-J34.....	15
2	Zielsetzung.....	20
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Material.....	21
3.1.1	Geräte, Software und Materialien.....	21
3.1.2	Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	21
3.1.3	Nährmedien.....	21
3.1.4	Antibiotika und Medienzusätze.....	22
3.1.5	Bakterien und Bakteriophagen.....	23
3.1.6	Plasmide und Plasmidkonstrukte.....	23
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	24
3.2.1	Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	24
3.2.2	Induktion von Prophagen durch Mitomycin C.....	25
3.2.3	Plaquetest.....	25
3.2.4	Spottest.....	26
3.2.5	Lytische Anzucht von Phagen.....	26
3.2.6	Transmissionselektronenmikroskopie von Phagen.....	27
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.3.1	DNA-Auftrennung via Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.3.2	DNA-Aufreinigung/-Konzentrierung und -Extraktion aus Agarosegelen.....	28
3.3.3	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	28
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
3.3.6	Kolonie-PCR.....	30
3.3.7	Erzeugung einer Crh-Mutante mittels LDA.....	31
3.3.8	DNA-Restriktionsverdau.....	32
3.3.9	DNA-Klonierungen.....	32

3.3.9.1	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA	33
3.3.9.2	DNA-Ligation	33
3.3.9.3	Transformation von Plasmid-DNA	33
a.	...in <i>E. coli</i> -Zellen per Hitzeschock	33
b.	...in <i>L. lactis</i> (Holo und Nes, 1995)	34
c.	...in <i>S. thermophilus</i>	35
3.3.10	Plasmidpräparationen	36
a.	...aus <i>E. coli</i>	36
b.	...aus <i>E. coli</i> (<i>Colony Cracking</i>)	36
c.	...aus <i>L. lactis</i>	36
d.	...aus <i>S. thermophilus</i> (Anderson und McKay, 1983)	37
3.3.11	Isolierung chromosomaler DNA aus Grampositiven (Schleifer <i>et al.</i> , 1991)	37
3.3.12	Gen- <i>Knockout</i> mit Hilfe des thermosensitiven pG ⁺ host9	38
3.3.13	DNA-Sequenzierung	39
3.4	Promotoranalysen	39
3.4.1	RNA-Isolierung aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2	39
3.4.2	5'RACE-PCR	40
3.5	Proteinbiochemische Methoden	42
3.5.1	Plasmidkonstruktionen zur Protein-Überproduktion	42
3.5.2	Induzierte und konstitutive Genexpression	43
3.5.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Fusionsproteinen	43
3.5.4	Abspaltung des GST-tags	45
3.5.5	Protein-Konzentrationsbestimmung und -Konzentrierung	45
3.5.6	Protein-Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.5.7	Protein-Analyse mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
3.5.8	Western Blot (<i>Semidry Blot</i>) und Immunodetektion	48
3.5.9	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	49
3.5.10	Kompetitionsassay	51
3.5.11	Quervernetzung von Proteinen durch Glutaraldehyd	53
3.5.12	Markierung von Proteinen mit EZ-Link [®] TFPA-PEG3-Biotin	53
3.5.13	RecA-Aktivierung und katalytische Reaktionen	54
3.5.14	Analyse einer Autoproteolyse induziert durch alkalischen pH-Wert	55
4	Ergebnisse	56
4.1.	Nachweis von Promotoren im Lysogeniemodul von TP-J34	56
4.2	Gewinnung von aktiven Proteinen für biochemische Analysen	59
4.3	Bioinformatische Analyse der aufgereinigten Proteine	65
4.4	Lokalisierung von Repressorbindestellen im Lysogeniemodul von TP-J34	67

4.5	Interaktionsanalyse der Proteine Crh* und Rir*	71
4.6	Auswirkung einer <i>rir</i> -Überexpression in <i>S. thermophilus</i> J34f-2.....	75
4.7	<i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Untersuchung einer Crh-Prozessierung.....	76
4.8	Analyse einer RecA-abhängigen TP-J34 Induktion.....	82
5	Diskussion.....	85
5.1	Transkripte im Lysogeniemodul generiert durch P_{ltp} und P_{int}	85
5.2	Aufreinigung aktiver TP-J34-, <i>S. thermophilus</i> J34f-2- und <i>E. coli</i> -Proteine.....	88
5.3	Crh und Coh bilden die Repressoren im Lysogeniemodul.....	88
5.4	RecA-abhängige Induktion des Prophagen TP-J34 ohne RecA-katalysierte Autoproteolyse des Repressors	92
5.5	Rir besitzt eine Antirepressor-Funktion	95
6	Ausblick	103
7	Zusammenfassung.....	104
8	Summary	105
9	Anhang	106
10	Literaturverzeichnis	116
11	Abbildungsverzeichnis.....	132
12	Tabellenverzeichnis	135
	<i>Curriculum Vitae</i>	137

1 Einleitung

1.1 Milchsäurebakterien und ihre Bedeutung für den Menschen

Milch wird seit mehr als 10.000 Jahren von den Menschen als Nahrungsmittel genutzt (Silanikove *et al.*, 2015). Die Fermentation von Milch zur Verlängerung der Haltbarkeit sowie zur Gewinnung fester und halbfester Milchprodukte wurde lange Zeit ohne ein Bewusstsein über den eigentlichen Fermentationsprozess eingesetzt (Heller, 2005), bis Pasteur im Jahr 1857 als Erster die Milchsäuregärung durch Milchsäurebakterien beschrieb. Heutzutage zählt Milch zu den vielseitigsten Nahrungsmitteln der Welt (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2010). Der aktuelle Pro-Kopf-Verbrauch von Milch und Milchprodukten liegt in Deutschland bei etwa 122 kg pro Jahr (Milchindustrie-Verband e.V., 2015). Die für die Milchfermentation verantwortlichen Milchsäurebakterien haben für den Menschen eine bivalente Bedeutung. Einerseits zählen sie als Kommensalen des menschlichen Körpers zu den wichtigsten Vertretern der Darm-, Haut- und Schleimhautmikrobiota, werden zur Produktion fermentierter Lebensmittel wie Milchprodukte, Fleisch und Gemüse eingesetzt (Fuchs *et al.*, 2007) und einigen Spezies werden probiotische Eigenschaften zugeschrieben (Heller, 2001). Andererseits befinden sich Störer von alkoholischen Gärungen, Verderbniserreger von Bier, Wein und Fleischprodukten sowie Humanpathogene der Gattung *Streptococcus*, wie der Scharlach verursachende *Streptococcus pyogenes* unter ihnen (Du Toit *et al.*, 2014; Pothakos *et al.*, 2015). Milchsäurebakterien gehören zum *Clostridium*-Zweig der grampositiven *Firmicutes* mit einem niedrigen mol% GC-Gehalt (≤ 46 , bei einigen Laktobazillen bis 55) (Madigan *et al.*, 2006). Genauer bilden sie eine taxonomisch und morphologisch heterogene Gruppe der Ordnung *Lactobacillales* innerhalb der Klasse *Bacilli* (Autenrieth *et al.*, 2009; Lahtinen, 2012). Sie sind anaerob, aber aerotolerant, organotroph, säuretolerant, Katalase-negativ und bilden keine Sporen (König *et al.*, 2009). Ihre Morphologie ist stäbchenförmig oder kokkoid (Mahony und van Sinderen, 2014). Aufgrund ihrer zum Teil fehlenden Fähigkeit, Aminosäuren und Vitamine selbst zu synthetisieren, sind sie auf nährstoffreiche Habitate wie Milch, Fleisch, Darm oder Pflanzenmaterial angewiesen (Fuchs *et al.*, 2007). Da sie im Gegensatz zu vielen anderen Mikroorganismen zum Wachstum kein Eisen benötigen, können sie in Milch, in der praktisch sämtliches Eisen an Lactoferrin gebunden vorliegt, wachsen (Pandey *et al.*, 1994). In der Milchsäuregärung verstoffwechseln Milchsäurebakterien Monosaccharide hauptsächlich zu Milchsäure (Lactat) und senken auf diese Weise gleichzeitig den pH-Wert des umgebenden Milieus (Slonczewski und Foster, 2012; Marcó *et al.*, 2012). Milchzucker (Lactose), der zu vier bis acht Prozent in Milch vorkommt, wird durch

eine intrazelluläre β -Galactosidase bzw. Phospho- β -Galactosidase in Galactose und Glucose bzw. Galactose-6-P und Glucose gespalten (Heller, 2005; Walstra *et al.*, 2006). Anhand der gebildeten Endprodukte werden homofermentative von heterofermentativen Milchsäurebakterien unterschieden (Holzapfel und Wood, 2012). Homofermentative bilden aus Hexosen über die Glykolyse fast ausschließlich Lactat, während Heterofermentative zusätzlich Nebenprodukte wie Ethanol, CO₂ und Essigsäure produzieren (Mercenier *et al.*, 1994). Letzteren fehlt die Aldolase, das Schlüsselenzym der Glykolyse, so dass sie insbesondere Pentosen über den Phosphoketolase-Weg abbauen. Abhängig von ihrer optimalen Wachstumstemperatur werden Milchsäurebakterien in mesophil (18 - 32 °C) und thermophil (35 - 45 °C) unterteilt (Salminen *et al.*, 2004). Bei der Milchfermentation werden je nach Wunschprodukt unterschiedliche Milchsäurebakterien als Starterkulturen der sterilisierten oder teilentkeimten (pasteurisierten) Milch zugeführt. Vorrangig finden Stämme von *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*), *Lactobacillus* spp. (*Lb.* spp.) und *Leuconostoc* spp. (*Lc.* spp.) Anwendung (Mahony *et al.*, 2012). *S. thermophilus* gilt nach *L. lactis* als zweitwichtigstes Starterbakterium in der Milchindustrie (Fox, 2004; Lecomte *et al.*, 2016) und wird mit *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* zur Joghurtherstellung (Moineau *et al.*, 1995; Du Toit *et al.*, 2014) und für die Herstellung von Mozzarella, Cheddar sowie Hartkäse eingesetzt (Delcour *et al.*, 2000; Quiberoni *et al.*, 2006). Neben probiotischen (Hirayama und Rafter, 2000; Guigas *et al.*, 2015) besitzt *S. thermophilus* Eigenschaften, wie die Produktion bestimmter Proteine, Polysaccharide und Bacteriocine, die es für eine industrielle Nutzung interessant machen (Kabuki *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Die Einstufung als sicherer GRAS-Organismus ist für Spezies dieser Gattung eine Ausnahme (Levesque *et al.*, 2005; Du Toit *et al.*, 2014).

Die Ansäuerung der Milch durch Milchsäurebakterien hat zwei grundlegende Effekte. Sie verhindert das Wachstum potenziell pathogener Bakterien, wodurch die Milchprodukte länger haltbar werden und sie bewirkt eine Dicklegung der Milch durch Gerinnung des Milcheiweißes Kasein (Teshome, 2015). Die Dicklegung ist Ausgangspunkt zur Herstellung der verschiedenen Milchprodukte, deren Textur und Aroma maßgeblich durch die Milchsäurebakterien bestimmt werden. Das Wachstum der Starterkulturen und damit die Milchfermentation kann durch Störfaktoren beeinträchtigt werden. Darunter fallen Antibiotika-, Bacteriocin- und Reinigungsmittel-Rückstände in der Milch (Salminen *et al.*, 2004). Weiterhin spielt die Qualität der Rohmilch selbst eine wichtige Rolle, denn natürlicherweise in der Milch vorkommende Lactoperoxidase-Systeme, Immunglobuline und Lysozyme wirken antibakteriell (Marcó *et al.*, 2012). Das Hauptproblem stellt jedoch die Infektion von Starterkulturen mit Bakteriophagen dar (Murphy *et al.*, 2013).

1.2 Bakteriophagen – Segen und Fluch zugleich

1.2.1 Systematik und Morphologie der Bakteriophagen

Bakteriophagen, kurz Phagen, sind Bakterien und Archaeen parasitierende Viren (Clokic *et al.*, 2011). Im Jahr 1915 entdeckte der Engländer Twort ein Agens, das Staphylokokken auf einer Platte lysierte und bakteriendichte Filter passierte (Twort, 1915). Kurze Zeit später beobachtete der Kanadier d'Hérelle das gleiche Phänomen bei *Shigella* und prägte den Namen „Bakteriophage“ (altgriech. *baktérion* „Stäbchen“; *phagos* „Fresser“) (d'Hérelle, 1917). Phagen besitzen weder einen Replikationsapparat noch einen Stoffwechsel, was sie als obligat intrazelluläre Parasiten auszeichnet. Sie sind ohne eine lebende Wirtszelle zwar persistent, aber nicht vermehrungsfähig. Wie ihre Wirtszellen kommen Phagen ubiquitär vor (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004; Marcó *et al.*, 2012). Es wird geschätzt, dass sie mit 10^{31} Partikeln die häufigste biologische Einheit der Welt darstellen (McNair *et al.*, 2012). Im Jahr 1967 führte Bradley eine Systematik basierend auf der Nukleinsäureart und der Morphologie mit den sechs Morphotypen der geschwänzten (A bis C), polyedrischen (D und E) und filamentösen (F) Phagen ein (Bradley, 1967). Diese wurde 1974 von Ackermann durch Einteilung der geschwänzten Phagen anhand ihrer Kopfform in isometrisch, prolat und lang-prolat und Einführung der pleomorphen Phagen (G), modifiziert

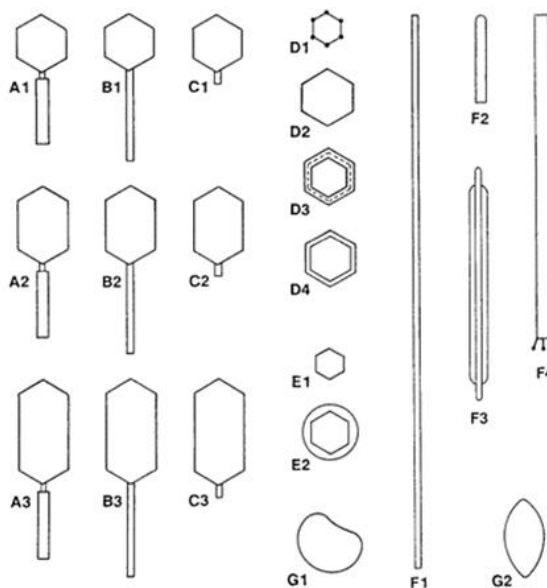


Abb. 1. Einteilung der Phagen in die Morphotypen A bis G nach Ackermann (2001). A bis C bilden die Ordnung der geschwänzten *Caudovirales*, die zusätzlich anhand ihrer Kopfform in isometrisch (1), prolat (2) und lang-prolat (3) unterteilt werden. Die Morphotypen werden in Tab. 1 genauer beschrieben.

der pleomorphen Phagen (G), modifiziert (Ackermann und Eisenstark, 1974) (Abb. 1). Die geschwänzten Phagen umfassen 96 % aller bekannten Phagen. Sie bilden die Ordnung *Caudovirales*, die sich in die Familien *Myoviridae*, *Siphoviridae* und *Podoviridae* mit unterschiedlichen Schwanzstrukturen gliedert (Ackermann, 2007). Die Phagen der *Myoviridae* Familie besitzen einen langen kontraktilen Schwanz. Die *Siphoviridae* Phagen mit einem langen flexiblen, aber nicht-kontraktilen Schwanz machen mit 61 % die größte Familie aus (Mahony *et al.*, 2012). Ein kurzer nicht-kontraktiler Schwanz zeichnet die Phagen der *Podoviridae* Familie aus. Die übrigen 3 bis 4 % der Phagen gliedern sich in die acht Familien

der polyedrischen, filamentösen und pleomorphen Phagen (Tab. 1).

Tab. 1. Systematische Einteilung der Phagen (modifiziert aus Ackermann 2001; 2011 und ICTV, 2015).

Form	Morphotyp	Genom	Familie	Vertreter	Morphologie
geschwänzt	A1 bis A3		<i>Myoviridae</i>	P1, P2, T4, Mu	langer, kontraktile Schwanz
	B1 bis B3	dsDNA(l)	<i>Siphoviridae</i>	λ , T1, T5	langer, nicht-kontraktile Schwanz
	C1 bis C3		<i>Podoviridae</i>	T7, P22	kurzer, nicht-kontraktile Schwanz
polyedrisch	D1	ssDNA(z)	<i>Microviridae</i>	ϕ X174	auffällige Kapsomere
	D3		<i>Corticoviridae</i>	PM2	komplexes Kapsid
	D4	dsDNA(z, l)	<i>Tectiviridae</i>	PRD1	doppeltes Kapsid, Pseudoschwanz
	D4?		<i>Sphaerolipoviridae</i> ²	P23-77, IN93	interne Lipidmembran
	E1	ssRNA(l)	<i>Leviviridae</i>	MS2	Polioviren-ähnlich
	E2	dsRNA(l)	<i>Cystoviridae</i>	ϕ 6	Hülle, Lipide
filamentös	F1	ssDNA(z)	<i>Inoviridae</i>	fd	lange Filamente
	F2			1-aa	kurzer Stab
pleomorph	G1	dsDNA(z)	<i>Plasmaviridae</i>	MVL2	Hülle, Lipide, kein Kapsid

grau: Ordnung *Caudovirales*. ss: einzelsträngig; ds: doppelsträngig; z: zirkulär; l: linear; ²ICTV, 2015.

Seit Einführung der Negativfärbung 1959 wurden mehr als 5.500 Phagen unter dem Elektronenmikroskop beschrieben (Ackermann, 2007). Das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) adaptierte die Systematik nach Bradley und gliedert Phagen mit derzeit 4.774 erfassten Spezies in eine Ordnung, 11 Familien und mehrere Subfamilien als größte Gruppe in die Taxonomie der Viren ein (ICTV, 2015). Aktuell sind die Genome von 2.010 Phagen in der Datenbank des *European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)* veröffentlicht (Januar 2017). Diese können als einzel- (ss) oder doppelsträngige (ds) sowie zirkuläre oder lineare DNA oder RNA vorliegen. Die Struktur von Phagen ist allgemein komplexer als die von eukaryotischen Viren. Sie lässt sich am besten anhand der Modell-Phagen T4 und λ erklären (Abb. 2). Die Morphologie der Phagen von Milchsäurebakterien ähnelt zum Großteil der des Phagen λ (Desiere *et al.*, 2002).

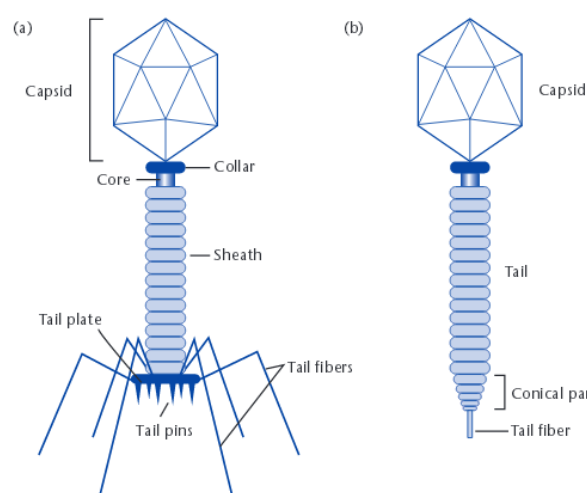


Abb. 2. Schematischer Aufbau des *Myoviridae* Phagen T4 (a) und des *Siphoviridae* Phagen λ (b). Beide gehören zu den dsDNA-Phagen. Der Schwanz des *Siphoviridae* Phagen λ ist flexibel.

www.microimmun.qb.fcen.uba.ar/03-Bacteriophage.pdf

Der *Myoviridae* Phage T4 besitzt einen prolaten Kopf (in Abb. 2, a nicht dargestellt), während der *Siphoviridae* Phage λ einen isometrischen Kopf besitzt. Der Phagenkopf (Kapsid, *capsid*) wird aus verschiedenen Proteinen (Kapsomere) aufgebaut und umhüllt das Phagen-Genom. Bei den meisten Phagen ist der Kopf über einen Kragen (*collar*) mit dem Schwanz (*tail*) verbunden. Der kontraktile Schwanz der *Myoviridae* besteht aus einem hohlen Kern, der von einem kontraktilen Schaft (*sheath*) umgeben ist (Aksyuk *et al.*, 2009). An dessen Ende befindet sich eine Basalplatte (*tail plate*), an die lange Schwanzfibern (*tail fibres*) und kürzere Schwanzstifte (*pins*) angeheftet sein können (Walter *et al.*, 2008). Der nicht-kontraktile Schwanz der *Siphoviridae* ist flexibel und trägt am Ende eine einzelne Schwanzfaser, während der der *Podoviridae* Phagen keine Fibern trägt, dafür aber Schwanzstifte. An der Spitze der Schwanzfibern sitzen Rezeptor-Bindeproteine, die für die Erkennung spezifischer bakterieller Zelloberflächenstrukturen zuständig sind (Tremblay *et al.*, 2006; Spinelli *et al.*, 2014).

1.2.2 Vermehrung der Bakteriophagen

Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip kann ein Phage nur an einen bestimmten Rezeptor binden (Moldovan *et al.*, 2007), weshalb die meisten Phagen sehr spezifisch für eine Bakterienart oder sogar einen Bakterienstamm sind, aber verschiedene Phagen dieselbe Bakterienart infizieren können (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004; González-Huici *et al.*, 2004). Die Infektion der Wirtszelle verläuft in mehreren Schritten (Abb. 3). Da sich Phagen nicht aktiv bewegen können, schwimmen sie in einer Lösung oder fliegen in Aerosolen durch die Luft, bis sie zufällig auf eine Wirtszelle treffen, an die sie adsorbieren können. Die Adsorption findet bei der Mehrheit aller

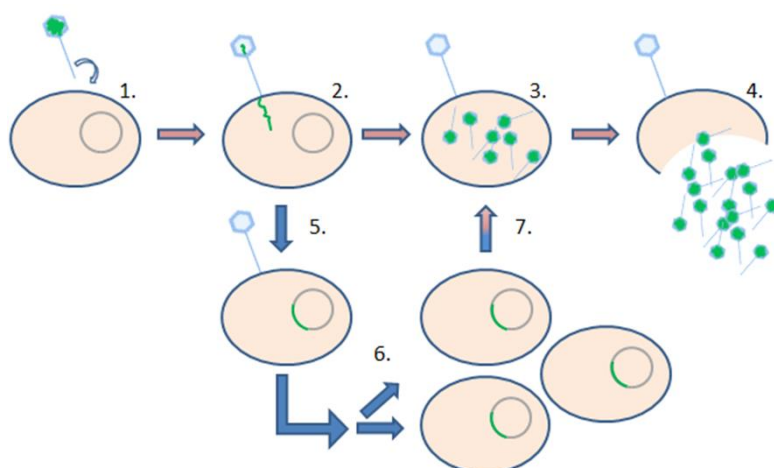


Abb. 3. Lytische (rosa Pfeile) und lysogene (blaue Pfeile) Vermehrung der Bakteriophagen. 1. Adsorption; 2. DNA-Injektion; 3. Phagenvermehrung; 4. Lyse der Bakterienzelle; 5. Integration der Phagen-DNA; 6. Vermehrung der lysogenen Wirtszellen; 7. Induktion des Prophagen (Neve und Heller, 2013).

Phagen mit dem Schwanz an einen Zuckerrest der Bakterienoberfläche statt (Fox, 2004) (Abb. 3.1). Grundsätzlich können jedoch sämtliche Oberflächenstrukturen als Rezeptoren genutzt werden (Rakhuba *et al.*, 2010). Die erste Bindung ist bei geschwänzten Phagen häufig reversibel und erst die nach-

folgende Bindung an einen sekundären Rezeptor erfolgt irreversibel (Heller, 1992). Nach der Adsorption folgt die Penetration, bei der die Phagen nicht komplett in die Wirtszelle eindringen, sondern lediglich ihre DNA in das Bakterium injizieren (Poeggel, 2013) (Abb. 3.2). Zur Einbringung der DNA durch die Zellmembran ins Zytoplasma nutzen Phagen Peptidoglykan-auflösende Enzyme und ihren Schwanz als Injektionsapparat, mit dem sie die Zellmembran durchstoßen (Farley *et al.*, 2016). Die DNA im Kapsid ist hochkondensiert und wird im Wesentlichen durch die darin gespeicherte Energie in die Zelle gedrückt. Die lineare Phagen-DNA wird zum Schutz vor Endonukleasen der Wirtszelle sowie zur Vorbereitung auf die Replikation oder Integration im Zytoplasma zirkularisiert. Die Zirkularisierung findet durch eine Wirts-Ligase durch Verknüpfung der DNA-Enden statt (Pitcher *et al.*, 2006). Anhand der darauffolgenden Vermehrungsstrategie werden temperente von virulenten Phagen unterschieden. Einen weiteren Vermehrungstyp stellt die Pseudolysogenie unter ungünstigen Bedingungen (Los und Wegrzyn, 2012) und die Vermehrung filamentöser Phagen dar (Martinez *et al.*, 2016). Virulente Phagen vermehren sich ausschließlich lytisch (Abb. 3.1 bis 3.4). Direkt nach der Infektion beginnen sie mit der eigenen Vermehrung, die in der Freisetzung neuer Phagen und der damit verbundenen Abtötung der Bakterienzelle mündet. Das Wirtsgenom wird fragmentiert und die Phagen-DNA durch Nutzung der Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle (Tagami *et al.*, 2014) repliziert, transkribiert und translatiert, sodass viele Kopien des Genoms und der Strukturproteine in der Zelle vorliegen. Aus den Strukturproteinen werden Phagenkopf und -schwanz assembliert, die DNA unter ATP-Verbrauch in das Prokapsid verpackt und schließlich der Kopf mit dem Schwanz verbunden. Die Freisetzung der Phagen erfolgt durch die phageneigenen Enzyme Holin und Endolysin, die zur Lyse der Zellwand führen (Wang *et al.*, 2000). Die Dauer von der Infektion bis zur Phagenfreisetzung wird als Latenzzeit bezeichnet. Die Anzahl der Phagen, die aus einem Bakterium durch Infektion mit einem einzelnen Phagen freigesetzt werden, ist definiert als Wurfgröße (*burst size*). Latenzzeit und Wurfgröße sind charakteristische Parameter eines jeden Phagen (Wang, 2006). Temperente (lat. *temperantia* „Mäßigung“) Phagen, zu denen der bekannteste und am besten studierte *E. coli* Phage λ zählt, können sich sowohl lysogen als auch lytisch vermehren. Welche Entwicklung ein temperenter Phage einschlägt wird durch die Menge zweier Repressoren, die Bestandteil eines genetischen Schalters (*genetic switch*) des Phagen sind, festgelegt (Ptashne, 2004). Ein genetischer Schalter dient zum An- und Abschalten von Genen in Reaktion auf bestimmte Signale aus der Umwelt (Shenker und Lin, 2015). Er reicht von einem bistabilen System wie bei vielen Phagen und Bakterien bis hin zu komplexeren Netzwerken bei Pflanzen und Tieren (Alsing *et al.*, 2011). Die beteiligten Gen-regulatorischen Elemente werden in *cis*-

und *trans*-Elemente gegliedert. *Cis*-regulatorische Elemente sind nicht-kodierende DNA-Abschnitte, die *upstream*, *downstream* oder direkt in einer Gen-kodierenden Region, demnach auf dem gleichen DNA-Molekül (lat. *cis* „diesseits“) lokalisiert sind, und an die die *trans*-regulatorischen Elemente, die auf einem anderen Molekül (lat. *trans* „jenseits“) lokalisiert sein können, zur Regulation der Genexpression binden (Cooper, 2000). Die Gene von Phagen sind grundsätzlich in Operons organisiert, die als Einheit von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden (Griffiths, 2000; Gann, 2010). Dieser wird über einen oder mehrere *cis*-regulatorische Operatoren reguliert, die von *trans*-regulatorischen Proteinen mit einem DNA-Bindemotiv, sogenannten Repressoren, gebunden werden (Eberwine, 1999; Alberts *et al.*, 2002). Der genetische Schalter temperenter Phagen wird charakteristischerweise aus zwei divergent orientierten Promotoren, einem bis mehreren Operatoren und regulatorischen Proteinen gebildet (Li *et al.*, 1997). Die Bistabilität wird durch zwei Repressoren bedingt, die beim Phagen λ als CI und Cro und bei vielen funktionell abgeleiteten Repressoren anderer Phagen als CI-ähnlich (*CI-like*) bzw. Cro-ähnlich (*Cro-like*) bezeichnet werden. Diese regulieren die Transkription unmittelbar früher lysogener und lytischer Gene und legen so den Entwicklungsweg des Phagen fest (Bednarz *et al.*, 2014). Der CI-ähnliche Repressor, der den lysogenen Zustand durch Hemmung des lytischen Promotors etabliert, besitzt dabei eine Schlüssel-funktion (Villanueva *et al.*, 2015). Nach Injektion seiner DNA kann ein temperenter Phage als Prophage in das Genom der Wirtszelle integrieren oder als freies Plasmid in der Zelle vorliegen (Mardanov und Ravin, 2007). Die unidirektionale und ortsspezifische Integration der zirkularisierten Phagen-DNA wird durch eine phagen-kodierte Integrase katalysiert (Fogg *et al.*, 2014). Sie erfolgt durch Rekombination zwischen homologen Sequenzbereichen, der *phage attachment site* (*attP*) im Phagengenom und der *bacterial attachment site* (*attB*) im Bakteriengenom, sodass der integrierte Prophage im Genom von der *attL* (*left*) und *attR* (*right*) flankiert wird. Bei jeder Teilung der Bakterienzelle wird der Prophage passiv vermehrt, indem er an die Tochterzellen weitergegeben wird (Poeggel, 2013). Bakterien, die einen Prophagen tragen, werden als lysogen bezeichnet. Im lysogenen Zustand werden die Gene zur lytischen Vermehrung des Phagen stark reprimiert (Mardanov und Ravin, 2007). Dadurch bedingt ist der lysogene Zustand relativ stabil (Little *et al.*, 1999), kann aber in die lytische Entwicklung übergehen. Dieser als Induktion bezeichnete Prozess findet häufiger spontan ohne externen Auslöser (Ghosh *et al.*, 2009; Helfrich *et al.*, 2015) sowie in Reaktion auf die SOS-Antwort der Wirtszelle statt (Kim und Ryu, 2013). Die SOS-Antwort ist ein globales, regulatives Netzwerk in Bakterien (und Archaeen), das durch DNA-Schädigungen aktiviert wird (Erill *et al.*, 2007) und als Teil der bakteriellen Stressantwort zur DNA-Reparatur dient. Die Hauptre-

gulatoren der SOS-Antwort sind die ubiquitär vorkommende, konservierte Protease RecA und der Repressor LexA (Michel, 2005). Unter normalen Wachstumsbedingungen bindet LexA an die SOS-Box in der Promotorregion der SOS-Gene und verhindert so deren Expression (Michel, 2005). Durch DNA-schädigende Umweltreize wie UV-Strahlung und Mitomycin C werden Doppelstrangbrüche in die DNA eingefügt, die von RecA erkannt und gebunden werden. Das aktive RecA-Nucleofilament induziert als Coprotease die Autoproteolyse des LexA-Repressors, so dass dieser die Expression der SOS-Gene freigibt (Little *et al.*, 1981). Aufgrund struktureller Homologien zum LexA-Repressor werden die Repressoren vieler temperenter Phagen ebenfalls degradiert und der lytische Zyklus irreversibel eingeleitet (Nanda *et al.*, 2014) (Abb. 4). Einige Bakterien wie *L. lactis* und *S. thermophilus* besitzen ebenfalls ein

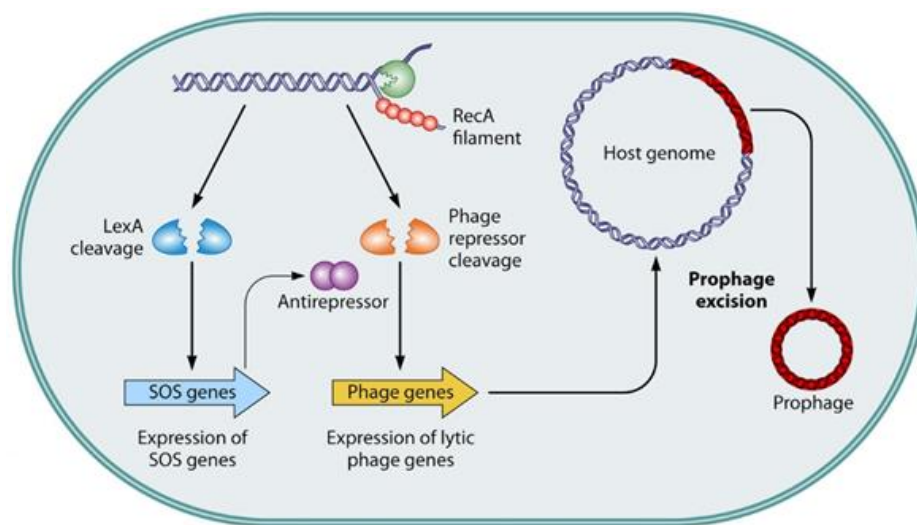


Abb. 4. Induktion eines Prophagen durch aktiviertes RecA aus der SOS-Antwort des Wirtsbakteriums (Nanda *et al.*, 2015). Der Prophagen-Repressor der lytischen Gene wird durch ein RecA-Nucleofilament inaktiviert, wodurch die Expression der lytischen Gene beginnt.

Das Herausschneiden (Exzision) des Prophagen aus dem Genom kann ungenau verlaufen, sodass bakterielle DNA in den Phagenkopf verpackt wird und bei der Infektion in eine neue Wirtszelle übertragen wird (Griffiths, 2000). Ebenso können virulente Phagen Teile des fragmentierten Bakteriengenoms in ihren Kopf verpacken. Dieser horizontale Gentransfer durch temperente und virulente Phagen zwischen Bakterien wird als Transduktion bezeichnet. Bestimmte Prophagen-Gene können die phänotypischen Eigenschaften des lysogenen Wirts, ob von Vor- oder Nachteil für diesen, kontrollieren (Desiere *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2002). Ein Beispiel für diese lysogene Konversion sind die Virulenzfaktoren vieler pathogener Bakterien (Waldor und Friedman, 2005). Das Shiga-Toxin der Shiga-Toxinproduzierenden *E. coli* (STEC) wird von Phagen des λ -Typs und das Cholera-Toxin in *Vibrio cholerae* vom Phagen CTX ϕ kodiert. Die verantwortlichen Phagen-Gene liegen zwischen

RecA-homologes Protein, dafür aber keinen LexA-homologen Repressor, sondern einen *heat and DNA damage inducible regulator* (HdiR) mit einer LexA-ähnlichen Funktion (Giliberti *et al.*, 2006; Tsakalidou und Papadimitriou,

dem Lysin-Gen und der rechten *attP*, wohingegen bei apathogenen Bakterien an dieser Stelle keine derartigen Gene lokalisiert sind (Desiere *et al.*, 2002). Ebenso kann die Resistenz gegenüber Antibiotika und Infektionen mit anderen Phagen durch einen Prophagen vermittelt werden (Fogg *et al.*, 2014). Neueste Studien haben ergeben, dass Prophagen sogar die Biofilmbildung von Bakterien fördern (Obeng *et al.*, 2016). Folglich können Prophagen die ökologische Fitness ihrer Wirtszelle symbiotisch steigern (Barondess und Beckwith, 1990; Desiere *et al.*, 2002; McGrath und van Sinderen, 2007; Feiner *et al.*, 2015).

Während der wechselseitigen Anpassung zwischen Bakterien und Phagen haben sich seitens der Bakterien diverse Phagenresistenzmechanismen gebildet (Mozzi *et al.*, 2010), die häufig auf übertragbaren Plasmiden kodiert sind. Grob eingeteilt wirken sie auf den Ebenen der Adsorption, Penetration, Replikation und Vermehrung. Phagen-Adsorptionsinhibierungen erfolgen z. B. durch Mutationen in Phagen-Rezeptoren (Heller, 1992) oder im Phageninfektionsprotein (Mooney *et al.*, 2006). Blockierungen der DNA-Penetration und Phagen-Entwicklung können durch eine *superinfection exclusion* und *superinfection immunity* des Prophagen vermittelt werden (Scott, 1975; Bruttin und Brüssow, 1996; Bruttin *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006). Diese Phänomene führen dazu, dass verstärkt das Potenzial temperenter Phagen erkannt wird, Infektionen mit virulenten Phagen zu verhindern (Sun *et al.*, 2009; Heller und Neve, 2014). Weiterhin wurden weitverbreitete Restriktionsmodifikationssysteme (Tükel *et al.*, 2006; Dupuis *et al.*, 2013) und CRISPR/-Cas(*clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated genes*)-Systeme (Jansen *et al.*, 2002; Labrie *et al.*, 2010; Vale *et al.*, 2015), die direkt auf die Phagen-DNA abzielen und zusammen wirken können, entdeckt (Dupuis *et al.*, 2013; Vasu und Nagaraja, 2013). CRISPR-Cas-Systeme sind Teil der erworbenen Immunität. Dabei werden kurze DNA-Fragmente virulenter Phagen in den CRISPR-Locus integriert, die dann als *small interfering RNA* (siRNA) Fremd-DNA erkennen sowie deren Spaltung veranlassen (Barrangou und Horvath, 2012). In Milchsäurebakterien wurden *in silico* zahlreiche, verschiedene CRISPR-Cas-Systeme gefunden (Sanozky-Dawes *et al.*, 2015). Der stetige „Existenzkampf“ zwischen Bakterien und Phagen hat zur Evolution derartiger, bakterieller Verteidigungsmechanismen geführt, die wiederum antagonistische Phagensysteme hervorgerufen haben (Labrie *et al.*, 2010; Bondy-Denomy *et al.*, 2015). Aufgrund ihrer genetischen Flexibilität und Dynamik können Phagen schnell an die Resistenzmechanismen der Bakterien adaptieren (Forde und Fitzgerald, 1999).

Phagen Genome variieren stark in Größe und Zusammensetzung, weisen aber auch Ähnlichkeiten zueinander auf. Sie sind gewöhnlich aus sogenannten Gen-Modulen zusammengesetzt, die durch vertikalen Gentransfer zwischen Phagen, aber auch horizontalen Gentransfer mit Bakte-

rien ausgetauscht werden können (Baker *et al.*, 1991; Ackermann, 2011). Die Theorie von austauschbaren Modulen als Triebfeder der Evolution von Phagen (und Viren) wurde von Botstein definiert (Botstein, 1980). Durch Rekombination homologer Sequenzen und hohe Mutationsraten entstand eine große Diversität unter den DNA-Phagen (Baker *et al.*, 1991; Lucchini *et al.*, 1999a).

1.2.3 Bakteriophagen und ihr Nutzen für Mensch und Umwelt

In der Umwelt spielen Phagen eine wichtige Rolle, da sie als natürliche „Bakterienfresser“ eine mikrobiologische Balance schaffen und gleichzeitig bei der Evolution von Bakteriengenomen als treibende Kraft wirken (Clokic *et al.*, 2011; Garneau und Moineau, 2011). Für die Molekularbiologie stellen Phagen bedeutende Modellsysteme und genetische Werkzeuge zur Transduktion sowie als Lieferanten von Promotoren, Polymerasen, Ligasen und Integrasen dar (Häuser *et al.*, 2012; Fogg *et al.*, 2014). Im Eliava-Institut in Tiflis in Georgien werden Phagen seit mehr als 90 Jahren in der Humantherapie zur Behandlung von bakteriellen Infektionen eingesetzt (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Abedon *et al.*, 2011). Diese Phagentherapie wird in Ländern Osteuropas und Russland seit langer Zeit erfolgreich angewendet und bietet u. a. den Vorteil, dass Phagen aufgrund ihrer Spezifität den Menschen sowie seine Kommensalen verschonen. Dabei kommen meist sogenannte „Phagocktails“ zum Einsatz, die von Firmen weltweit hergestellt werden. Angesichts der stark zunehmenden Zahlen antibiotikaresistenter Bakterien kommen Phagen nun auch in westlichen Ländern als nützliches Hilfsmittel bei deren Bekämpfung in Betracht (Fischetti, 2008; Khan Mirzaei und Nilsson, 2015). Bislang ist die Phagentherapie in der EU nicht zugelassen, deren Erforschung wird aber durch aktuelle EU-Projekte wie „PhagoBurn“ vorangetrieben (<http://www.phagoburn.eu/>). Weiterhin finden Phagen in Ländern wie den USA und den Niederlanden als Biokontrolle pathogener Bakterien und Verderbniserreger in Lebensmitteln Anwendung (Coffey *et al.*, 2010; Heller *et al.*, 2011). In Fermentationsprozesse und andere industrielle Prozesse könnten Phagen oder ihre Endolysine in Zukunft bewusst eingebracht werden, um eine Antibiotika-alternative Kontrolle von kontaminierenden Bakterien zu gewährleisten (Liu *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2016; Dyson *et al.*, 2016). Verglichen mit ihrer ökologischen Bedeutung ist die Biologie der Phagen, bis auf die einiger Modellphagen, noch wenig verstanden (Paepe *et al.*, 2014).

1.2.4 Bakteriophagen als Problem für die Milchindustrie

Whitehead und Cox beschrieben 1935 erstmals eine phagenbedingte Zellyse der Starterkultur *L. lactis* und erkannten die Dringlichkeit des Schutzes der Starterkulturen vor einer Phageninfektion (Whitehead und Cox, 1935). Heute ist bekannt, dass viele Milchsäurebakterien-Phagen aufgrund ihrer Thermostabilität die Pasteurisierung der Milch für 15 bis 30 Sekunden bei 72 bis 75 °C überstehen (Atamer *et al.*, 2009) und so hauptsächlich über die Rohmilch in einen milchwirtschaftlichen Betrieb gelangen (Bruttin *et al.*, 1997a; Josephsen und Neve, 1998). In etwa 10 % der Rohmilch wurden Phagen der drei *L. lactis* Hauptspezies c2, P335 und 936 gefunden (Madera *et al.*, 2004). Eine weitere Eintragsquelle von Phagen sind lysogene Starterkulturen (Ackermann, 2011). Stressvolle Fermentationsbedingungen können die Induktion der Prophagen auslösen (del Río *et al.*, 2012; Marcó *et al.*, 2012; Nanda *et al.*, 2015). Des Weiteren bilden Prophagen eine latente Quelle neuer lytischer Phagen, indem sie ihre Gene auf virulente Phagen übertragen und dadurch deren Wirtsspektrum erweitern können (Labrie und Moineau, 2007; Mercanti *et al.*, 2011). Aus diesem Grund werden Starterkulturen vor ihrem Einsatz auf induzierbare Prophagen untersucht (McGrath und van Sinderen, 2007). Insgesamt verursachen virulente Phagen weitaus größere Schäden als temperente Phagen (Sun *et al.*, 2009). Eine von Bakteriophagen infizierte Starterkultur kann innerhalb weniger

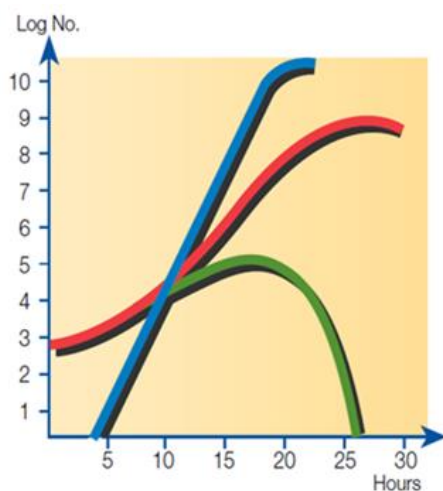


Abb. 5. Wachstumskinetik einer Starterkultur mit und ohne Phagen-Infektion. Eine nicht-infizierte Starterkultur zeigt ein exponentielles Wachstum (rot), wohingegen eine von Phagen infizierte Starterkultur eine Lyse bedingte Absterbephase aufweist (grün). Die Anzahl der freien Phagen steigt gleichzeitig an (blau) (aus *Dairy Processing Handbook*, Kapitel 4, S. 64 (Ref. Nordisk Mejeriindustri 4/82), Tetra Pak Processing Systems AB (1995)).

Stunden lysieren, denn bei jeder Zellyse werden zahlreiche Phagen freigesetzt, die wiederum neue Bakterien infizieren können (Abb. 5). Die Lyse der Bakterien führt zu einer Verlangsamung des Fermentationsprozesses durch Säuerungsstörungen mit daraus resultierenden minderqualitativen Produkten (Mills *et al.*, 2011), deren Geschmack und Beschaffenheit verändert sein können (Mahony und van Sinderen, 2014). In schweren Fällen kommt es sogar zu Ausfällen der Fermentation (Dupont *et al.*, 2004) und somit zu erheblichen finanziellen Schäden (Callanan und Klaenhammer, 2001). Liegt der Phagentiter bei etwa 10^3 plaquebildenden Einheiten pro Milliliter (PbE ml⁻¹) Milch am Beginn der Fermentation, verzögert sich diese; bei darüber liegenden Titern kommt sie zum Erliegen (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004). Geschätzt verursachen Phagen

Ausfälle in rund 0,1 bis 10 % der Fermentationen in der Milchverarbeitung (Moineau und Lévesque, 2004). In Konzentrierungs- und Recyclingprozessen der Milchverarbeitung, wie dem Käseprozess, werden die Phagen angereichert (Atamer *et al.*, 2013). So wurden in Molke, einem Nebenprodukt der Käseherstellung, bis zu 10^9 PbE ml⁻¹ detektiert (Neve *et al.*, 1994). Das Risiko einer Phageninfektion bei der Milchfermentation lässt sich aufgrund der nicht immer gegebenen Sterilsationsmöglichkeit der Milch und der Ausgangsmaterialien nicht ausschließen (Heller *et al.*, 2011). Die am häufigsten angewendeten Strategien zur Phagenprävention sind der Einsatz von Starterkulturen mit verringerter Phagensensitivität und die Starterkulturen-Rotation (Moineau, 1999; Levesque *et al.*, 2005). Weiterhin werden chemische Substanzen wie Peroxyessigsäure, Natriumhypochlorit und Kaliumperoxomonosulfat sowie thermische Inaktivierungen zur Bekämpfung der Phagen eingesetzt (Atamer und Hinrichs, 2010; Guglielmotti *et al.*, 2011; Morin *et al.*, 2015). Da hohe Temperaturen die Milchproteine schädigen können, stellt die Filtration der Milch durch eine phagenbindende Membran eine sinnvolle Alternative dar (Atamer *et al.*, 2013). Der Einsatz von UV-Licht hat sich ebenfalls als besonders effektiv bei der Phagenbekämpfung erwiesen, wohingegen hoher Druck kaum eine Wirkung aufwies (Guglielmotti *et al.*, 2011). Für eine erfolgreiche Reduktion der Phagen in Milch und in den milchverarbeitenden Betrieben selbst wird eine Kombination verschiedener Strategien empfohlen (Guglielmotti *et al.*, 2011). Virulente Phagen stellen nicht nur für die Milchindustrie ein Problem dar (Garneau und Moineau, 2011). Letztendlich ist jeder Prozess, in dem bakterielle Fermentationen zum Einsatz kommen, durch Phageninfektionen gefährdet (Rakhuba *et al.*, 2010).

Über die Interaktion zwischen Milchsäurebakterien und ihren Phagen ist noch wenig bekannt (Duplessis und Moineau, 2001; Mahony *et al.*, 2016). Letztere gehören zur Ordnung der geschwänzten *Caudovirales* mit einem linearen dsDNA-Molekül zwischen 2,4 und 142 kbp Größe. Die Phagen der Spezies *L. lactis* sind die am besten studierten (Spinelli *et al.*, 2014; Mahony und van Sinderen, 2014). Sie werden derzeit in zehn verschiedene Spezies der *Siphoviridae* und *Podoviridae* eingeteilt (Deveau *et al.*, 2006). Im Vergleich zu den morphologisch und genetisch divergierenden *Lactococcus* Phagen, bilden die *S. thermophilus* Phagen eine morphologisch homogene Gruppe (Neve *et al.*, 2003). Sie zeigen alle den B1-Morphotyp nach Bradley, der sich durch einen kleinen isometrischen Kopf mit einem Durchmesser von 45 bis 60 nm und einen langen nicht-kontraktilen Schwanz mit einer Länge von 132 bis 270 nm auszeichnet (Ackermann, 1998; Brüssow, 2001; McDonnell *et al.*, 2016). Bisher wurden mindestens 345 Phagen isoliert, die *S. thermophilus* Starterkulturen infizieren (Quiberoni *et*

al., 2010). Innerhalb dieser sind die Genomsequenzen von fünf temperenten und neun virulenten Phagen veröffentlicht (Tab. 2).

Tab. 2. Übersicht temperenter und virulenter *S. thermophilus* Phagen mit bisher veröffentlichten Genomen.

Phage	Wirt	Vermehrung	Typ	Genom (bp)	Referenz
TP-DSM20617	DSM20617	temperent	-	48.800	Mora und Arioli, 2013
TP-J34	J34		pac	45.606	Ali <i>et al.</i> , 2014
O1205	CNRZ1205		pac	43.075	Stanley <i>et al.</i> , 1997
TP-778L	SK778		pac	41.757	Ali <i>et al.</i> , 2014
Sfi21	SFi21		cos	40.739	Bruttin <i>et al.</i> , 1997b
Sfi11	SFi11		pac	39.807	Lucchini <i>et al.</i> , 1998, 1999a
2972	RD534		pac	37.704	Levesque <i>et al.</i> , 2005
Sfi19	SFi19		cos	37.370	Lucchini <i>et al.</i> , 1999c
5093	CSK939		cos	37.184	Mills <i>et al.</i> , 2011
858	DGCC7710		pac	35.543	Deveau <i>et al.</i> , 2008
ALQ13.2	ST13.2	virulent	pac	35.525	Guglielmotti <i>et al.</i> , 2009
7201	B106		cos	35.466	Le Marrec <i>et al.</i> , 1997
Abc2	Abc2		cos	34.882	Guglielmotti <i>et al.</i> , 2009
DT1	SMQ-301		cos	34.815	Tremblay und Moineau, 1999

Je nach DNA-Verpackungsmechanismus und Anzahl der Hauptstrukturproteine werden sie in zwei Gruppen unterteilt, *cos*- und *pac*-Typ (Le Marrec *et al.*, 1997; Fox, 2004; Quiberoni *et al.*, 2006). Die *cos*- oder Sfi21-ähnlichen Phagen besitzen ein Genom mit kohäsiven (*cos*) Enden. Sie werden aus zwei Hauptstrukturproteinen von etwa 26 und 32 kDa aufgebaut, während die *pac*- oder Sfi11-ähnlichen Phagen aus drei Hauptstrukturproteinen von ca. 41, 25, und 13 kDa bestehen (Le Marrec *et al.*, 1997). *Pac*-Phagen besitzen ein partiell zirkulär permutiertes Genom mit terminaler Redundanz und verpacken die DNA von der *pac*-Seite des Genoms nach dem Kopf-voll-Mechanismus (Oram und Black, 2011). Mittlerweile wurden zwei weitere Gruppen von *S. thermophilus* Phagen aufgestellt. Der einzige Vertreter der einen Gruppe ist der Phage 5093 mit wenig Homologie zu allen anderen *S. thermophilus* Phagen (Mills *et al.*, 2011). Die 987-Gruppe umfasst derzeit vier Hybrid-Phagen aus *L. lactis* P335 Phagen und *S. thermophilus* Phagen (McDonnell *et al.*, 2016). *S. thermophilus* Phagen weisen ein enges Wirtsspektrum auf und temperente besitzen eine hohe molekulare Übereinstimmung mit virulenten *S. thermophilus* Phagen (Neve *et al.*, 1989; Neve *et al.*, 2003; Levesque *et al.*, 2005). Die Mehrheit aller sequenzierten Bakteriengenome birgt mindestens einen intakten Prophagen oder DNA viralen Ursprungs (Canchaya *et al.*, 2003; Helfrich *et al.*, 2015). Dennoch wurden nur wenige Arbeiten über temperente Milchsäurebakterien-Phagen veröffentlicht (Mercanti *et al.*, 2015). Während Lysogenie bei Laktokokken und Laktobazillen häufig

vorkommt (Cuesta *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 2006; Mercanti *et al.*, 2011), tritt das Phänomen bei *S. thermophilus* eher selten auf (Le Marrec *et al.*, 1997; Neve *et al.*, 2003).

1.3 Der temperente *S. thermophilus* Phage TP-J34

Das aus Joghurt isolierte Milchsäurebakterium *S. thermophilus* J34 trägt den Prophagen TP-J34 in seinem Genom und wächst im Vergleich zum sedimentierenden Prophagen-kurierten Stamm homogen verteilt im Medium (Neve *et al.*, 1998; Neve *et al.*, 2003) (Abb. 6). Dieser Phänotyp ist auf die lysogene Konversion des TP-J34-Prophagen zurückzuführen (Guigas *et al.*, 2015).

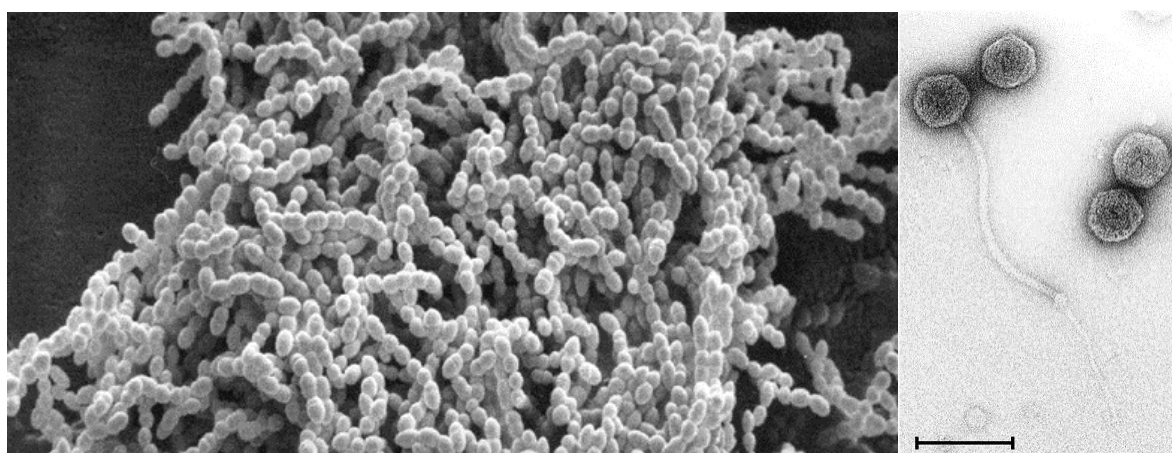


Abb. 6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des lysogenen Milchsäurebakteriums *S. thermophilus* J34 (links) und freier TP-J34-Virionen (rechts) (Neve *et al.*, 2003). Das rechte Bild zeigt einen intakten Phagen mit einem langen Schwanz unter einigen defekten Phagen ohne Schwanz. Die Länge des Balkens entspricht 100 nm.

Der Prophage TP-J34 lässt sich durch Mitomycin C und UV-Strahlung induzieren. Die Mehrheit (95 %) der dabei freigesetzten Phagen ist aufgrund einer doppelten *in-frame*-Insertion von 912 bp im Rezeptor-Bindeprotein (*orf48*) nicht-infektiös und besteht aus einem DNA-gefüllten Kopf ohne Schwanz (Neve *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2014) (Abb. 6). Bei einigen Phagen ist die Insertion deletiert, so dass sie infektiös sind und sich in dem Prophagen-kurierten Stamm *S. thermophilus* J34-6 lytisch vermehren können. Diese intakten TP-J34-Virionen besitzen einen ca. 240 bis 260 nm langen nicht-kontraktilen Schwanz (teilweise mit ca. 140 nm langer Schwanzfaser) und einen isodiametrischen Kopf. Der lysogene Wirt weist extrachromosomale TP-J34-DNA und Autolyse bei Temperaturen ab 45 °C auf (Neve *et al.*, 2003). Als *pac*-Phage besitzt TP-J34 untypischerweise nur zwei statt drei Hauptstrukturproteinen mit einer Größe von 15 und 40 kDa auf, da – wie oben beschrieben – das Hauptschwanzprotein fehlt (Neve *et al.*, 2003). Mit einer Genomgröße von 45.606 bp (Ali *et al.*, 2014) trägt TP-J34

nach TP-DSM20617 das zweitgrößte Genom aller bisher beschriebenen *S. thermophilus* Phagen. Es kodiert für 60 ORFs, die in zwei divergent lokalisierten *Clustern* organisiert sind: 56 Gene in einem und vier Gene aus dem Lysogeniemodul in einem anderen (Ali *et al.*, 2014).

1.3.1 Lysogenie vs. Lyse - Das Lysogeniemodul des Phagen TP-J34

Zur Etablierung eines temperenten Phagen als Prophage im Wirtsgenom bedarf es einiger bestimmter Gene, die im sogenannten Lysogeniemodul lokalisiert sind. Diese Ansammlung unterschiedlicher Gene liegt im Phagen-Genom zwischen dem DNA-Replikationsmodul und dem Lysismodul (Lucchini *et al.*, 1999b; Levesque *et al.*, 2005). Das Lysogeniemodul des Phagen TP-J34 wurde vollständig sequenziert und die Gene annotiert (Neve *et al.*, 1998) (Abb. 7). Es umfasst die Funktion zur Phagenresistenzvermittlung sowie einen genetischen Schalter zur Regulierung der lysogenen bzw. lytischen Phagenentwicklung (Ptashne, 2004; Sun *et al.*, 2006; Engelberg-Kulka und Kumar, 2015). Die genetische Schalterregion von TP-J34 mit einer Größe von 168 bp liegt in der intergenen Region der Repressor-homologen Gene *crh* und *coh* und umfasst die Promotoren P1 und P2 sowie drei postulierte Operatoren (O1A, O2 und O3). In der *coh-ant*-intergenen Region wird ein weiterer, zu O1A identischer Operator, vermutet (O1B). Die Operatoren wurden aufgrund ihrer AT-reichen palindromischen Sequenz von 15 bp postuliert (Neve *et al.*, 1998). Es handelt sich um gegenläufige Wiederholungssequenzen, sogenannte *inverted repeats*, die die Bindung von Repressor-Dimeren erlauben (Alberts *et al.*, 2002).

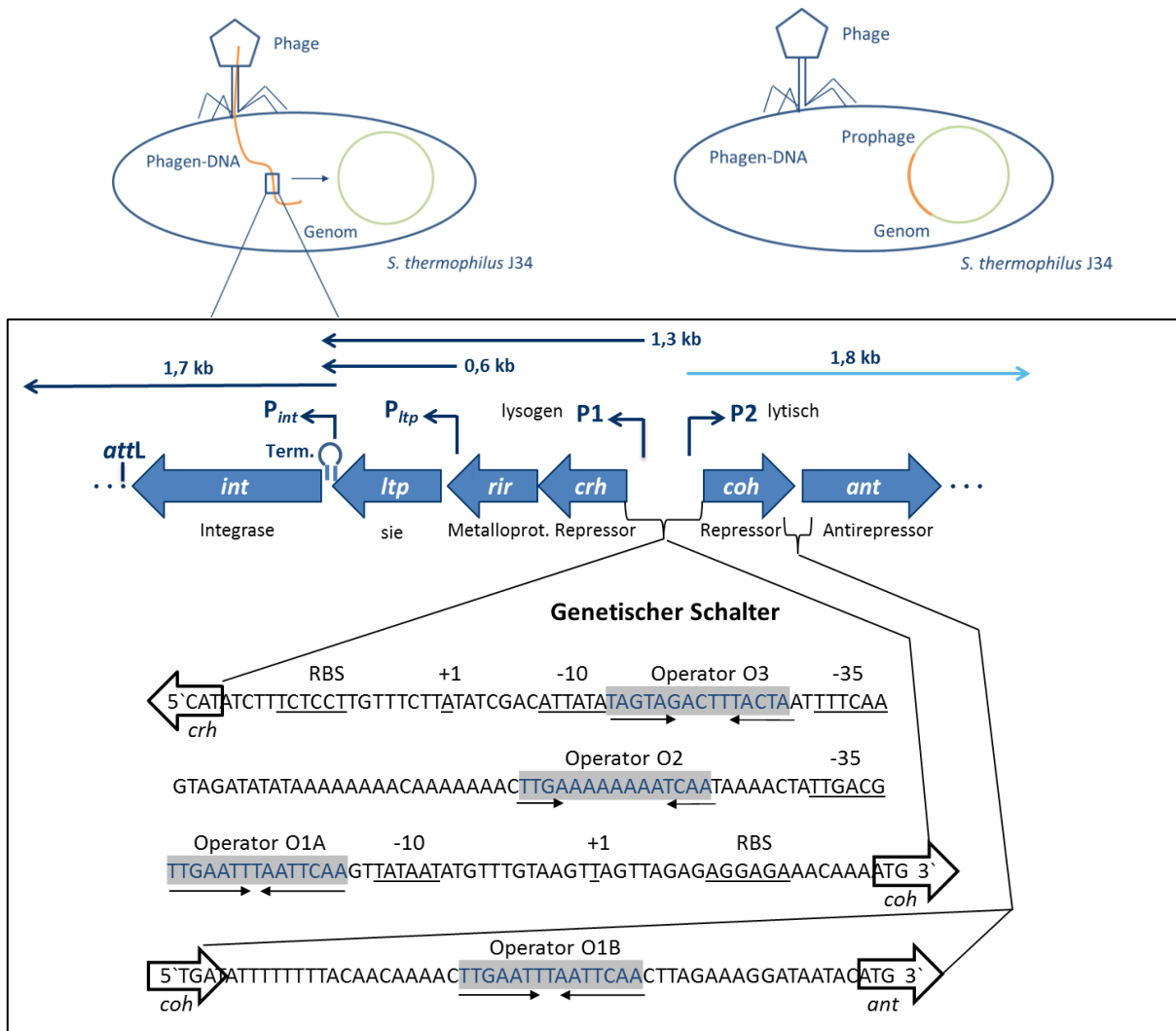


Abb. 7. Lysogeniemodul und genetischer Schalter im Genom des temperenten Phagen TP-J34 (modifiziert aus Neve *et al.*, 1998). Die Gene *crh*, *rir*, *ltp* und *int* sind von den potenziell lytischen Genen *coh* und *ant* (sowie *orf7*, *orf8* und *orf9*) durch eine 168 bp große Region getrennt. Diese bildet mit den divergenten Promotoren P1 und P2, den postulierten Operatoren O1A (O1B), O2 und O3 und regulatorischen Proteinen einen genetischen Schalter. In der intergenen Region von *coh* und *ant* wird ein weiterer Operator vermutet (O1B). Die mRNA-Transkripte sind oberhalb der zugehörigen Gene gezeigt. Das hellblaue, 1,8 kb-große Transkript wird lediglich während der lytischen Phagenentwicklung gebildet (Mohamed, 2010). Ausgehend von den Transkripten wurden zwei weitere Promotoren postuliert, P_{ltp} und P_{int} . In der *ltp-int*-intergenen Region wurde ein Rho-unabhängiger Terminator (Term.) lokalisiert. Die Insertionssequenz *attL* liegt direkt *downstream* von *int*.

Aufgrund seiner Position im Genom von TP-J34 wird dem *crh*-Genprodukt (Gp) (Crh, CI-Repressor homolog) die Funktion des Repressors lytischer Gene und damit die Funktion zur Etablierung einer lysogenen Entwicklung zugesprochen. Mit einem als DNA-Bindedomäne agierenden N-terminalen *helix-turn-helix*-Motiv (HTH), welches typisch für Repressoren ist, wird Crh der *xenobiotic response element* (XRE)-Familie von Transkriptionsregulatoren zugeordnet (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Durch *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) wurde belegt, dass das Crh-Protein an DNA im Lysogeniemodul bindet (Koberg Diplomarbeit, 2012). Die Bindedomäne ist durch eine Verbindungsregion mit einer C-terminalen Oli-

gomerisierungsdomäne verbunden. Erwiesenermaßen ermöglicht diese dem Crh für die Bindung notwendige Dimere, Tetramere und höher organisierte Oligomere zu formen (Koberg Diplomarbeit, 2012). Weiterhin zeigt Crh strukturelle Ähnlichkeit mit anderen Repressoren wie denen der Phagen Sfi21, P22, g1e und Tuc2009 (Neve *et al.*, 1998). Unmittelbar *downstream* des *crh*-Gens liegt das *orf3*-Gen, welches aufgrund der vorliegenden Ergebnisse in *rir* (Repressor-inaktivierender Regulator) umbenannt wurde. Das 122 aa große Rir-Protein wird der DUF955-Superfamilie mit unbestimmter Funktion zugeordnet (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Mit einem für Zink-Metalloproteasen charakteristischen H-E-X-X-H-Motiv (Jongeneel *et al.*, 1989; Rawlings und Barrett, 1995) weist Rir Übereinstimmungen zum *orf3*-Gp des *L. lactis* Phagen TP901-1 auf, welches ebenfalls zwei Gene *upstream* der putativen Integrase liegt (Neve *et al.*, 1998). *Rir-Knockout*-Mutanten zeigten, dass Rir für die Induktion des TP-J34-Prophagen essentiell ist und Auswirkungen auf die Wachstumsform von *S. thermophilus* J34 hat (Bokelmann Diplomarbeit, 2003; Faulhaber Diplomarbeit, 2012). Der nicht induzierbare Prophage in dem *S. thermophilus* Stamm J34-12 trägt eine Insertion eines Alanin im *rir*-Gen, die zu einem Transkriptionsstopp nach 129 nt von 369 nt führt (Mohamed, 2010). Das *downstream* von *rir* gelegene *ltp*-Gp (Lipoprotein des temperenten Phagen TP-J34) gehört zur Lipoprotein-Superfamilie und besitzt die Funktion eines *superinfection exclusion* (*sie*)-Systems. *Sie*-Systeme wurden nicht nur in prokaryotischen Phagen (Ranade und Poteete, 1993; Sun *et al.*, 2006; Mahony *et al.*, 2008; Bebeacua *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014), sondern auch in eukaryotischen Viren gefunden (Folimonova, 2012). Eine Superinfektion von *S. thermophilus* J34 mit TP-J34 oder nah verwandten Phagen wird durch zwei Mechanismen des integrierten TP-J34-Prophagen verhindert (Abb. 8). Diese sind Teil der lysogenen Konversion und sichern das Überleben der Wirtszelle (Heller und Neve, 2014). Neben der *superinfection exclusion* wird eine *superinfection immunity* durch den Repressor Crh vermittelt, indem er die Entwicklung des Prophagen in der Zelle durch

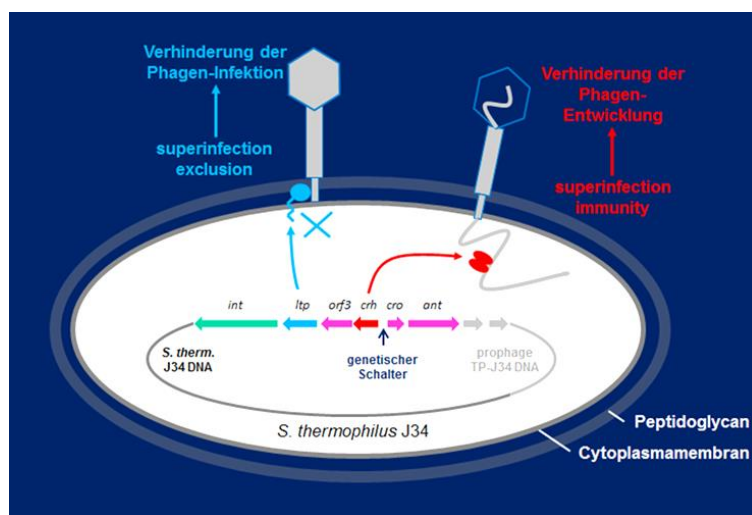


Abb. 8. Mechanismen des TP-J34-Prophagen zur Superinfektionshemmung (Heller und Neve, 2014). Die verantwortlichen Gene *ltp* und *crh* sind im Lysogeniemodul lokalisiert. Die *superinfection exclusion* (*sie*) verhindert die Injektion der Phagen-DNA und wird durch das Lipoprotein Ltp vermittelt. Bei der *superinfection immunity* blockiert der Repressor Crh die Phagen-Vermehrung durch Repression lytischer Gene.

Unterdrückung der lytischen Gene hemmt. Als membrangebundenes Protein verhindert das reife Ltp an der Außenseite der Zytoplasmamembran die DNA-Injektion des Phagen, wohingegen die Phagenadsorption nicht gehemmt wird (Donnelly-Wu *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 2006). Plasmid-kodiertes exprimiertes Ltp konnte sowohl in *S. thermophilus* J34 als auch in *L. lactis* Bu2-60 eine Resistenz gegenüber Phagen vermitteln. Das Präprotein setzt sich aus einer Signalsequenz, einer Lipiddomäne zur Membranverankerung, einer Serin-reichen Verbindungsregion und zwei *Repeat*-Domänen zur Vermittlung von *sie* zusammen (Sun *et al.*, 2006). Die Kristallstruktur der Repeat-Domänen offenbarte eine doppelte 3-*helix-helix-turn-helix*-Domäne, die mit ihrer stark negativen Ladung vermutlich mit dem positiv geladenen C-Terminus des *tape measure proteins* (TMP) im Phagenschwanz interagiert (Bebeacua *et al.*, 2013). Lipoproteine des Ltp-Typs wurden in drei weiteren *S. thermophilus* Phagen identifiziert: TP-EW, TP-778 und TP-DSM20617 (Ali *et al.*, 2014). *Downstream* des *ltp*-Gens wurde eine Terminatorstruktur (*stem loop*) lokalisiert, die zu einem Transkriptionsabbruch führt (Mohamed, 2010). Mit der topologischen Position nahe der *attL*, der Homologie zu anderen Phagen-Integrasen (Bruttin *et al.*, 1997b; Stanley *et al.*, 1997; Desiere *et al.*, 1998), einer N-terminalen, AP2-ähnlichen DNA-Bindedomäne sowie C-terminalen katalytischen XerC-Rekombinase-Domäne, wird dem 359 aa großen *int*-Gp (Int) die Funktion einer Integrase zugesprochen (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Dieses den Tyrosin-Rekombinasen zugeordnete Protein dient zur ortsspezifischen Integration der Phagen-DNA in das Wirtsgenom und ist demzufolge essentiell für temperente Phagen. Außerdem wird vermutet, dass Int gleichzeitig die Funktion einer Exzisionase trägt, die den umgekehrten Prozess des Herausschneidens bei Einleitung des lytischen Zyklus katalysiert (Mohamed, 2010). Die aufeinanderfolgenden Gene *crh*, *rir*, *ltp* und *int* sind auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang zu allen anderen Genen im TP-J34-Genom kodiert. Sie werden sowohl im lysogenen als auch im lytischen Zustand transkribiert. Dabei liegt *crh* zusammen mit *rir* und *ltp* in einem polycistronischen Transkript und *int* mit nicht definierten Genen des Wirtsbakteriums in einem Transkript, während das *ltp*-Gen zusätzlich als monocistronisches Transkript vorliegt (Mohamed, 2010). Nach Induktion des lytischen Zyklus wird ausgehend von Promotor P2 ein polycistronisches Transkript generiert, das die putativ lytischen Gene *coh*, *ant*, *orf7*, *orf8* und *orf9* umfasst. Das 67 aa kleine *coh*-Gp (*Cro* homolog; ehemals *cro*) weist wie Crh ein HTH-Motiv auf und wird ebenfalls zur XRE-Familie von DNA-bindenden Transkriptionsregulatoren gezählt (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Das Protein weist eine deutliche Homologie zum Cro-ähnlichen Repressor des *S. thermophilus* Phagen 7201 auf (Stanley *et al.*, 2000). Das *downstream* gelegene *ant*-Gp zeigt signifikante Übereinstimmungen mit Proteinen der ortho-

logischen Gruppe COG3561, zu denen Antirepressoren gehören (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Für das *orf7*-Gp wurden Übereinstimmungen mit DNA-Bindeproteinen gefunden, während *orf8* und *orf9* keine Funktion zugeordnet werden konnte. Mit diesen divergent transkribierten lysogenen Genen besitzt das Lysogeniemodul des Phagen TP-J34 die typische Struktur eines Lysogeniemoduls temperenter *Siphoviridae* Phagen, die Grampositive mit einem niedrigen GC-Gehalt infizieren (Lucchini *et al.*, 1999b) (Abb. 9). Allerdings ist der gleichzeitige Besitz eines *sie*-Gens und einer Zink-Metalloprotease auf Sfi21 und TP-J34 beschränkt.

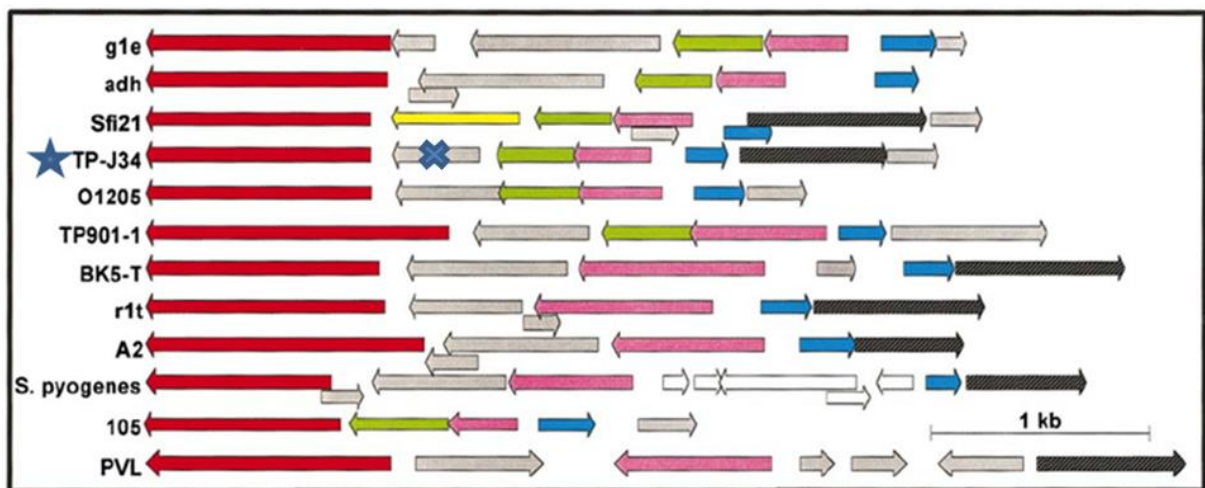


Abb. 9. Genetische Organisation der Lysogeniemodule temperenter *Siphoviridae* Phagen im Vergleich (Lucchini *et al.*, 1999b). Gezeigt sind Phagen der Spezies *Lactobacillus* (*g1e*, *adh*, *A2*), *Streptococcus* (*Sfi21*, TP-J34, O1205, Prophage 296), *Lactococcus* (TP901-1, BK5-T, *r1t*), *Bacillus* (ϕ 105) und *Staphylococcus* (PVL). Gene mit ähnlicher postulierter Funktion sind in gleichen Farben dargestellt. Rot: Integrase; grün: Metalloprotease; gelb: *sie* (auch bei TP-J34 nachgewiesen, s. Kreuz); pink: CI-homolog; blau: Cro-homolog; schwarz: CI-homolog/Antirepressor. Graue Pfeile stellen unbekannte Gene und weiße Pfeile Insertionen dar. TP-J34 ist durch einen Stern gekennzeichnet.

Die genetische Organisation gestaltet sich im Vergleich zum Lysogeniemodul des temperenten *Siphoviridae* Modell-Phagen λ einfacher (Lucchini *et al.*, 1999b). Vollständig kommen Lysogeniemodule nur bei temperenten Phagen vor, allerdings können virulente Phagen Überreste davon tragen (Lucchini *et al.*, 1999a). Beispiele hierfür sind die virulenten *S. thermophilus* Phagen DT1, Sfi11, Sfi19, Abc2, ALQ13.2 und 2972 (Tremblay und Moineau, 1999; Levesque *et al.*, 2005; Guglielmotti *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Tatsache wird angenommen, dass virulente *S. thermophilus* Phagen aus temperenten durch Neuordnungen und Deletionen im Lysogeniemodul hervorgegangen sind (Bruttin und Brüßow, 1996; Brüßow *et al.*, 1998; Lucchini *et al.*, 1999b; Levesque *et al.*, 2005). Auch TP-J34 zeigte in *Southern Blots* Hybridisierungen im Bereich des Lysogeniemoduls mit den virulenten *S. thermophilus* Phagen a10/J9, P55 und P6 (Neve *et al.*, 2003).

2 Zielsetzung

Bakteriophagen verursachen einen erheblichen finanziellen Schaden in der Milchindustrie. Erkenntnisse über ihre Biologie ermöglichen die Entwicklung antiviraler Strategien zum Schutz von Starterkulturen. Als potenzielle Quelle lytischer Phagen und aufgrund ihrer „Entscheidungsfähigkeit“ zwischen lysogener und lytischer Entwicklung stellen temperente Phagen interessante Untersuchungsobjekte dar. Speziell über temperente Phagen der Spezies *S. thermophilus* ist bislang wenig bekannt, da Lysogenie bei diesem Bakterium selten auftritt.

Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit ist das Lysogeniemodul und der darin gelegene genetische Schalter des temperenten *S. thermophilus* Phagen TP-J34. Die hier lokalisierten *cis*- und *trans*-regulatorischen Elemente sollten näher charakterisiert werden, um ein Verständnis ihrer Rolle bei der Etablierung des lysogenen Zustands bzw. bei der Induktion der lytischen Entwicklung durch den genetischen Schalter zu gewinnen. Zu diesem Zweck sollten postulierte Promotoren als Transkriptionsstartpunkte von Genen lokalisiert werden. Hierbei sollte insbesondere geklärt werden, ob die Gene *ltp* und *int* durch eigene Promotoren transkribiert werden. Außerdem sollten die TP-J34-Proteine Crh, Coh und Rir zur funktionellen Analyse in *E. coli* überproduziert und aufgereinigt werden. Mit Hilfe von EMSA und Kompetitionsassays sollten DNA-bindende Proteine identifiziert und deren Bindestellen im Lysogeniemodul lokalisiert werden. Auf diese Weise sollten Repressor-Proteine mit einer regulatorischen Funktion im genetischen Schalter von TP-J34 erkannt werden. Der putative Repressor Crh sollte hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Autoproteolyse vermittelt durch einen alkalischen pH-Wert und durch RecA aus der SOS-Antwort des Wirts untersucht werden. Des Weiteren sollte die unvollständig aufgeklärte Funktion des Rir-Proteins analysiert werden, indem eine postulierte Interaktion mit Crh näher untersucht wird. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob Rir als putative Zink-Metalloprotease eine Spaltung von Crh bewirkt. Diesbezüglich sollte eine Rir-Bindedomäne in Crh lokalisiert werden, indem eine Crh-Mutante hergestellt und deren Interaktionsfähigkeit mit Rir untersucht wird. Aufgrund mangelnder Beschreibungen dieser putativen Zink-Metalloprotease in anderen Phagen schien hier ein neuartiges System der Prophagen-Induktion vorzuliegen. Mit den gewonnenen Erkenntnissen sollte ein Model zur Regulation des genetischen Schalters des Phagen TP-J34 erstellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte, Software und Materialien

Die verwendeten Geräte und Materialien sind in den nachfolgenden Texten und Tabellen zu finden. Angaben zu den Herstellern finden sich in Tabelle 32 im Anhang. Zur Analyse verwendete Software wurde in Tabelle 34 im Anhang zusammengetragen. Details zu den verwendeten Kits stehen in Tabelle 35 im Anhang.

3.1.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien finden sich in Tabelle 33 im Anhang. Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser (rH₂O, arium[®] pro Reinstwasser System, Sartorius AG) angesetzt. Deren pH-Wert wurde mit HCl, Essigsäure oder NaOH am pH-Meter (Delta 340, Mettler-Toledo) eingestellt. Vor Gebrauch wurden die Lösungen und Puffer autoklaviert (15 min bei 121°C) oder bei Hitzeempfindlichkeit filtriert (Whatman[®], Porengröße 0,2 µm).

3.1.3 Nährmedien

Allgemeine Nährmedien für *E. coli*, *L. lactis* und *S. thermophilus* finden sich in Tabelle 3. Alle Nährmedien wurden mit rH₂O angesetzt und vor Gebrauch 15 min bei 121 °C autoklaviert. Feste Nährmedien wie LB-Agar und M17-Unterschichtagar wurden aufgekocht und in Petrischalen gegossen. Dem Unterschichtagar wurde vor dem Ausgießen Glucose (GM17) oder Lactose (LM17) untergemischt. Nach Bedarf wurden den Medien Antibiotika oder Medienzusätze (Tab. 4) hinzugefügt. Spezielle Medien sind direkt im Methodenteil aufgeführt.

Tab. 3. Allgemeine Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*, *L. lactis* und *S. thermophilus*.

Medium	Komponente	Menge
LB-Medium (Fertigmischung) (Carl Roth)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	1 % (w/v)
	Trypton	1 % (w/v)
LB-Agar (Fertigmischung) (Carl Roth)	LB-Medium	
	Agar-Agar (hochrein)	1,5 % (w/v)

M17-Medium (Terzaghi und Sandine, 1975)	Phyton-Pepton	0,5 % (w/v)
	Poly-Pepton	0,5 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,25 % (w/v)
	Fleischextrakt	0,5 % (w/v)
	Ascorbinsäure	0,05 % (w/v)
	Dinatrium- β -Glycerophosphat	1,9 % (w/v)
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,025 % (w/v)
GM17-Medium für mesophile (Terzaghi und Sandine, 1975)	1 M CaCl ₂	0,1 % (v/v)
	GM17-Medium für mesophile (Terzaghi und Sandine, 1975)	M17-Medium mit Glucose
LM17-Medium für mesophile (Terzaghi und Sandine, 1975)	M17-Medium mit Lactose	0,5 % (w/v)
thLM17-Medium für thermophile (Krusch <i>et al.</i> , 1987)	M17-Medium mit Lactose	0,8 % (v/v)
	Dinatrium- β -Glycerophosphat	0,95 % (w/v)
	1 M CaCl ₂	0,12 % (v/v)
GM17- oder LM17-Unterschichtagar	M17-Medium mit Agar-Agar (hochrein)	1,5 % (w/v)
	Zuckerlösung (Glucose oder Lactose)	6 ml
Zuckerlösung (Krusch <i>et al.</i> , 1987)	Glucose bzw. Lactose	0,5 % (w/v)
	1 M CaCl ₂	0,1 % (v/v)
Weichagar	Agar-Agar (hochrein)	0,75 % (w/v)
	Phytone-Pepton	0,5 % (w/v)
	Poly-Pepton	0,5 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,25 % (w/v)
	Fleischextrakt	0,5 % (w/v)
	Ascorbinsäure	0,05 % (w/v)
	Dinatrium- β -Glycerophosphat	1,9 % (w/v)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 % (w/v)	

3.1.4 Antibiotika und Medienzusätze

In dieser Arbeit wurden verschiedene Antibiotika und Medienzusätze verwendet (Tab. 4). Antibiotika wurden mit rH₂O oder 99,8%igem Ethanol (EtOH) angesetzt und filtriert (Spritzfilter, Whatman®, Porengröße 0,2 μ m). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Medienzusätze wurden in rH₂O gelöst, filtriert und als Aliquots bei -20 °C gelagert.

Tab. 4. Verwendete Antibiotika und Medienzusätze.

Bezeichnung	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin-Dinatriumsalz	50 mg ml ⁻¹ in rH ₂ O	100 μ g ml ⁻¹
Erythromycin	10 mg ml ⁻¹ in EtOH	200 μ g ml ⁻¹ , 5 μ g ml ⁻¹
DL-Threonin	1 M in rH ₂ O	40 mM
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 M in rH ₂ O	0,1 mM
Mitomycin C	0,1 mg ml ⁻¹ in rH ₂ O	0,1 - 0,4 μ g ml ⁻¹

3.1.5 Bakterien und Bakteriophagen

Die Bakterienstämme und der Bakteriophage TP-J34 wurden der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT), Max Rubner-Institut, Kiel, entnommen, oder von den angegebenen Herstellern bezogen (Tab. 5).

Tab. 5. Verwendete Bakterien und Bakteriophagen.

Name		Eigenschaften	Referenz/Quelle
Bakterien			
<i>L. lactis</i>	Bu2-60	plasmidfreies Derivat von Bu2; Sm ^R und Rm ^R	Neve <i>et al.</i> , 1984
	J34f-2	pJ34-kuriertes Derivat des lysogenen Stammes J34 mit nativem Plasmid pJ34 (3,4 kb); homogenes Wachstum	Sun <i>et al.</i> , 2006
	J34-6f	Prophagen- und pJ34-kuriertes Derivat von J34; sedimentierendes Wachstum	Sun, 2001 Sun <i>et al.</i> , 2006
<i>S. therm.</i>	J34-12f	pJ34-kuriertes Derivat von J34 mit nicht-induzierbarem TP-J34 aufgrund einer Insertion in <i>rir</i> ; homogenes Wachstum	Neve <i>et al.</i> , 2003
	J34cu50	J34f-2-Derivat mit nicht-induzierbarem TP-J34 aufgrund D29A-Punktmutation in <i>rir</i> ; sedimentierendes Wachstum	Mohamed, 2010
	DH5 α	Klonierungsstamm	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>E. coli</i>	LMG194	Expressionsstamm für toxische Gene	Life Technologies, Darmstadt
	BL21(DE3)	Expressionsstamm; DE3-Fragment des λ -Phagen im Genom kodiert für T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des <i>lacUV5</i> -Promotors	Novagen, Inc., Darmstadt
Bakteriophagen			
	TP-J34	temperenter <i>pac</i> -Phage von <i>S. thermophilus</i> J34	Neve <i>et al.</i> , 1998

3.1.6 Plasmide und Plasmidkonstrukte

Die Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet bzw. hergestellt wurden, sind in Tabelle 6 zusammengetragen. Die inserierte DNA stammte aus den Genomen des TP-J34-Prophagen, von *S. thermophilus* J34f-2 und *E. coli* BL21(DE3). Die physikalischen Karten der Plasmide sind im Anhang in den Abbildungen 58 bis 62 zu finden.

Tab. 6. Verwendete Plasmide und Plasmidkonstrukte.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz/Quelle
pGEX-6P-1	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor mit <i>tac</i> -Promotor zur Produktion von Fusionsproteinen mit N-terminalen GST-tag; 4.984 bp; Amp ^R	GE-Healthcare Life Sciences, Freiburg

pGEX-6P- <i>orf3</i>	pGEX-6P-1 mit <i>rir</i> in BamHI-/NotI-Schnittstelle; 5.330 bp; Amp ^R	Faulhaber Diplomarbeit, 2012
pSK6	pGEX-6P-1 mit <i>crh</i> in BamHI-/NotI-Schnittstelle; 5.327 bp; Amp ^R	Koberg Diplomarbeit, 2012
pSK6LDA	pGEX-6P-1 mit <i>crh</i> (Punktmutationen) in BamHI-/NotI-Schnittstelle; 5.327 bp; Amp ^R	diese Arbeit
pBSK <i>cro</i>	pGEX-6P-1 mit <i>coh</i> in BamHI-/EcoRI-Schnittstelle; 5.185 bp; Amp ^R	diese Arbeit
pGEX <i>lexA</i>	pSK6 mit <i>lexA</i> aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) in BamHI-/HindIII-Schnittstelle; 5.767 bp; Amp ^R	diese Arbeit
pGEX <i>recA</i>	pGEX-6P-1 mit <i>recA</i> aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2 in NcoI-/NotI-Schnittstelle; 6.101 bp; Amp ^R	diese Arbeit
pGEX <i>hdiR</i>	pGEX-6P-1 mit <i>hdiR</i> aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2 in BamHI-/NotI-Schnittstelle; 5.651 bp; Amp ^R	diese Arbeit
pG ⁺ host9	<i>Shuttle</i> -Vektor mit thermosensitiven Replikon (T _s); 3.749 bp; Em ^R	Maguin <i>et al.</i> , 1996
pG <i>hrecA</i>	pG ⁺ host9 mit internem Δ <i>recA</i> -Gen in XhoI-/EcoRI-Schnittstelle; 4.414 bp; Em ^R	diese Arbeit
pMG36e	pWV01-Derivat mit P32-Promotor zur konstitutiven Expression von Genen; <i>shuttle</i> -Vektor; 3.611 bp; Em ^R	van de Guchte <i>et al.</i> , 1989
pSK10	pMG36e mit <i>rir</i> in SacI-/HindIII-Schnittstelle; 3.998 bp; Em ^R	diese Arbeit
pSK20	pMG36e mit <i>gst-crh</i> in XbaI-/HindIII-Schnittstelle; 4.652 bp; Em ^R	diese Arbeit

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

E. coli wurde in LB-Medium bei 37 °C aerob geschüttelt (200 rpm). *L. lactis*-Flüssigkulturen wurden bei 30 °C in GM17-Medium aerob ohne Schütteln angezogen. Für *S. thermophilus* wurde thLM17-Medium (Tab. 3) verwendet und bei 40 °C inkubiert. Tageskulturen wurden aus einer Übernachtskultur 1%ig angeimpft. Das Zellwachstum wurde durch Bestimmung der OD₆₂₀ mit einem Photometer (Nanocolor[®] 500D, Macherey-Nagel) kontrolliert. Beim Ausplattieren auf Festmedien wurden bis zu 100 µl Flüssigkultur mit einem sterilen Drigalskispattel auf einer Platte gleichmäßig verteilt. Zur Selektion plasmidtragender Zellen wurde den Nährmedien das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt (Tab. 4). Bei der Kryokonservierung zur Langzeitlagerung wurden 0,85 ml Zellkultur mit 0,15 ml Glycerin (86 %ig) in Kryoröhrchen vermengt und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Induktion von Prophagen durch Mitomycin C

Zur Freisetzung von Prophagen aus dem Genom lysogener *S. thermophilus* J34-Derivate wurde eine Mitomycin C(MMC)-Induktion angewendet. 5 ml thLM17-Medium wurden 1%ig mit einer Übernachtskultur des lysogenen Stammes inokuliert und im Wasserbad bei 40 °C bis zu einer OD₆₂₀ von 0,2 inkubiert. Weitere 5 ml thLM17-Medium, versetzt mit 0,1 bis 0,4 µg ml⁻¹ MMC (Tab. 4), wurden zu der Kultur gegeben und vermischt. Die OD₆₂₀ wurde alle 30 Minuten gemessen. Im Fall einer Zellyse sank die OD₆₂₀ bis auf ein Minimum ab. An diesem Punkt wurde das Lysat filtriert (Spritzenfilter, Whatman[®], Porengröße 0,45 µm) und kühl gelagert. Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden alle Ansätze in dreifacher Ausführung gemessen und die Mittelwerte bestimmt. Als Kontrollen wurden die nicht-induzierten Stämme sowie der induzierbare Stamm J34f-2 mitgeführt. Für größere Ansätze wurden 250 ml Medium eingesetzt, die mit einer äquivalenten Menge Medium zuzüglich MMC induziert wurden.

3.2.3 Plaquetest

Der Titer einer Phagenlösung, d. h. die Anzahl der plaquebildenden Einheiten pro Milliliter (PbE ml⁻¹) wurde mit Hilfe eines Plaquetests (modifiziert nach Adams, 1959) bestimmt. Alle Plaquetests wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Von der Phagenlösung wurden jeweils 0,5 ml in 4,5 ml Verdünnungslösung (Tab. 7) seriell dezimal verdünnt. Je 0,1 ml einer Verdünnungsstufe wurden mit 0,3 ml 100 mM CaCl₂ sowie 0,3 ml einer Bakterien-Kultur in logarithmischer Phase (OD₆₂₀ ~ 0,8) zusammengegeben, gemischt und 10 min stillstehend inkubiert. Schließlich wurden alle Komponenten mit 3 ml Weichagar (Tab. 3) vermischt und auf eine oder thLM17-Agarplatte gegossen. Vor der Zugabe des Weichagars wurden 0,1 ml Magermilch (Tab. 7) und 0,15 ml 3%iges Glycin hinzugefügt. Nach dem Antrocknen wurden die Platten über Nacht invers im Brutschrank bei 40 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Plaques der einzelnen Verdünnungsstufen ausgezählt und der Titer abgeleitet von der Keimzählung nach Koch (Referenzverfahren) berechnet:

$$\frac{\sum y * d}{n_1 * 1 + n_2 * 0,1} = \text{Anzahl Plaque} - \text{bildende Einheiten pro ml} \left(\frac{\text{PbE}}{\text{ml}} \right)$$

$\sum y$ = Summe der Plaques aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen wurden

n_1 = Anzahl der Petrischalen der niedrigsten, auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 = Anzahl der Petrischalen der nächst höheren, auswertbaren Verdünnungsstufe

d = Reziproker Wert der Verdünnung der niedrigsten, auswertbaren Verdünnungsstufe

Tab. 7. Lösungen und Puffer zur Durchführung eines Plaquetests.

Lösung/Puffer	Komponente	Menge
Ringerlösung ($\frac{1}{4}$ stark)	Ringer-Tabletten	2
	rH ₂ O	1 l
Verdünnungslösung	Ringerlösung ($\frac{1}{4}$ stark)	90 ml
	LM17-Medium für mesophile (Tab. 3)	10 ml
	1 M CaCl ₂	1 ml
Weichagar	Agar-Agar (hochrein)	7,5 g
	Phyton-Pepton	5 g
	Poly-Pepton	5 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	Fleischextrakt	5 g
	Ascorbinsäure	0,5 g
	Na- β -Glycerophosphat	19 g
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 ml
	rH ₂ O	ad 1 l
Magermilch	Magermilch	100 g
	rH ₂ O	900 ml
	durch Aufkochen lösen und autoklavieren	

3.2.4 Spotttest

Ein Spotttest diente in dieser Arbeit zur Überprüfung, ob eine Lösung virulente Phagen enthielt. Die Durchführung verlief wie bei einem Plaquetest mit dem Unterschied, dass die Phagenlösung in Form von 100 μ l-Tropfen auf die ausgehärtete Bakterien-Agar-Platte gegeben wurde. Die Platten wurden getrocknet und über Nacht in den Brutschrank (40 °C) gestellt. Am Folgetag konnte anhand der vorhandenen oder nicht vorhandenen Lysezone die Sensitivität oder Insensitivität des Stammes sowie das Vorhandensein von Phagen bestimmt werden. Bei Bedarf konnte die Lysezone mit einer Impföse abgekratzt und in 3 ml thLM17-Medium mit 0,1 ml 40 mM CaCl₂ gegeben werden. Durch mehrstündiges Schütteln (100 rpm) wurden die Phagen aus dem Agar gelöst. Schließlich wurde die Lösung filtriert (0,45 μ m) und bei 4 °C gelagert. Nach Belieben konnten die Phagen unter dem Transmissionselektronenmikroskop (3.2.6) analysiert werden.

3.2.5 Lytische Anzucht von Phagen

Die Gewinnung von Phagen mit bekanntem Wirtstamm erfolgte durch eine lytische Anzucht. Für eine optimale Ausbeute wurde das richtige Verhältnis von Bakterien und Phagen ermittelt. In einem kleinen Maßstab wurden 0,3 ml einer Übernachtskultur mit 0,1 ml, 0,2 ml und

0,3 ml Phagenlysat sowie 0,1 ml 40 mM CaCl₂ vermischt und 10 Min inkubiert. Dann wurden 5 ml aufgewärmtes thLM17-Medium zugegeben und die OD₆₂₀ gemessen. Von diesem Zeitpunkt an wurde die OD₆₂₀ alle 30 min bestimmt um eine Lyse der Bakterien zu verfolgen.

3.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie von Phagen

Die Morphologie der Phagen wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Tecnai 10 von Philips untersucht (FEI Company, Eindhoven, NL). In der Bedampfungsanlage BAL-TEC MED20 (Balzers, Lichtenstein) wurde ein Kohlefilm aus reiner Kohle auf eine frisch gespaltene Glasglimmerplatte (Plano, Wetzlar) aufgedampft. Die Glasglimmerplatte wurde in Quadrate geschnitten (3 x 3 mm) und der Kohlefilm von diesen durch Eintauchen in 100 µl Phagenlysat (Titer >10⁷ PbE ml⁻¹) abgelöst. Nach 20-minütiger Adsorptionszeit wurde der Kohlefilm in zwei Tropfen rH₂O gewaschen und anschließend für wenige Sekunden in 2 %iger Uranylacetat-Lösung angefärbt, bevor er auf ein 400-*mesh*-Kupfernetz (Agar Scientific, Stansted, UK) übertragen wurde. Überschüssiges Färbemittel wurde mit einem Filterpapier abgezogen. Die getrockneten Proben wurden in das TEM geschleust und bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV angesehen. Die Aufnahmen der Phagen wurden mit einer CCD-Kamera (Megaview G2, SIS Olympus, Münster) bei einer Primärvergrößerung von 160.000x bis zu 210.000x angefertigt. Die Bildanalyse wurde mit der iTEM 5.2 TEM Imaging Plattform Software (SIS Olympus, Münster) durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 DNA-Auftrennung via Agarose-Gelelektrophorese

Die größenmäßige Auftrennung von DNA erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001). Gele mit 0,8 oder 2 % Agarosegehalt wurden durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer (Tab. 8) gelöst und in einen Schlitten mit einem 8er- oder 15er-Kamm gegossen. Das auspolymerisierte Gel wurde in einer 1x TAE gefüllten Kammer (Mini-Sub[®] Cell GT, Bio-Rad) mit DNA-Proben beladen. Diese wurden vorher mit 6x *Loading Dye* (Tab. 8) vermischt. Als Größenstandard wurden überwiegend die DNA Leiter 1 kb oder die DNA Leiter 100 bp plus (Tab. 36, Anhang) eingesetzt. Die Auftrennung verlief 50 bis 70 min bei 74 bis 86 V (Mini Power Pack P20, Biometra). Anschließend wurden die Gele 15 min in einer

Ethidiumbromidlösung ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$ rH₂O) gefärbt, 10 min in rH₂O entfärbt und unter UV-Licht fotografiert (Universal Hood II ChemiDoc XRS, Bio-Rad).

Tab. 8. Komponenten für die Agarose-Gelelektrophorese.

Lösung/Puffer	Komponente	Menge
Agarosegel (0,8 oder 2 %)	Agarose	0,8 g/2 g
	1x TAE	ad 100 ml
6x Loading Dye	Glycerin	33 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,07 % (w/v)
50x TAE (pH 8,3)	Tris-Acetat	2 M
	EDTA-Dinatriumsalz	0,05 M
1x TAE-Laufpuffer	50x TAE	40 ml
	rH ₂ O	1960 ml
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	20 μl
	rH ₂ O	100 ml

3.3.2 DNA-Aufreinigung/-Konzentrierung und -Extraktion aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von Restriktionshydrolysen, Ligationsansätzen und PCR-Ansätzen sowie zur Konzentrierung von DNA wurde das *DNA Clean & Concentrator Kit* (Zymo Research) verwendet. Zur Isolierung bestimmter DNA-Fragmente aus einem DNA-Gemisch wurde dieses durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das gewünschte Fragment nach Visualisierung durch UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Für die Extraktion der DNA wurde das *ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) verwendet.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration und Reinheit einer dsDNA-Lösung wurde mit dem NanoDrop 2000c (Peqlab) photometrisch bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte, indem eine OD₂₆₀ von 1 mit einer dsDNA-Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ gleichgesetzt wurde. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm sollte idealerweise bei 1,8 oder höher liegen. Darunterliegende Werte waren ein Indikator für Kontaminationen mit Proteinen oder Phenol. Das 260 nm/230 nm-Verhältnis gab Verunreinigungen mit Polysacchariden o. ä. an und sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die gezielte Vervielfältigung (Amplifikation) eines DNA-Abschnitts erfolgte durch eine Polymerase-Kettenreaktion. Für DNA-*inserts* zur Klonierung (Tab. 20, 3.5.1) wurde die *Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase* (2 U ml⁻¹, Thermo Fisher Scientific) mit *proofreading*-Funktion verwendet. Andernfalls wurde der *5 Prime Master Mix* (5Prime GmbH) eingesetzt. Es wurden jeweils die Protokolle der Hersteller befolgt. Mit Hilfe der Software *SnapGene* wurden die Primer für den DNA-Abschnitt, den es zu vervielfältigen galt, gewählt. Die Primersequenzen wurden durch den *OligoAnalyzer 3.1* auf unerwünschte Hybridisierungen (*primer dimer*) bzw. Sekundärstrukturen (DNA *hairpin*) geprüft. Auch die Schmelztemperaturen (T_M) eines Primerpaares wurden angeglichen. Zur Klonierung wurden am 5'-Ende der Primer die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym und mindestens drei Basen zusätzlich angefügt. Die verwendeten Primer (Tab. 9) wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen. Sie besaßen HPSF-Reinheit.

Tab. 9. Verwendete Oligonukleotide (Primer) und ihre Schmelztemperaturen.

Primer	5' → 3' Sequenz	T _M (°C)	Quelle
<i>crh_for_BamHI</i>	GGCGGATCCATGGATTGGAATAAGC	63,0	Koberg Diplomarbeit, 2012
<i>crh_rev_NotI</i>	TCGCGGCCGCTCACTTTTCCTTGCT	67,9	Koberg Diplomarbeit, 2012
<i>GST-Crh_XbaI_f</i>	GCTCTAGAATGTCCCTATACTAGGT	63,2	diese Arbeit
<i>GST-Crh_HindIII</i>	GCAAGCTTTCACTTTTCCTTGCTATT	60,1	diese Arbeit
<i>orf3-BamHI-rev</i>	GAAGGATCCATGAATGAGAGTGAATTGC	63,7	Faulhaber Diplomarbeit, 2012
<i>orf3-NotI-for</i>	TGCGGCCGCTCAAGTTTCTATTAACTTT	63,7	Faulhaber Diplomarbeit, 2012
<i>orf3_SacI_fw</i>	GCGAGCTCATGAATGAGAGTGAATTGC	65,0	diese Arbeit
<i>orf3 HindIII.R</i>	ATAAAGCTTAACGTGATTCAGTTTTGCACG	62,7	Mohamed, 2010
<i>cro_BamHI_for</i>	GGCGGATCCATGACAGAAGTAGTTC	64,6	diese Arbeit
<i>cro_EcoRI_rev</i>	GGCGAATTCTCAGATACCATACAAATC	61,9	diese Arbeit
<i>recA_BamHI.2</i>	GCGGATCCATGGCTAAGAAAACAAAG	63,2	diese Arbeit
<i>recA_NotI</i>	GCGCGGCCGCTTATTCCTCGATTTTC	66,3	diese Arbeit
<i>lexA_BamHI_f</i>	GGCGGATCCATGAAAGCGTTAACGGC	68,0	diese Arbeit
<i>lexA_HindIII_r</i>	GGCAAGCTTTTACAGCCAGTCGCCG	67,9	diese Arbeit
<i>hdiR_pGEX_NotI</i>	GGCGCGGCCGCTAAGCCTCAATAGG	72,7	diese Arbeit
<i>hdiR_BamHI_f</i>	GGCGGATCCATGTTTTCAGGACAAAG	64,8	diese Arbeit
<i>recA_for_XhoI</i>	GGCCTCGAGCTGTTGCCCTTCATGCAGT	71,0	diese Arbeit
<i>recA_rev</i>	GGCGAATTCTTGACCAATTTTCTCCCCA	65,1	diese Arbeit
<i>FDGKPL</i>	CATCAGTCAATGCTTTTCGGTCGACCATCAT	66,8	diese Arbeit
<i>GST-Crh_XbaI_f</i>	GCTCTAGAATGTCCCTATACTAGGT	63,2	diese Arbeit
<i>pGh9-seq-r-new</i>	GCCATACCACAGATGTTC	53,7	Faulhaber Diplomarbeit, 2012
<i>MZ12.R</i>	ATAGCAGATTATCGAATCGGTCAG	59,3	Mohamed, 2010
<i>crh_O1A</i>	CCTCTTTGCTTATTCAAAATCCAT	55,3	diese Arbeit
<i>cro_O1A</i>	ATTTTTGGAACTACTTCTGTTCAT	53,5	diese Arbeit
<i>cro_O1B</i>	ATGACAGAAGTAGTTCCAAAAAT	53,5	diese Arbeit
<i>ant_O1B</i>	GAAACAACAGGCTCTTGATTTT	54,7	diese Arbeit

pri. CI-F	<u>CTTTGTACCCGTTGGGATAC</u>	57,3	Mohamed, 2010
pri. CI-R	<u>AAGCAAAGAGGTAGCAGAATC</u>	55,9	Mohamed, 2010

Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Zur Amplifizierung von TP-J34-Genen wurde genomische DNA aus *S. thermophilus* J34f-2 als *template* eingesetzt. Die PCR wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäßen mit den in Tabelle 10 angegebenen Schritten im Mastercycler (Eppendorf) mit einem individuellen Programm (Tab. 11 und Tab. 20) durchgeführt. Die Temperatur zur Primer-Hybridisierung (*annealing*) wurde aus dem Mittelwert der Primer-Schmelztemperaturen abzüglich 5 °C ermittelt.

Tab. 10. Übersicht eines PCR-Programms.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98 °C/ 95 °C	3 min
Denaturierung	98 °C/ 95 °C	30 s
Annealing	T _M minus 5 °C	30 s
Elongation	72 °C	15-30 s pro 1 kb 1 min pro 1 kb
Finale Elongation	72 °C	7 min
Kühlen	4 °C	∞

35x

Die *Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase* benötigte 98 °C sowie 15 bis 30 s pro 1 kb.

Tab. 11. Angewendete PCR-Programme.

DNA-Produkt	Primer	Annealing	Elongation
DO1A aus TP-J34	<u>crh_O1A</u> <u>cro_O1A</u>	50 °C	20 s
DO1B aus TP-J34	<u>cro_O1B</u> <u>ant_O1B</u>	50 °C	20 s
DO _{crh} aus TP-J34	<u>pri. CI-F</u> <u>pri. CI-R</u>	52 °C	20 s

3.3.6 Kolonie-PCR

Mit Hilfe einer Kolonie-PCR konnte die DNA einer Bakterienkolonie direkt ohne vorherige DNA-Präparation für eine PCR eingesetzt werden. Die Methode eignete sich besonders für ein *Screening* von Bakterienklonen nach gewünschten Plasmidkonstrukten. Eine Einzelkolonie wurde von einer Nährbodenplatte gepickt und in 50 µl sterilem rH₂O resuspendiert. Der

Ansatz wurde für 10 min bei 95 °C erhitzt, auf Eis abkühlt und kurz abzentrifugiert. Dann wurden 2 µl des Überstands als *template* für eine PCR verwendet.

3.3.7 Erzeugung einer Crh-Mutante mittels LDA

Die *Ligation-during-amplification* (LDA) nach Chen, 1998 ist eine Methode zur Generierung von mutierter, zirkulärer DNA während einer PCR. Das Prinzip beruht auf der Einbeziehung einer thermostabilen DNA-Ligase in eine PCR-Reaktion, die zirkuläre DNA als *template* nutzt. Mit Hilfe eines mutagenen Primers wird ein linearer DNA-Strang synthetisiert, der nach Verlängerung durch die DNA-Ligase zu einem zirkulären DNA-Molekül verknüpft wird. Mit dem mutagenen Primer 'FDGKPL' und dem Primer 'GST-Crh_XbaI_f' wurden drei Punktmutationen in das *crh*-Gen im Plasmid pSK6 eingefügt (Abb. 10).

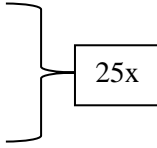


Abb. 10. Erzeugung von drei Punktmutationen (rot) im *crh*-Gen des Plasmids pSK6 durch den Primer 'FDGKPL' im Zuge einer LDA.

In einem gekühlten 50 µl-Ansatz wurden 10 ng pSK6 als *template* mit jeweils 10 pmol Primer 'FDGKPL' und 'GST-Crh_XbaI_f' (Tab. 9), 1 µl dNTP-Mix (10 mM jeweils), 1 µl ATP (5 nmol), 5 µl 5x GC-Puffer und 0,5 µl *Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase* (alle Komponenten Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Abschließend wurden 1 µl der thermostabilen *Pfu DNA Ligase* (4 U µl⁻¹, Stratagene) und 2,5 µl 10x Ligase-Puffer zugefügt und das PCR-Programm (Tab. 12) gestartet. Im Anschluss wurde der PCR-Ansatz für 2 h bei 37 °C mit DpnI (3.3.8) verdaut, um die *dam* methylierte *template*-DNA abzubauen. Nach Aufreinigung des Ansatzes (3.3.2) erfolgte die Hitzeschocktransformation in *E. coli* BL21 (DE3). In einer Sequenzierung mit dem Primer '*crh_for_BamHI*' (Tab. 9) wurde das Plasmid mit der gewünschten Mutation identifiziert.

Tab. 12. PCR-Programm für die LDA.

Schritt	Temperatur	Dauer
Ligation	70 °C	10 min
Denaturierung	98 °C	30 s
Annealing	60 °C	30 s
Elongation	72 °C	60 s
Finale Elongation	72 °C	7 min
Kühlen	4 °C	∞



3.3.8 DNA-Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurde zur Gewinnung von DNA-Fragmenten für Klonierungen und zur Verifizierung von Plasmid-Konstrukten durchgeführt (3.3.9). Restriktionendonukleasen des Typs II wurden von Thermo Fisher Scientific und der New England Biolabs GmbH bezogen. Der DNA-Verdau wurde gemäß den Herstellerangaben mit 5 bis 10 *Units* des Enzyms in den dazugehörigen Puffern für mindestens 1 h und maximal 16 h bei 37 °C durchgeführt. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen eines Verdau mit zwei Enzymen wurde das *double digest*-Tool von Thermo Fisher Scientific genutzt. Im Anschluss folgte eine Überprüfung der Restriktion durch eine Agarose-Gelelektrophorese (3.3.1).

3.3.9 DNA-Klonierungen

Bei der Klonierung wurden ein DNA-Abschnitt (*insert*) und ein Plasmid unter Verwendung gleicher Restriktionsenzyme verdaut (3.3.8), ligiert und in Bakterien transformiert. Die Plasmid-DNA wurde zusätzlich dephosphoryliert (3.3.9.1). Auf den Selektionsplatten gewachsene Bakterienklone wurden auf das *insert*-tragende Plasmid hin untersucht, indem eine Plasmidpräparation oder ein *Colony Cracking* (3.3.10) durchgeführt wurden. Die isolierten Plasmide und das Ausgangsplasmid wurden mit den gleichen Enzymen verdaut und über ein Agarosegel aufgetrennt, um sie hinsichtlich ihrer Größe miteinander zu vergleichen. Alternativ wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (3.3.6). Zur Überprüfung der Nukleotidsequenz der *inserts* wurde das Plasmid zur Sequenzierung gegeben (3.3.13).

3.3.9.1 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Die Religation verdauter Plasmid-DNA wurde durch Dephosphorylierung der 5'-Phosphat-Enden mit der *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific) verhindert. Die Dephosphorylierung erfolgte simultan zur Linearisierung gemäß Herstellerprotokoll. Die dephosphorylierte DNA wurde vor Verwendung für eine Ligation über eine Säule (*DNA Clean & ConcentratorTM*, Zymo Research) aufgereinigt.

3.3.9.2 DNA-Ligation

Zur Verknüpfung (*ligation*) zweier linearer DNA-Moleküle mit komplementären, überhängenden Enden (*sticky ends*) wurde mit der *Quick T4 DNA Ligase* (New England Biolabs GmbH) und der *T4 DNA Ligase* (5 U ml^{-1} , Thermo Fisher Scientific) gearbeitet. Für letztere betrug die Inkubationszeit bis zu 16 h bei Raumtemperatur. Die Ligation erfolgte nach den Angaben der Hersteller in Ligationspuffer, wobei 50 ng linearisiertes Plasmid und ein mindestens dreifacher molarer Überschuss an *insert*-DNA zusammengegeben wurden. Die molaren Verhältnisse wurden mit Hilfe des *Ligation Calculator* (Tab. 34, Anhang) berechnet. Die Ligationsansätze wurden direkt für eine Hitzeschocktransformation von *E. coli* (3.3.9.3, a) eingesetzt oder vorab für eine Elektroporation (3.3.9.3, b und c) aufgereinigt.

3.3.9.3 Transformation von Plasmid-DNA

a. ...in *E. coli* -Zellen per Hitzeschock

Chemisch-kompetente *E. coli* wurden mit der Calciumchlorid-Methode gewonnen. 200 ml LB-Medium wurden 1%ig mit einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) bis zu einer OD_{585} von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert (10 min bei $10.000 \times g$ und 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 12,5 ml eiskaltem TMF-Puffer [100 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{MnCl} \times 4\text{H}_2\text{O}$, 50 mM RbCl] resuspendiert. Nach einer Inkubation für 1 h auf Eis wurden die Zellen bei gleichen Bedingungen sedimentiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml TMF-Puffer gelöst, es wurden 750 μl Glycerin (86 %ig) hinzugefügt und die Zell-Suspension wurde als 200 μl -Aliquots bei -80 °C gelagert. Für die Hitzeschocktransformation wurden etwa 100 ng Plasmid-DNA und 100 μl TMF-Puffer zu einem Aliquot der Zellen auf Eis gegeben und mindestens 30 min inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 2 min bei 42 °C im Wasserbad. Dann wurden die Zellen 1 min auf Eis gekühlt, bevor 1 ml LB-Medium hinzugegeben und die Zellen 40 min bei 37 °C geschüttelt wurden (200

rpm). Vor dem Ausplattieren wurden sie sedimentiert (1 min, 16.000 x g), der Überstand bis auf etwa 100 µl dekantiert und die Zellen darin resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden auf einer LB-Selektionsplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Nach Antrocknung wurde die Platte invers über Nacht bei 37 °C inkubiert.

b. ...in *L. lactis* (Holo und Nes, 1995)

In einem Vorversuch wurde die Glycintoleranz der Laktokokken ermittelt. Dazu wurde die *L. lactis*-Kultur in GM17-Medium mit 0,2 bis 4 % Glycin versehen und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die maximale Glycinkonzentration gewählt, bei der die Zellen eine OD₆₂₀ von 0,2 bis 0,7 erreichten. SGM17-MC-Bouillon (Tab. 13) zuzüglich der ermittelten Glycinmenge wurde 1%ig mit einer Vorkultur (OD₆₂₀ 0,5 bis 0,8) inokuliert und über Nacht bei 30 °C bebrütet. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, 5.000 x g, 4 °C) und anschließend zweimal in eiskaltem Elektroporationspuffer (Tab. 13) gewaschen. Sie wurden schließlich in 2 ml dieses Puffers aufgenommen und in Aliquots von 100 µl mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Transformation wurden die Aliquots auf Eis aufgetaut, 1 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und das Bakterien-DNA-Gemisch luftblasenfrei in eine vorgekühlte Küvette (Gene Pulser 0,1 cm, Bio-Rad) überführt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und dann bei 2.050 V, 25 µF und einer Zeitkonstante von 4,5 bis 5 ms elektroporiert (Electroporator 2510, Eppendorf). Sofort im Anschluss wurden die Bakterien in 1 ml vorgewärmtem SGM17-MC-Medium aufgenommen und 2 h bei 30 °C im Wasserbad kultiviert. Dann wurden sie sedimentiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen. In diesem wurde das Pellet resuspendiert und die Resuspension auf einer GM17-Selektionsplatte mit 5 µg ml⁻¹ Erythromycin (Tab. 4) ausplattiert. Die Selektionsplatte wurde invers 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Tab. 13. Medien und Puffer zur Erzeugung und Elektroporation kompetenter Laktokokken.

Medium/Puffer	Komponente	Menge
SGM17-MC	MgCl ₂	20 mM
	CaCl ₂	2 mM
	in GM17-Bouillon	
Elektroporationspuffer	Saccharose	0,5 M
	Glycerol	10 % (v/v)

c. ...in *S. thermophilus*

Zur Herstellung elektrokompenter *S. thermophilus*-Zellen wurden 30 ml Belliker-Medium (Tab. 14) mit 40 mM DL-Threonin (Tab. 4) 1%ig mit einer Übernachtskultur beimpft. Die Zellkultur wurde bei 40 °C im Wasserbad bis zu einer OD₆₂₀ von 0,2 bis 0,4 kultiviert. Dann wurden die Zellen geerntet (4.500 x g, 10 min bei 4 °C) und das Medium dekantiert. Das Pellet wurde in 5 ml Elektroporationspuffer (Tab. 14) resuspendiert und wieder sedimentiert (4.500 x g, 10 min bei 4 °C). Der Vorgang wurde einmal wiederholt, wobei die Resuspension danach mit Elektroporationspuffer auf eine OD₆₂₀ von 1,7 bis 1,8 eingestellt wurde. Die Zellen wurden in Aliquots von 100 µl durch Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Elektroporation von *S. thermophilus* verlief ähnlich der von *L. lactis*. Sie wurde bei einer höheren Spannung (2.100 V, 25 µF, Zeitkonstante 1,8 bis 2) und mit HJL-Medium (Tab. 14) statt SGM17-MC-Medium durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Elektroporation 4 bis 6 h bei 30 °C (bei pG⁺host9-Derivaten) bzw. 40 °C inkubiert und die Platten nach Ausstrich zwei Tage invers inkubiert.

Tab. 14. Medien und Puffer zur Erzeugung und Transformation elektrokompenter *S. thermophilus*.

Medium/Puffer	Komponente	Menge
Belliker-Medium (McLaughlin und Ferretti, 1995)	Trypton	2 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Gelatine	0,25 % (w/v)
	Glucose	0,5 % (w/v)
	Saccharose	0,5 % (w/v)
	Lactose	0,5 % (w/v)
	Ascorbinsäure	0,05 % (w/v)
Elektroporationspuffer (pH 6,5) (McLaughlin und Ferretti, 1995)	Fleischextrakt	1 % (w/v)
	Saccharose	272 mM
	EDTA	1 mM
	Hepes	7 mM
HJL-Medium (McLaughlin und Ferretti, 1995)	Glycerol	15 % (v/v)
	Trypton	3 % (w/v)
	Hefeextrakt	1 % (w/v)
	KH ₂ PO ₄	0,5 % (w/v)
	Fleischextrakt	0,2 % (w/v)
	Lactose	0,5 % (w/v)

3.3.10 Plasmidpräparationen

a. ...aus *E. coli*

Für eine Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das *ZR Plasmid MiniprepTM-Classic Kit* (Zymo Research) verwendet.

b. ...aus *E. coli* (*Colony Cracking*)

Das *Colony Cracking* stellt eine Methode zur schnellen Identifikation von positiven Transformanten dar. Eine Einzelkolonie wurde von einer Selektionsplatte gepickt und in einem Reaktionsgefäß mit 25 µl 10 mM EDTA gelöst. Nach Hinzufügen von 25 µl frisch angesetztem *Cracking* Puffer (Tab. 15) wurde der Ansatz für 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt. 3 bis 5 µl *Cracking* Farbe (Tab. 15) wurden zugegeben und anschließend zentrifugiert (16.100 x g, 5 min). Mindestens 15 µl des Überstands wurden direkt auf ein Agarosegel (3.3.1) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Vergleich mit einem Leervektor konnten vermeintlich positive Transformanten identifiziert werden.

Tab. 15. Lösungen und Puffer für das *Colony Cracking*.

Lösung/Puffer	Komponente	Menge
<i>Cracking</i> Puffer	2 N NaOH	100 µl
	10 % (w/v) SDS	50 µl
	Saccharose	0,2 g
	rH ₂ O	ad 1 ml
<i>Cracking</i> Farbe	KCl	4 M
	Bromphenolblau	0,4 % (w/v)

c. ...aus *L. lactis*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *L. lactis* wurde das Protokoll von MoBiTec¹ verwendet.

¹ Plasmid DNA isolation from *Lactococcus lactis*, small scale (S. 14-15) aus "NICE Expression System for *Lactococcus lactis*. The effective & easy to operate NIsin Controlled gene Expressionsystem".

d. ...aus *S. thermophilus* (Anderson und McKay, 1983)

Für die Plasmidisolierung aus *S. thermophilus* wurde das Protokoll nach Anderson und McKay, 1983 angewendet. Abweichend vom Protokoll wurde den Übernachtskulturen 40 mM DL-Threonin (Tab. 4) zugesetzt.

3.3.11 Isolierung chromosomaler DNA aus Grampositiven (Schleifer *et al.*, 1991)

Für die Isolierung chromosomaler DNA aus grampositiven *L. lactis* und *S. thermophilus* wurden 10 ml einer über Nacht gewachsenen DL-Threonin-Kultur abgeerntet (16.100 x g, 2 min). Das Pellet wurde in 1,5 ml rH₂O aufgenommen und die Resuspension danach sedimentiert (16.100 x g, 2 min). Nach Resuspension des Zellpellets in 500 µl Lösung A (Tab. 16) mit 5 mg ml⁻¹ Lysozym (Serva) und 6 µl Mutanolysin (2.500 U ml⁻¹, Sigma-Aldrich) erfolgte eine Inkubation bei - 20 °C für 30 min oder über Nacht. Anschließend wurde für 10 min bei 55 °C inkubiert. Es wurden 60 µl Proteinase K (20 mg ml⁻¹, AppliChem) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Dann wurden 25 µl 10 % (w/v) SDS zugefügt und es wurde nochmals invertiert. Durch Inkubation für 1 h bei 60 °C wurden die Zellen lysiert. Es folgte die Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der zweimal hintereinander 250 µl rH₂O, 250 µl Phenol und 250 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 v/v) zu dem Lysat pipettiert wurden. Zwischen den einzelnen Schritten wurde durch Invertieren gemischt und nach Zugabe von Chloroform wurde jeweils abzentrifugiert (14.000 x g, 5 min). 500 µl der oberen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur DNA-Fällung mit 50 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 500 µl 2-Propanol versetzt. Auf die Inkubation für 1 h oder über Nacht bei - 20 °C folgte eine Zentrifugation (20.800 x g, 15 min, 4 °C) und eine Waschung des Pellets in 550 µl 70 % (v/v) EtOH (20.800 x g, 15 min, 4 °C). Das EtOH wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet getrocknet und schließlich in 200 µl 1x TE-Puffer (Tab. 16) resuspendiert. Zum Abbau der RNA wurden 5 µl RNase (10 mg ml⁻¹, Thermo Fisher Scientific) zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgte bei - 20 °C.

Tab. 16. Lösungen und Puffer zur Isolierung chromosomaler DNA aus Grampositiven.

Lösung/Puffer	Komponente	Menge
Lösung A (pH 8,1)	Saccharose	5,8 mM
	EDTA	10 mM
	NaCl	50 mM
	Tris-HCl	10 mM

1x TE-Puffer (pH 8)	1 M Tris-HCl (pH 7,5)	10 ml
	0,5 M EDTA (pH 8)	2 ml

3.3.12 Gen-*Knockout* mit Hilfe des thermosensitiven pG⁺host9

Das chromosomale *recA*-Gen in *S. thermophilus* J34f-2 wurde mit Hilfe des *shuttle*-Vektors pG⁺host9 (Maguin *et al.*, 1996) ausgeschaltet (= Gen-*Knockout*). Das Prinzip beruht auf einem thermosensitiven Replikon-Derivat aus pWV01, welches ab einer Temperatur von 37 °C nicht mehr autonom replizieren und nur nach Integration in das Bakteriengenom weiter in den Zellen persistieren kann. Zum *Knockout* des *recA*-Gens in *S. thermophilus* J34f-2 wurde mit den Primern '*recA_for_XhoI*' und '*recA_rev*' ein internes *recA*-Fragment amplifiziert (Tab. 17) und in die *XhoI*- und *EcoRI*-Schnittstellen von pG⁺host9 (Abb. 62, Anhang) kloniert. Nach Etablierung des gewünschten Konstrukts in *L. lactis* Bu2-60 bei 30 °C wurde es weiter in *S. thermophilus* J34f-2 transformiert (3.3.9.3, c.). Die Selektion auf Zellen mit integriertem Plasmid erfolgte, indem die Zellen bei 30 °C bis zu einer OD₆₂₀ 0,2 und dann bei 42 °C weitere 3 h inkubiert wurden, bevor sie auf vorgewärmtem thLM17-Agar mit 5 µg ml⁻¹ Erythromycin ausplattiert wurden. Nach 2 Tagen Inkubation bei 40 °C wurden Kolonien von der Platte in vorgewärmtes thLM17 überführt. Eine erfolgreiche Integration in das entsprechende Gen im Genom wurde durch eine Plasmidpräparation (3.3.10, d.) und eine PCR mit einem Primer, der in pG⁺host9 bindet und einem Primer, der im Genom bindet (s. Integrationsnachweis I, Tab. 17) sowie durch Ausschluss eines PCR-Produkts mit den Primern '*recA_BamHI.2*' und '*recA_NotI*' zur *recA*-Amplifizierung bei einer Elongationszeit von 60 s (s. Integrationsnachweis II) nachgewiesen.

Tab. 17. PCR-Produkte zur Inserierung in pG⁺host9 und für den Nachweis einer erfolgreichen Integration.

PCR-Produkt	Primer	Annealing	Elongation
internes <i>recA</i> -Fragment	<i>recA_for_XhoI</i> <i>recA_rev</i>	64 °C	40 s
Integrationsnachweis I	pGh9-seq-r-new <i>cro_O1B</i>	50 °C	70 s
Integrationsnachweis II	<i>recA_BamHI.2</i> <i>recA_NotI</i>	60 °C	60 s

3.3.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Die Primer wurden den aufgereinigten Sequenzierungsproben beigefügt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte durch das *BlastN* und das *Basic Local Alignment Search Tool* von *NCBI* (Tab. 34 im Anhang).

3.4 Promotoranalysen

Zur Bestätigung und Lokalisierung von Promotoren im TP-J34-Lysogeniemodul wurde eine *5'RACE-PCR* (*rapid amplification of cDNA ends*) verwendet. Diese Methode dient zur Ermittlung der 5'-Enden von mRNA-Transkripten bis hin zum Transkriptionsstartpunkt (+1). Davon abgeleitet können Promotorelemente wie -10- und -35-Regionen lokalisiert werden (Abb. 11).

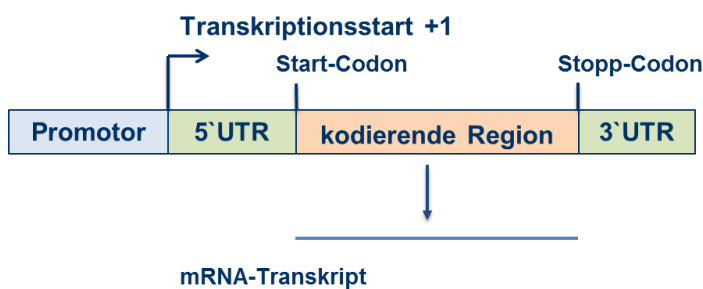


Abb. 11. Schematische Darstellung eines prokaryotischen Gens (kodierende Region) mit der 5' untranslatierten Region (5'UTR) und der Promotorregion mit dem Transkriptionsstart (+1) im *upstream*-Bereich. Die Organisation von Phagengen ist entsprechend.

3.4.1 RNA-Isolierung aus *S. thermophilus* J34f-2

Als Ausgangsmaterial für die *5'RACE-PCR* wurde die Gesamt-RNA aus *S. thermophilus* J34f-2 isoliert. Die Isolierung erfolgte mit dem *RNeasy[®] Mini Kit* (Qiagen) gemäß Protokoll 5 (*Enzymatic Lysis, Proteinase K Digestion, and Mechanical Disruption of Bacteria*) im *RNAprotect[®] Bacteria Reagent Handbook*. Alle Schritte wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt, d. h. es wurde mit RNase-freien Materialien gearbeitet, Oberflächen wurden mit *ExitusPlusTM* (AppliChem) behandelt und alle Puffer wurden mit 0,1 % (w/v) Diethylpyrocarbonaten (DEPC) (AppliChem, Tab. 18) angesetzt. Eine *S. thermophilus* J34f-2-Tageskultur wurde bis zu einer OD_{620} 0,6 bei 40 °C im Wasserbad angezogen. Ein Milliliter Kultur (1 Volumen) wurde mit 2 Volumen *RNAprotect[®] Bacteria Reagent* gemischt und 10 s gevortext. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Bakterien zentrifugiert (5.000 x g, 10 min) und die Pellets bei -20 °C gelagert. Für den enzymatisch-mechanischen Aufschluss wur-

den die Bakterien in 100 μl TE-Puffer (Tab. 16) mit 0,1 mg Lysozym (Serva) und 1,5 mg Proteinase K (AppliChem) resuspendiert und 20 min inkubiert sowie alle 2 min für 10 s gevortext. Dann wurde RLT-Puffer aus dem Kit hinzugefügt und das Gemisch in ein Röhrchen mit 50 mg HCl-gewaschenen Glasperlen (\varnothing 150-600 μm) überführt, bevor es gemahlen wurde (10x für 30 s bei 4 m s^{-1} im FP120 Fastprep Cell Disrupter). Nachdem die Zellbruchstücke abzentrifugiert wurden, wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und mit 600 μl EtOH (80 %ig v/v) vermischt. Ab hier wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Die Intaktheit und Reinheit der isolierten RNA wurde auf einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel (Tab. 18) kontrolliert. Dafür wurden die Proben mit 2x *RNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific) versetzt und 10 min bei 70 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) (Ambion Inc.) bei 74 V für 90 min. Als Standard wurde die *RiboRulerTM High Range RNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Tab. 36, Anhang) verwendet.

Tab. 18. Komponenten für die RNA-Isolierung und -Analyse.

Lösung/Puffer	Komponente	Menge
Formaldehyd-Agarosegel	Agarose	1 g
	DEPC 0,1 % (w/v) in rH ₂ O	72 ml
	10x MOPS (Ambion) zum Lösen aufkochen, auf 60 °C abkühlen	10 ml
	Formaldehyd (37 %ig)	18 ml
DEPC-rH ₂ O	DEPC	1 ml
	rH ₂ O	1000 ml

3.4.2 5`RACE-PCR

Das Prinzip der 5`RACE-PCR ist in Abbildung 12 dargestellt. Es wurde das 5`/3`RACE Kit, 2nd Generation von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim verwendet und dessen Protokoll befolgt. Zunächst wurden jeweils zwei Gen-spezifische Primer (GSP) benötigt (Tab. 19). Ein Gen-spezifischer Primer (GSP1) wurde zur Synthese der cDNA aus der mRNA verwendet. Ein weiter eingerückter Primer (GSP2) wurde zusammen mit dem *Oligo d(T)-Anchor Primer* aus dem Kit eingesetzt um die 3` PolyA-cDNA in einer PCR zu vervielfältigen.

Tab. 19. Für die 5` RACE-PCR verwendete Gen-spezifische Primer (GSP).

Primer	5` → 3` Sequenz	T _M (°C)	Quelle
GSP1_P1	CACTTTTCCTTGCTATTC	49,1	diese Arbeit
GSP2_P1	GGCGAATTCATCATCATCAGTCA	55,3	diese Arbeit

GSP1_P _{ltp}	CCTGCACTCATGATTG	49,2	diese Arbeit
GSP2_P _{ltp}	GCAAGCTTCGTCTTGCTAGTCTGAG	55,3	diese Arbeit
GSP1_P _{int}	CTTGAGCATGAGTTTTAG	49,1	diese Arbeit
MZR2PstI (GSP2_P _{int})	ATACTGCAGGATATTTCCCACCCATTTGAGC	66,8	Mohamed, 2010

Im ersten Schritt wurde der gewünschte Abschnitt eines mRNA-Transkripts mit Hilfe eines GSP durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Abb. 12, 1.). Dafür wurden 2 µg RNA aus *S. thermophilus* J34f-2 und jeweils 12,5 µM der Primer 'GSP1_P1', 'GSP1_P_{ltp}' bzw. 'GSP1_P_{int}' eingesetzt. Sofort nach diesem Syntheseschritt wurde die cDNA mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgereinigt (2.). Im folgenden Schritt wurde der cDNA mit einer Terminalen Transferase ein Poly(A)₃'-Schwanz angehängt (3.) und in einer darauffolgenden PCR wurde diese cDNA als *template* eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte mit den weiter eingerückten Primern 'GSP2_P1', 'GSP2_P_{ltp}' bzw. 'MZR2PstI (GSP2_P_{int})' und dem *Oligo(dT)-Anchor Primer*. In einer zweiten PCR wurden die Produkte durch den *Anchor Primer* und die GSP2 weiter vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden aus einem Agarosegel extrahiert, aufgereinigt (3.3.2) und zur Sequenzierung geschickt (3.3.13). Zur Überprüfung einer erfolgreichen 5'RACE-PCR wurde ein im Kit integrierter Kontrollreaktionsansatz mitgeführt.

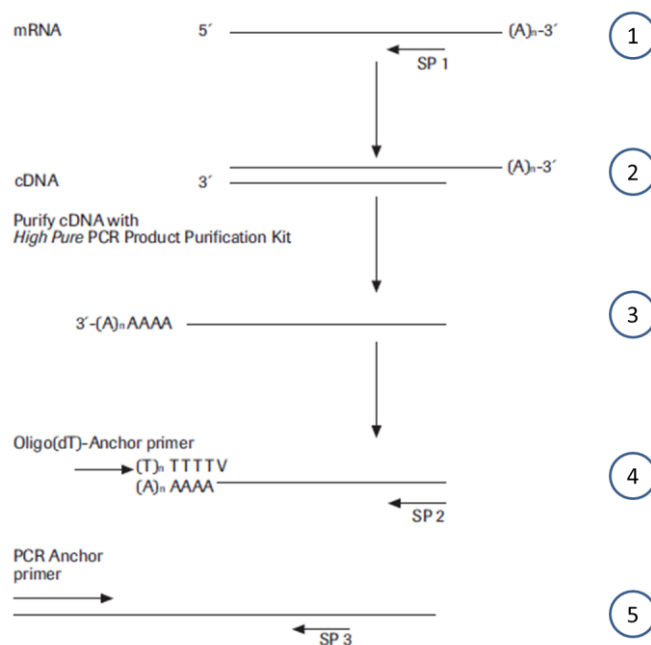


Abb. 12. Prinzip der 5'RACE-PCR (Übersicht nach Roche). 1. cDNA-Synthese aus mRNA durch Reverse Transkriptase mit GSP1, 2. Abbau der mRNA und Aufreinigung, 3. Anfügen eines Poly(A)-Schwanzes an das 3'-Ende, 4. PCR mit *Oligo(dT)-Anchor Primer* und GSP2, 5. PCR mit *Anchor Primer* und GSP2 oder GSP3. Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel extrahiert und mit GSP2 oder GSP3 zur Sequenzierung gegeben.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Plasmidkonstruktionen zur Protein-Überproduktion

Zur Gewinnung von Proteinen für funktionelle und biochemische Analysen wurden diese mit einem Protein-*tag* versehen. Die Fusionierung eines N-terminalen Glutathion-S-Transferase-(GST)-*tags* wurde durch Klonierung des gewünschten Gens in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 (GE Healthcare Life Sciences, Abb. 58, Anhang) erreicht. Die Konstrukte pGEX-6P-1-*orf3* (Abb. 59, Anhang) und pSK6 (Abb. 60, Anhang) entstammten früheren Arbeiten. Die Konstruktion der pGEX-6P-1-Derivate wird nachfolgend am Beispiel des Vektors pBSK*cro* beschrieben. Das *coh*-Gen wurde mit den Primern '*cro_BamHI_for*' und '*cro_EcoRI_rev*' unter Verwendung der *Phusion Hot Start II DNA Polymerase* aus dem *S. thermophilus* J34f-2-Genom amplifiziert (Tab. 20). Nachdem die Größe des PCR-Produkts auf einem 2%igen Agarosegel überprüft wurde, wurde es aufgereinigt, mit BamHI sowie EcoRI im Doppelverdau geschnitten und mit dem ebenfalls BamHI- und EcoRI-verdauten dephosphorylierten Vektor pGEX-6P-1 ligiert. Die Transformation erfolgte per Hitzeschock in *E. coli* DH5*α*. Nach Verifizierung des richtigen Konstrukts wurde pBSK*cro* in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die plasmidtragenden Zellen wurden durch 100 µg ml⁻¹ Ampicillin in den LB-Agar-Platten selektiert.

Zur konstitutiven, d. h. permanent gleichmäßigen Expression von Genen in grampositiven Bakterien wurde der *shuttle*-Vektor pMG36e (van de Guchte *et al.*, 1989, Abb. 61, Anhang) verwendet. Die Gene stehen hier unter der Kontrolle des starken P32-Promotors aus *L. lactis subsp. cremoris* Wg-2 (van der Vossen *et al.*, 1987). Alle Gene wurden *out-of-frame* des *orf32* gesetzt. Das *gst-crh*-Gen wurde mit den Primern '*GST-Crh_XbaI_f*' und '*GST-Crh_HindIII_r*' aus dem Plasmid pSK6 gewonnen und in die XbaI- und HindIII-Schnittstellen von pMG36e ligiert. Das *rir*-Gen mit der *downstream*-Region wurde mit '*orf3_SacI_fw*' und '*orf3_HindIII.R*' aus dem Genom von J34f-2 amplifiziert und in die SacI- und HindIII-Schnittstellen von pMG36e gesetzt. Die Klonierungen erfolgten mit den in Tabelle 20 angegebenen PCR-Parametern wie in 3.3.9 beschrieben. Die Konstrukte wurden in *L. lactis* Bu2-60 zwischenkloniert, um dann weiter in *S. thermophilus* J34 und dessen Derivate überführt zu werden.

Tab. 20. PCR-generierte DNA-*inserts* für Klonierungen zur Protein-Überproduktion.

DNA-Produkt	Basisvektor	Konstrukt	Primer ¹	T _A	T _E
<i>coh</i> -Gen aus TP-J34	pGEX-6P-1	pBSK <i>cro</i>	<i>cro_BamHI_for</i>	59 °C	20 s

			<i>cro</i> _EcoRI_rev		
<i>lexA</i> -Gen aus <i>E. coli</i> BL21(DE3)	pGEX-6P-1	pGEX <i>lexA</i>	<i>lexA</i> _BamHI_f <i>lexA</i> _HindIII_r	63 °C	40 s
<i>recA</i> -Gen aus <i>S. therm.</i> J34f-2	pGEX-6P-1	pGEX <i>recA</i>	<i>recA</i> _BamHI.2 <i>recA</i> _NotI	60 °C	65 s
<i>hdiR</i> -Gen aus <i>S. therm.</i> J34f-2	pGEX-6P-1	pGEX <i>hdiR</i>	<i>hdiR</i> _pGEX_NotI <i>hdiR</i> _BamHI_f	64 °C	40 s
<i>gst-crh</i> -Gen aus pSK6	pMG36e	pSK20	GST-Crh_XbaI_f GST-Crh_HindIII_r	57 °C	60 s
<i>rir</i> -Gen mit <i>downstream</i> -Region aus TP-J34	pMG36e	pSK10	<i>orf3</i> _SacI_fw <i>orf3</i> HindIII.R	59 °C	30 s

¹ Primersequenzen s. Tab. 11; T_A: Anlagerungstemperatur; T_E: Elongationszeit

3.5.2 Induzierte und konstitutive Genexpression

Nachdem die pGEX-6P-1-Expressionskonstrukte in den *E. coli* BL21(DE3)-Zellen etabliert wurden, wurde die Genexpression durch IPTG induziert. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin versetzt und 1%ig mit einer Übernachtskultur des jeweiligen Expressionsstammes inokuliert. Die Kultur wurde in einem Schikanekolben bei 37 °C geschüttelt (200 rpm) und bei einer OD₅₈₅ von 0,5 bis 0,8 mit 0,1 mM IPTG induziert. Vor der Induktion wurde 1 ml Kultur als t₀-Wert abgenommen, pelletiert und für weitere Analysen bei -20 °C gelagert. Das Wachstum der Zellen wurde in den 3 bis 5 h während der Induktion regelmäßig kontrolliert. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Protein-Überproduktion wurde stündlich eine der Ausgangszellzahl (t₀) entsprechende Kultur-Menge abgenommen. Die Proben wurden in 100 µl 6x SDS-Probenpuffer 10 min bei 95 °C erhitzt und mit einer SDS-PAGE (3.5.6) analysiert. Schließlich wurde die Kultur abzentrifugiert (10 min, 11.000 x g, 4 °C), der Überstand dekantiert und das Pellet bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

Die konstitutive Expression in grampositiven *S. thermophilus* erfolgte durch pMG36e-basierte Konstrukte. Hierbei wurden 10 oder 500 ml GM17- bzw. thLM17-Medium zuzüglich 5 µg ml⁻¹ Erythromycin 1%ig mit einer Übernachtskultur der Plasmid-tragenden Stämme angeimpft. Die Kulturen wurden im Wasserbad bei 40 °C inkubiert, deren OD₆₂₀ bestimmt und die Kulturen bei Bedarf mit MMC induziert und abzentrifugiert (10 min, 11.000 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

3.5.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Fusionsproteinen

Die Aufreinigung und Konzentrierung der GST-Proteine aus dem Zelllysat erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Das Pellet der induzierten Kultur wurde auf Eis aufgetaut und in 3

bis 5 ml 1x PBS (Tab. 22) pro 1 g Feuchtmasse resuspendiert. Die Resuspension wurde in gekühlte Schraubdeckelgefäße mit Glasperlen (\varnothing 0,1 mm) überführt und bis zu 10x bei 5 m s^{-1} für je 30 s in einer Zelmühle (FP120 Fastprep Cell Disrupter) gemahlen. Anschließend wurden die Zellreste und die Glasperlen abzentrifugiert (15 min bei $11.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und die Überstände in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Bevor die Zellextrakte für die Affinitätschromatographie eingesetzt wurden, wurden sie filtriert ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$). Es wurde das Protokoll *Batch/gravity flow purification* von Macherey-Nagel befolgt. Auf den Boden einer verschlossenen Polypropylensäule (Thermo Fisher Scientific) wurde ein Porus geschoben, auf den 1,333 ml der Säulenmatrix *Protino[®] Glutathione Agarose 4B* (Macherey-Nagel) gegeben wurde (Abb. 13). Diese wurde mindestens 30 min auf der geschlossenen Säule inkubiert. Dann wurde die Säule geöffnet und mit 10 ml 1x PBS (Tab. 22) äquilibriert. Im Anschluss wurde der filtrierte Zellextrakt aus ein bis zwei induzierten Kulturen (3.5.2) auf die Säule gegeben und diese geschlossen. Zur Bindung der Proteine an die Matrix wurde die verschlossene Säule 1 h bei Raumtemperatur leicht geschwenkt (40 rpm). Nachdem die Säulenmatrix durch vertikales Aufhängen wieder sedimentiert war, erfolgte das Waschen mit mindestens 30 ml 1x PBS. Die Fusionsproteine wurden mit 3 ml Elutionspuffer à 500 μl von der Säule eluiert, indem diese verschlossen und 10 min bei Raumtemperatur geschwenkt wurde. Zur Abspaltung des GST-tags (Abb. 13) wurde, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben, verfahren. Die Kontrolle der Aufreinigung erfolgte über eine SDS-PAGE (3.5.6).

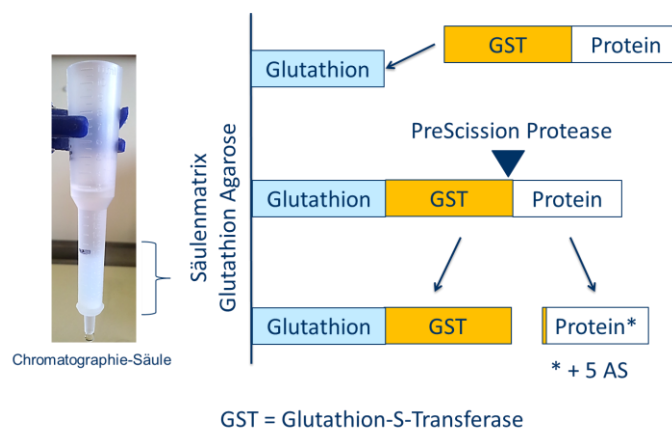


Abb. 13. Polypropylensäule zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen. Die Säule wurde mit 1,333 ml (entspricht 1 Säulenvolumen) *Protino[®] Glutathione Agarose 4B* (Macherey-Nagel) gefüllt. Die GST-Proteine binden an das Glutathion in der Säulenmatrix.

Tab. 21. Die einzelnen Schritte der Affinitätschromatographischen Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.

Schritt	Komponente	Menge
Äquilibrieren	1x PBS	10 ml
Säulenbindung	filtrierter Zellextrakt	3 – 6 ml
Waschen	1x PBS	30 ml
Eluieren	Elutionspuffer	3 ml à 500 µl

Tab. 22. Puffer für die Affinitätschromatographische Aufreinigung.

Puffer	Komponente	Menge
1x PBS (pH 7,3)	NaCl	140 mM
	KCl	2,7 mM
als 10x Puffer ansetzen	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
Elutionspuffer (pH 8,0)	Tris	50 mM
	L-Glutathion (reduziert)	10 mM

3.5.4 Abspaltung des GST-tags

Die *PreScissionTM Protease* (GE Healthcare) ist ein gentechnisch hergestelltes Fusionsprotein bestehend aus der humanen Rhinovirus Protease 3C und der Glutathion-S-Transferase (GST). Mit Hilfe des Enzyms lässt sich der GST-tag von rekombinant überproduzierten Proteinen abspalten. Die spezifische Schnittstelle liegt zwischen Gln und Gly der Erkennungssequenz Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro. Zur Gewährleistung einer optimalen Reaktionsfähigkeit wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer [50 mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT] eingesetzt. 10 µl *PreScissionTM Protease* (10 U µl⁻¹) wurden mit 1 ml des Protease-Puffers vermischt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde ein paar Mal vorsichtig invertiert, verschlossen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Folgetag wurde das vom GST-tag abgetrennte Protein mit 3 ml 1x PBS (Tab. 22) von der Säule eluiert und in 500 µl-Fractionen aufgefangen. Die Protein-Ausbeute wurde mit einem 15%igen SDS-Gel (3.5.6) überprüft.

3.5.5 Protein-Konzentrationsbestimmung und -Konzentrierung

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte äquivalent zur Messung von DNA-Konzentrationen mit dem NanoDrop 2000c (3.3.3). Mit Hilfe einer spektrophotometrischen Absorptionmessung der Protein-Lösung bei 280 nm und dem modifizierten Lambert-

Beerschen Gesetz wurde die Proteinkonzentration durch die NanoDrop-Software bestimmt. Das Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient der Proteine wurden über *ProtParam* ermittelt und in die Software vor der Messung eingetragen.

$$c \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{M_r * A_{280}}{\epsilon_{280}}$$

c: Proteinkonzentration in mol l⁻¹

M_r: relatives Molekulargewicht des Proteins in g mol⁻¹ (1 Da entspricht 1 g mol⁻¹)

A₂₈₀: Absorption bei λ=280 nm

ε₂₈₀: molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in M⁻¹cm⁻¹

Zur Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen wurden die *Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters* von Merck Millipore nach Herstellerangaben verwendet.

3.5.6 Protein-Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die größenmäßige Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde eine diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Prinzip von Laemmli (1970) verwendet. Zunächst wurde das 10 bis 15%ige Trenngel (Tab. 23) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dessen Polymerisierung wurde das 5%ige Sammelgel aufgeschichtet und ein Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer (Tab. 23) versehen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Gewinnung von Proteinen aus geringen Kulturmengen wurden diese mit 100 µl 6x SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min bei 95 °C inkubiert und kurz abzentrifugiert (11.000 x g, 2 min). Das Gel (10 cm x 9,5 cm x 0,75 mm oder 1 mm) wurde mit 10 bis 30 µl Probe pro Tasche beladen. Für die Abschätzung der molekularen Masse wurden 4 µl eines Proteinstandards (Tab. 36, Anhang) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 200 V (PS304, Biometra) für etwa 1,5 h in einer 1x SDS-Elektrophoresepuffer gefüllten Kammer (Eco-Mini, Biometra). Nachdem der SDS-Probenpuffer das Ende des Gels erreicht hatte, wurde das Gel aus der Kammer entfernt und mindestens 15 min in einer Färbelösung (*InstantBlue*, Expedon, Deutschland) geschwenkt. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert (Universal Hood II ChemiDoc XRS, Bio-Rad).

Tab. 23. Komponenten einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Puffer/Lösung/Gel	Komponente	Menge		
		10 %	12 %	15 %
Trenngel (10-15 %) (nach Carl Roth)	rH ₂ O	9,6	8,6	7,1 ml
	Rotiphorese [®] Gel 40 (29:1)	5	6	7,5 ml
	1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	5	5	5 ml
	10 % (w/v) SDS	200	200	200 µl
	10 % (w/v) APS	200	200	200 µl
	TEMED	20	20	20 µl
Sammelgel (5 %) (nach Carl Roth)	rH ₂ O	2,185 ml		
	Rotiphorese [®] Gel 40 (29:1)	375 µl		
	TRIS-HCl (1 M, pH 6,8)	380 µl		
	10 % (w/v) SDS	30 µl		
	10 % (w/v) APS	30 µl		
	TEMED	3 µl		
6x SDS-Probenpuffer	TRIS-HCl	100 mM		
	Glycerol	40 % (v/v)		
	β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)		
	SDS	3,2 % (w/v)		
	Bromphenolblau	Spatelspitze		
10x SDS-Elektrophoresepuffer auf 1x verdünnen	TRIS-HCl	250 mM		
	Glycin	1,9 M		
	SDS	0,5 % (w/v)		

3.5.7 Protein-Analyse mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Gegensatz zur denaturierenden SDS-PAGE werden die Proteine bei einer nativen (nicht-denaturierenden) PAGE in ihrer natürlich gefalteten Struktur aufgetrennt. Die physiologischen Eigenschaften der Proteine bleiben dabei erhalten.

Das native Polyacrylamid-Gel (Tab. 24) wurde, wie in 3.5.6 beschrieben, präpariert. Für eine Interaktionsanalyse wurden etwa 50 µM Crh* (* mit `GPLGS` aus *PreScissionTM Protease*-Spaltstelle, s. Abb. 64) und 30 µM GST-Rir bzw. 100 µM Biotin-markiertes Crh* (3.5.12) und 130 µM Rir* für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 6x Probenpuffer (Tab. 24) versehen und ohne Erhitzen auf das 10%ige, native Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 1,5 h bei 200 V (PS304, Biometra) in 1x nativem Elektrophoresepuffer. Anschließend wurde das Gel wie die SDS-Polyacrylamidgele gefärbt.

Tab. 24. Komponenten einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Puffer/Lösung/Gel	Komponente	Menge
Natives Trenngel (10 %)	rH ₂ O	7,5 ml
	Rotiphorese [®] Gel 40 (29:1)	1,5 ml
	1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	1 ml
	10 % (w/v) SDS	50 µl
	10 % (w/v) APS	10 µl
	TEMED	3 µl
Natives Sammelgel (5 %)	rH ₂ O	2,185 ml
	Rotiphorese [®] Gel 40 (29:1)	375 µl
	TRIS-HCl (1 M, pH 6,8)	380 µl
	10 % (w/v) SDS	30 µl
	10 % (w/v) APS	30 µl
	TEMED	3 µl
6x nativer Probenpuffer	EDTA	0,186 g
	Bromphenolblau	2,5 mg
	Glycerol (85 % (v/v))	2,5 ml
	rH ₂ O	2,5 ml
10x nativer Elektrophoresepuffer auf 1x verdünnen	TRIS-HCl	250 mM
	Glycin	1,9 M

3.5.8 Western Blot (Semidry Blot) und Immunodetektion

Mit Hilfe eines *Western Blots* können Proteine auf eine Membran transferiert und dort spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen werden. Als Primärantikörper wurde ein Antikörper gegen den GST-tag (*rabbit-anti-GST*) (Tab. 25) der überproduzierten Fusionsproteine eingesetzt. An den Sekundärantikörper *goat-anti-rabbit* und an das Streptavidin zur Bindung von Biotin war eine Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt, die die Umsetzung von BCIP/NBT katalysierte.

Für das *Blotting* der Proteine aus einem SDS-Gel oder einem nativen Gel auf eine PVDF-Membran wurde das Gel nach der Elektrophorese in *Friendly Towbin* Puffer (Tab. 25) äquilibriert und auf die in Ethanol äquilibrierte Membran in einem Sandwich aus ebenfalls in *Friendly Towbin* Puffer äquilibrierte Whatman-Paper gelegt. Das *Blotting* erfolgte bei 10 V für 40 bis 45 min (PS304, Biometra). Die PVDF-Membran wurde danach 1 h in Blockierungspuffer (Tab. 25) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der Primärantikörper wurde 1:5.000 in Blockierungspuffer verdünnt und die Membran 1 h in dieser Antikörperlösung geschwenkt. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (Tab. 25) für je 10 min entfernt. Es folgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:5.000 in Waschpuffer) für 30 min. Abschließend wurde die Membran viermal für je 20 min in 1x PBS-Tween[®]-20 gewaschen. Die Visualisierung von GST-

Proteinen und Biotin-markierten Proteinen wurde durch Zugabe einer NBT-/BCIP-Färbelösung (Tab. 25) erzielt. Sobald die Banden sichtbar wurden, wurde die Färbelösung mit rH₂O abgespült und die Membran getrocknet.

Tab. 25. Für den *Western Blot* eingesetzte Puffer und Antikörper.

Puffer/Antikörper	Komponente	Menge
<i>Friendly Towbin</i> Puffer	TRIS-HCl (pH 8,5)	25 mM
	Glycin	192 mM
	Isopropanol	5 % (v/v)
Blockierungspuffer	Magermilchpulver	5 % (w/v)
	Tween [®] -20	0,1 % (v/v)
	Lösungsmittel: 1x PBS	
Waschpuffer	Magermilchpulver	0,5 % (w/v)
	Tween [®] -20	0,1 % (v/v)
	Lösungsmittel: 1x PBS	
1x PBS-Tween [®] -20	10x PBS	10 % (v/v)
	Tween [®] -20	0,1 % (v/v)
Alkalische-Phosphatase-Puffer (APP)	TRIS-HCl (pH 9,5)	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
Färbelösung für Antikörper mit AP	NBT (Promega)	0,66 % (v/v)
	BCIP (Promega)	0,33 % (v/v)
	Lösungsmittel: APP	
Primärantikörper	<i>rabbit-anti-GST</i> (Thermo Fisher Scientific) Streptavidin-AP (Thermo Fisher Scientific)	1:5.000 in Blockierungspuffer
Sekundärantikörper	<i>goat-anti-rabbit-AP</i> (Invitrogen)	1:5.000 in Waschpuffer

3.5.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, kurz EMSA, bezeichnet ein Verfahren für den *in vitro*-Nachweis von DNA-Bindeproteinen. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass ein Protein-DNA-Komplex bei der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarose- oder Polyacrylamidgel langsamer läuft, als ungebundene DNA (Alberts *et al.*, 2002; Hellman und Fried, 2007). Folglich wird die Protein-gebundene DNA im Vergleich zur ungebundenen DNA sichtbar *geshiftet*.

Für das Crh*-Protein wurde bereits gezeigt, dass es an DO1A und DO1B bindet und bei höheren Konzentrationen ebenfalls an DNA-Abschnitte ohne Operatorsequenzen. Dabei konnten keine Protein-DNA-Komplexe durch die Ethidiumbromidfärbung detektiert werden (Koberg Diplomarbeit, 2012). Durch Verwendung des SYBR[®] *Safe DNA Gel Stain* konnten geringere DNA- und Proteinmengen eingesetzt werden und eine höhere Spezifität erreicht werden. Zur Überprüfung, ob Coh* wie Crh* eine DNA-Bindfunktion besitzt, wurden die affinitätschro-

matographisch aufgereinigten Proteine (3.5.4) mit verschiedenen, aus dem TP-J34-Lysogeniemodul amplifizierten DNA-Abschnitten (Abb. 14), zusammengegeben.

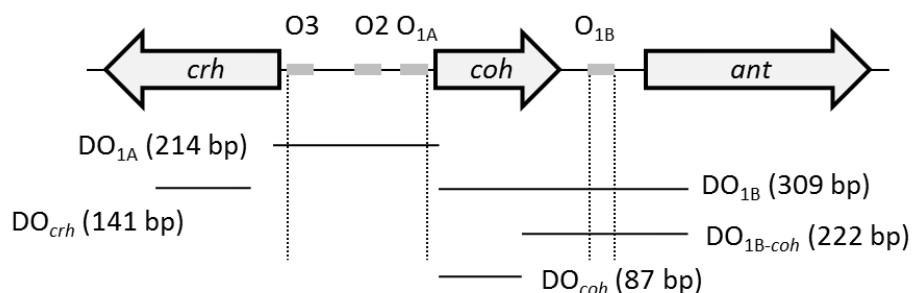


Abb. 14. Lokalisierung der EMSA-DNA-Abschnitte im Lysogeniemodul von TP-J34. Die Länge der jeweiligen Abschnitte ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

Insgesamt wurden drei verschiedene DNA-Abschnitte aus dem Genom von *S. thermophilus* J34f-2 synthetisiert (PCR-Programm Tab. 11). Der DNA-Abschnitt DO1A umfasste die gesamte intergene Region von *crh* und *coh* mit den drei postulierten Operatoren O1A, O2 und O3. Der DO1B-Abschnitt enthielt den postulierten Operator O1B und der Kontroll-DNA-Abschnitt DO_{crh} besaß keine Operatorsequenz. Zusätzlich wurde DO1B mit *RsaI* verdaut, sodass die Fragmente DO_{coh} und DO1B_{coh} gewonnen wurden. Letzteres umfasste den postulierten Operator O1B in der intergenen Region von *coh* und *ant*, während DO_{coh} einen Teil des *coh*-Gens enthielt (Abb. 14).

Die Proteine Crh* und Coh* wurden in ansteigenden Konzentrationen in 1x PBS mit 4 µl eines DNA-enthaltendes Mastermixes (Tab. 27) gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Kontroll-Ansatz enthielt nur die DNA aus dem Mastermix. Nach Ablauf der Zeit wurden die Ansätze mit 2 µl 6x Ladebuffer versetzt und über ein natives 6%iges TBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt (50 min bei 200 V, PS304, Biometra) (Tab. 26). Zur Färbung wurde SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) 1:10.000 in 0,5x TBE-Puffer verdünnt und das Polyacrylamidgel mindestens 20 min im Dunkeln darin inkubiert. Im Anschluss folgte die Detektion der DNA-Banden durch UV-Licht (Universal Hood II ChemiDoc XRS, Bio-Rad).

Tab. 26. Puffer und natives TBE-Polyacrylamidgel für den EMSA.

Puffer/Gel	Komponente	Menge
10x Bindepuffer (pH 8)	Na-HEPES	1 M
	K-Glutamat	1 M
	Mg-Aspartat	200 mM
	IGEPALCA-630	0,022 % (w/v)
	BSA	10 mg ml ⁻¹
6x Ladepuffer	Bromphenolblau	0,25 %

(Sambrook und Russell, 2001)	Xylencyanol FF	0,25 %
	Glycerol	30 %
TBE-Polyacrylamidgel (6 %)	rH ₂ O	7,5 ml
	Rotiphorese [®] Gel 40 (29:1)	1,5 ml
	10x TBE-Puffer	1,0 ml
	10 % (w/v) APS	50 µl
	TEMED	10 µl
10x TBE-Puffer (pH 8)	TRIS-HCl	1 M
	Borsäure	1 M
auf 0,5x verdünnen	EDTA	0,02 M

Das Crh*-Protein wurde in einem Ansatz mit 21 nM des DNA-Abschnitts DO1A und 32 nM DO_{crh} als interner Kontrolle inkubiert. Außerdem wurde ein EMSA mit Crh* und dem RsaI-verdauten DO1B-DNA-Abschnitt durchgeführt. Hier lagen beide Fragmente mit etwa 21 nM vor. Das Coh*-Protein wurde mit 32 nM des DO1A- und 20 nM des DO1B-DNA-Abschnitts kombiniert. Auch das Rir*-Protein wurde auf seine DNA-Bindefähigkeit getestet, nachdem eine Bindung des Proteins mit N-terminalem GST-tag bereits ausgeschlossen wurde (Faulhaber Diplomarbeit, 2012). Ebenfalls wurden die Proteine GST-Crh_{Mut} und GST-HdiR in aufsteigenden Konzentrationen mit den DNA-Abschnitten DO1A und DO1B in einem EMSA eingesetzt (Tab. 27).

Tab. 27. Pipettierschema der EMSA-Reaktionsansätze mit einem Volumen von 10 µl.

Ansatz	Kontrolle	1	2	3	4	5
Crh* (µM)	-	0,24	0,95	1,9	2,8	9,5
Coh* (µM)	-	5,7	7,7	19,1	38,3	76,5
Rir* (µM)	-	1,5	3	6	12	-
GST-Crh _{Mut} (µM)	-	10	20	-	-	-
GST-HdiR (µM)	-	20	40	80	-	-
1x PBS (µl)	6	ad 10	ad 10	ad 10	ad 10	ad 10
Mastermix (µl)	4	4	4	4	4	4

Mastermix: 1 µl 10x Bindepuffer, 0,2 – 0,3 pmol DNA, ad 4 µl rH₂O

3.5.10 Kompetitionsassay

Diese Methode dient zur Bestimmung der Spezifität einer Protein-DNA-Bindung sowie zur Analyse der Bindungsaffinität eines Proteins zu einer Bindestelle. Weiterhin können Protein-Protein-Interaktionen mit diesem Assay aufgezeigt werden. Eine konstante Menge markierter DNA wird mit einer ebenfalls konstanten Menge des Bindeproteins und ansteigenden Konzentrationen unmarkierter DNA-Kompetitoren zusammengegeben (Vainshtein *et al.*, 2002;

Hu *et al.*, 2013). Bindet das Protein an die im Überschuss vorliegende Kompetitor-DNA, bleibt die markierte DNA ungebunden.

Es wurde das Protokoll nach Steinmetzer *et al.* (2002) in modifizierter Form angewendet. Synthetische Oligonukleotide, die jeweils einen postulierten Operator umfassten, wurden als Kompetitoren eingesetzt. Vorab wurden die komplementären Oligonukleotide zur Doppelstrangbildung 1 h bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur hybridisiert und dann langsam abgekühlt. Mit einer Länge von je 21 bp enthielten sie neben der Operatorsequenz von 15 bp Länge zusätzlich jeweils drei endständige Basen (Tab. 28). Konstant 5 μ M aufgereinigtes Crh*-Protein wurden in den 10 μ l-Reaktionsansätzen mit 16 nM DO1B sowie mit je 7,5, 15, 35, 55 und 75 pmol (entspricht 47-, 94-, 219-, 344- und 469-fachen molaren Überschuss) der Kompetitoren ds-O1A, ds-O1B, ds-O2, ds-O3 und ds-O4 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über ein natives TBE-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (3.5.9). Zur besseren Vergleichbarkeit der Kompetitionassays der beiden Repressorproteine Crh* und Coh* wurde DO1B mit einer Operator-Bindestelle für Crh* eingesetzt. Von dem aufgereinigten Coh*-Protein wurden 15 μ M mit 20 nM DO1A und je 50, 100, 200, 400 und 600 pmol (entspricht 250-, 500-, 1.000-, 2.000- und 3.000-fachen molaren Überschuss) der Kompetitoren inkubiert. Der erste Kontroll-Ansatz enthielt nur die DNA aus dem Mastermix, während der zweite Kontroll-Ansatz die DNA mit der Proteinmenge, die für einen *shift* ausreichte, umfasste. Im Unterschied zum Protokoll von Steinmetzer *et al.* (2002) wurden die DNA-Abschnitte nicht radioaktiv markiert, sondern im Anschluss der Elektrophorese mit SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) angefärbt (3.5.9). Als Kontrollen wurden der Kompetitor ds-O3x, der mit ds-O3 überlappt, und ds-O4 im 5' Bereich von *coh* eingesetzt, deren Sequenzen ebenfalls einen *inverted repeat* aufwiesen (Tab. 28).

Tab. 28. Übersicht der doppelsträngigen (ds) Kompetitoren für den Kompetitionassay.

Kompetitor	Primersequenzen	Hybridisierung
ds-O1A	ACGTTGAATTTAATTCAAGTT TGCAACTTAAATTAAGTTCAA	1 h bei 48 °C
ds-O1B	AACTTGAATTTAATTCAACTT TTGAACTTAAATTAAGTTGAA	1 h bei 46 °C
ds-O2	AACTTGAAAAAAAAATCAATAA TTGAACTTTTTTTTATAGTTATT	1 h bei 44 °C
ds-O3	ATATAGTAGACTTTACTAATT TATATCATCTGAAATGATTAA	1 h bei 46 °C
ds-O3x	TACTTGAAAATTAGTAAAGTC ATGAACTTTTAAATCATTTTCAG	1 h bei 44 °C
ds-O4	TATTTGTAATAAATACAACAT ATAAACATTATTTATGTTGTA	1 h bei 44 °C

ds-O1A-O2 AACTTGAAAAAAAAATCAATAAAACTATTGACGTTGAATTTAATTCAAGTT 1 h bei 41 °C
TTGAACTTTTTTTTAGTTATTTTGATAACTGCAACTTAAATTAAGTTCAA

Zum Interaktionsnachweis von Rir* und Crh* bzw. Crh_{Mut}* wurden konstant 1,6 µM Crh* bzw. Crh_{Mut}* mit 16 nM des DO1B-DNA-Abschnitts und einem 3,75-, 7,5-, 15-, 30- und 45-fachen molaren Überschuss an Rir* kombiniert. Dabei wurden für Crh* und Rir* drei Versuchsvarianten verwendet, in denen i) alle Komponenten simultan für 20 min inkubiert wurden, ii) Crh* mit der DNA 20 min präinkubiert wurde und iii) Crh* und Rir* 20 min präinkubiert wurden. Die Ansätze wurden, wie unter 3.5.9 beschrieben, analysiert.

3.5.11 Quervernetzung von Proteinen durch Glutaraldehyd

Die chemische Quervernetzung (*crosslinking*) von Proteinen ist eine Methode zur *in vitro*-Darstellung vorübergehender (transienter) oder dauerhafter Protein-Protein-Interaktionen. Da die Mehrheit aller Interaktionen transienter Natur ist, können sie auf diese Weise fixiert und unter den denaturierenden Bedingungen einer SDS-PAGE analysiert werden. Das in dieser Arbeit eingesetzte Glutaraldehyd verknüpft die Aminogruppen (NH₂) der interagierenden Proteine kovalent miteinander (Lopez-Gallego *et al.*, 2013).

Die aufgereinigten Proteine wurden in einem Reaktionsvolumen von 15 µl zusammengegeben und vermischt. Die Quervernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 0,005 bis 0,01 % (v/v) Glutaraldehyd eingeleitet und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur durch Hinzufügen von 10 % (v/v) 1 M Tris (pH 8) gestoppt. Die Ansätze wurden über eine denaturierende SDS-PAGE (3.5.6) aufgetrennt.

3.5.12 Markierung von Proteinen mit EZ-Link[®]TFPA-PEG3-Biotin

Als eine Alternative zur Immunodetektion mit einem Antikörper wurden die Proteine Crh* und Rir* mit EZ-Link[®]TFPA-PEG3-Biotin (Thermo Fisher Scientific) markiert, welches eine nicht-spezifische, Licht-aktivierte Markierung von Proteinen ermöglicht. Die markierten Proteine bleiben überwiegend reaktiv, da die Biotin-Gruppe relativ klein ist. Durch das hydrophile Polyethylenglycol (PEG) bleiben die markierten Proteine zudem wasserlöslich. Ein weiterer Vorteil resultiert aus der starken Bindung von Biotin an Streptavidin.

Zunächst wurde die benötigte Biotinmenge mit Hilfe der Formel aus dem Protokoll des Herstellers (Thermo Fisher Scientific) berechnet. 200 bis 300 µl Crh* bzw. Rir* wurden mit EZ-

Link[®]-TFPA-PEG3-Biotin (10 mg ml⁻¹ in DMSO) so vermischt, dass etwa ein 20facher molarer Überschuss an Biotin (MW = 664 g mol⁻¹) erreicht wurde. Nach einer Inkubation von 2 min wurden die Ansätze in einer offenen Petrischale auf Eis einer UV-Strahlung ($\lambda = 366$ nm) ausgesetzt. Die Bestrahlung erfolgte für 10 min bei einem Abstand von 5 cm zur Lampe. Anschließend wurden die Ansätze 4 h gegen 1x PBS mikrodialysiert (0,45 μ m). Der gesamte Versuch wurde in einer Dunkelkammer unter Rotlicht durchgeführt. Die markierten Proteine wurden bei -80°C gelagert. Sie konnten auf einem *Western Blot* durch Streptavidin konjugiert mit einer Alkalischen Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) (Tab. 25) detektiert werden. Diese Immunodetektion erfolgte wie bereits für den GST-Antikörper beschrieben (3.5.8).

3.5.13 RecA-Aktivierung und katalytische Reaktionen

Die Rekombinase RecA aus *E. coli* ER2502 (2 mg ml⁻¹) wurde von der New England Biolabs GmbH bezogen. Das multifunktionelle Protein dient als Regulator der SOS-Antwort und wird in Gegenwart beschädigter ssDNA und in Abhängigkeit von ATP aktiviert (Abb. 15). In Form eines RecA-Nukleofilaments agiert RecA als Co-Protease für die Autoproteolyse verschiedener Proteine, wie dem LexA-Repressor und dem CI-Repressor aus λ . In einem Versuch sollte die autoproteolytische Aktivität von RecA auf den Repressor Crh untersucht werden.

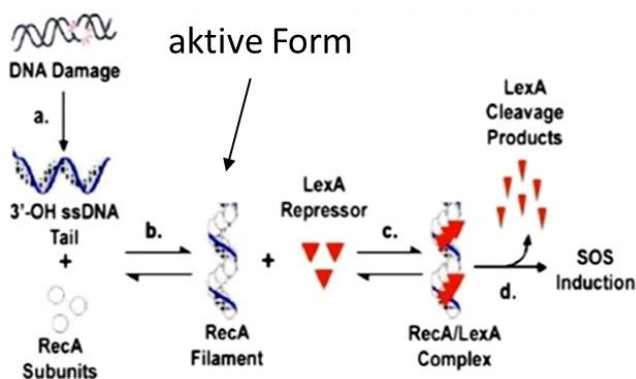


Abb. 15. Aktivierung von RecA in Gegenwart beschädigter (einzelsträngiger) DNA (Bianco *et al.*, 1998).

Zur RecA-Aktivierung wurde das Protokoll nach Giese *et al.* (2008) mit wenigen Modifikationen angewendet. Es wurden 10 μ M RecA aus *E. coli* (NEB) bzw. GST-RecA aus *S. thermophilus* J34f-2 mit 1 mM ATP- γ -S (Sigma-Aldrich) und 40 μ M Oligonukleotid (20 bis 25 nt) in 1x RecA-Puffer (NEB) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Aktivierung wurden daraus je 2 μ M RecA/GST-RecA mit aufgereinigtem GST-LexA bzw. GST-HdiR zusammengegeben und 20 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde eine äquivalente Menge der aktivierten Proteine allein sowie in Kombination mit GST-Rir und Rir* zu GST-

Crh und Crh* gegeben und inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze über eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt (3.5.6).

3.5.14 Analyse einer Autoproteolyse induziert durch alkalischen pH-Wert

Der LexA-Repressor aus *E. coli* und Phagen-Repressoren, die einer RecA-induzierten Autoproteolyse unterliegen, zeigen auch bei alkalischen pH-Werten ab etwa 10,3 eine Autoproteolyse (Little, 1984).

Für die *in vitro*-Untersuchung einer pH-abhängigen Autoproteolyse des Repressors Crh wurden etwa 3 μM GST-Crh (in Elutionspuffer mit pH 8) im Verhältnis 1:1 in 1x PBS mit den pH-Werten 4,6, 7,6 und 10,6 gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze über eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt (3.5.6) und mittels GST-Antikörpers auf einem *Western Blot* visualisiert (3.5.8). Als Kontrollen für eine stattfindende Autoproteolyse wurden 10 μM GST-LexA und einer nicht-stattfindenden Autoproteolyse 10 μM GST-RecA mitgeführt.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse zur Charakterisierung der *cis*- und *trans*-regulatorischen Elemente im Lysogeniemodul des Phagen TP-J34 sind im nachfolgenden Kapitel zusammengefasst. Der überwiegende Teil der Ergebnisse der Abschnitte 4.1 bis 4.5 wurde veröffentlicht (Koberg *et al.*, 2015).

4.1. Nachweis von Promotoren im Lysogeniemodul von TP-J34

Zur Bestätigung der postulierten Promotoren P₁, P_{*ltp*} und P_{*int*} im Lysogeniemodul von TP-J34 wurden die Transkriptionsstartpunkte der entsprechenden mRNA-Transkripte mit Hilfe einer *5'RACE-PCR* ermittelt. Zu den vermeintlichen Transkripten zählten das polycistronische *crh-rir-ltp*-Transkript sowie das monocistronische Transkript des *ltp*-Gens und ein Transkript, das *int* umfasst. Die Transkripte wurden in einer vorherigen Arbeit mittels *Northern Blot* und RT-PCR detektiert (Mohamed, 2010). Durch Verwendung des *RNeasy Mini Kit* von QIAGEN wurde die Gesamt-RNA aus *S. thermophilus* J34f-2 isoliert. Da RNA aufgrund ubiquitär vorkommender RNasen sehr instabil ist, wurde zunächst die Integrität der RNA auf einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel überprüft. Ribosomale RNA (rRNA) setzt sich aus der 23S, 16S und 5S rRNA zusammen, von denen die 23S und die 16S rRNA gut auf dem Gel erkennbar waren (Abb. 16). Die 5S rRNA-Bande war kaum zu sehen. Die Banden waren scharf und eine Verunreinigung des Ansatzes mit genomischer DNA konnte ausgeschlossen werden.

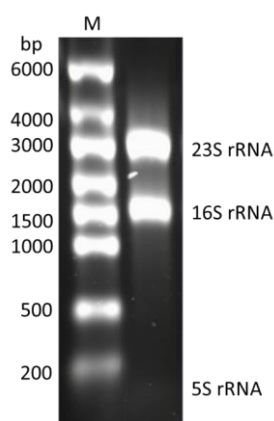


Abb. 16. Intakte Gesamt-RNA aus *S. thermophilus* J34f-2 aufgetrennt durch ein Formaldehyd-Agarosegel (1 %). Die obere Bande zeigt die 23S rRNA, die mittlere die 16S rRNA und die untere die 5S rRNA. M: *RiboRulerTM High Range RNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Im Zuge der 5`*RACE-PCR* wurden zwei PCRs hintereinander durchgeführt, damit ausreichend Produkt für eine Sequenzierung gewonnen werden konnte. Das PCR-Produkt zur Ermittlung des 5`-Endes des *crh-rir-ltp*-Transkripts (nachfolgend als P1-Fragment bezeichnet) konnte ausreichend amplifiziert werden. Es wurde aus dem Agarosegel extrahiert und zeigte nach Auftrennung durch ein 2%iges Agarosegel eine Größe von etwa 380 bp (Abb. 17, A). Die Gewinnung der beiden DNA-Abschnitte P_{ltp} und P_{int} erwies sich als problematisch, da in der ersten PCR nicht genügend Produkt generiert wurde. Erst nach der zweiten PCR konnte eine Extraktion der PCR-Produkte erfolgen. Die extrahierten Produkte liefen bei etwa 200 bp (P_{ltp} -Fragment) und 80 bp (P_{int} -Fragment) (Abb. 17, B, C). Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte mit den jeweiligen GSP2 (Tab. 21).

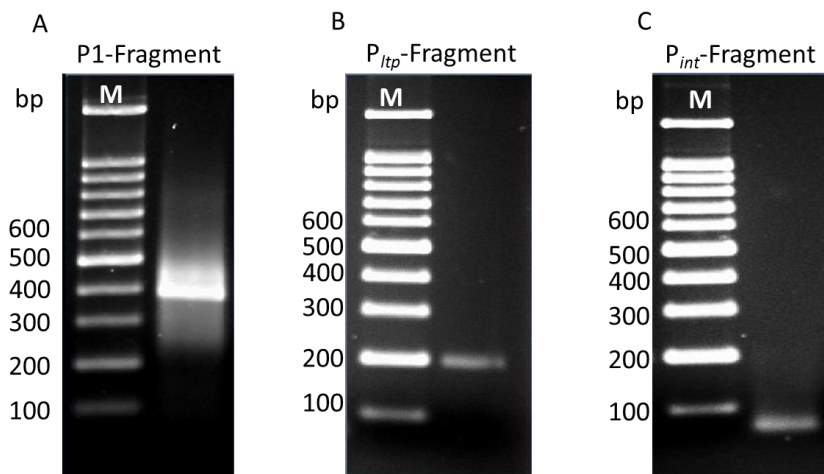


Abb. 17. Produkte der 5`*RACE-PCR* aufgetrennt durch 2%ige Agarosegele. Bei den DNA-Fragmenten P1, P_{ltp} und P_{int} handelte es sich um Extraktionen aus einem Agarosegel. Die Größe des P1-Fragments entsprach etwa 380 bp (A) und die des P_{ltp} -Fragments etwa 200 bp (B). Das P_{int} -Fragment lief im Agarosegel unter 100 bp (C). M: *DNA Ladder 100 bp plus* (AppliChem).

Die Sequenzierungsergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Nachdem die 16 Adenin-Basen (16 x A) des *Oligo d(T)-Anchor Primers* lokalisiert wurden, konnte der Transkriptionsstartpunkt (+1) als die zweite Base *downstream* identifiziert werden. Das *int*-Transkript startete demnach mit einem Thymin (Abb. 18, A) und das *ltp*-Transkript mit einem Guanin (Abb. 18, B). Der Transkriptionsstartpunkt des *crh-rir-ltp*-Transkripts wurde auf ein Thymin festgelegt (Abb. 18, C).

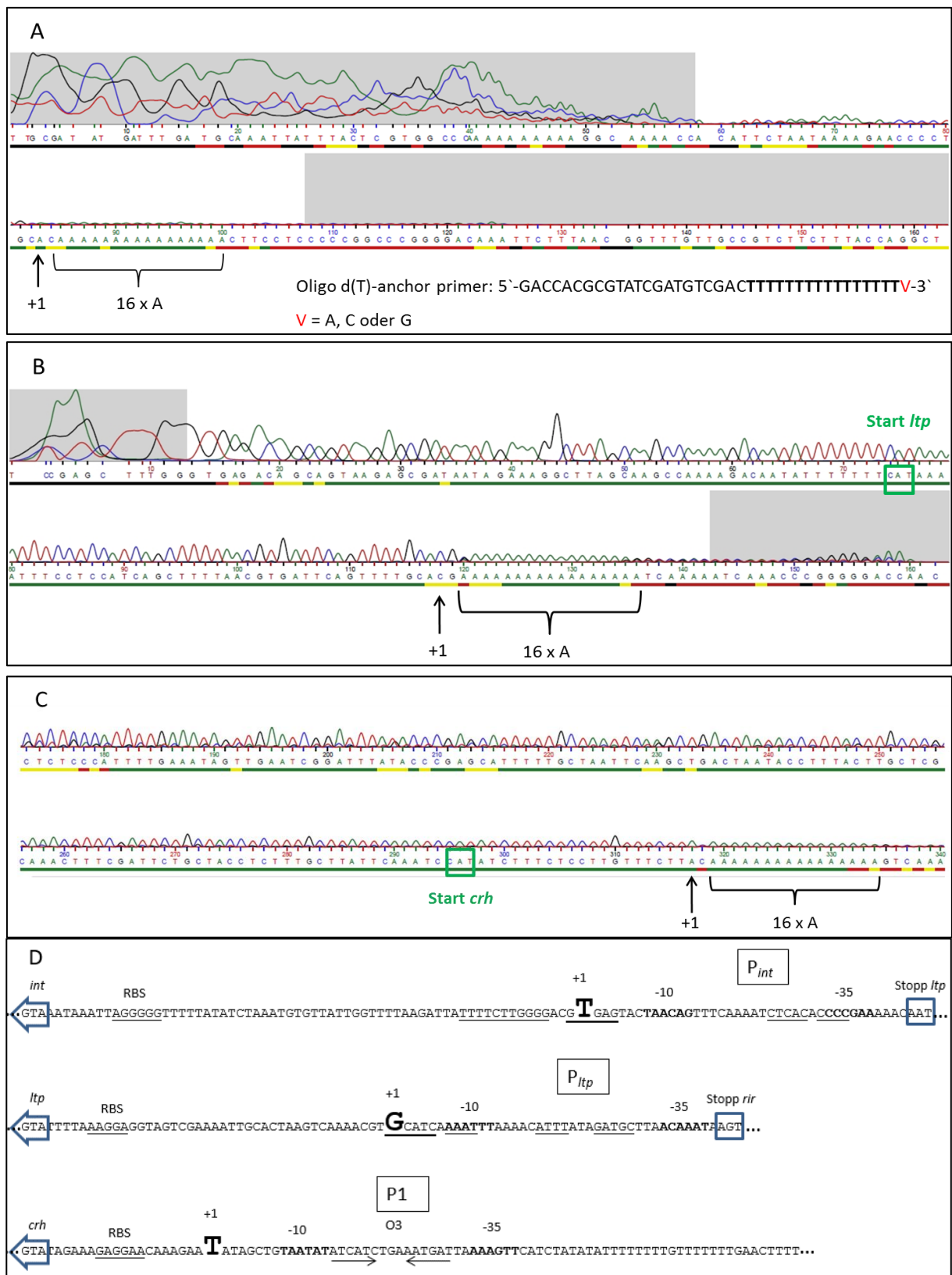


Abb. 18. Sequenzierungschromatogramme der 5' RACE-PCR-Produkte zur Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte in 3' → 5'-Richtung. Sequenz des P_{int} -Fragments mit dem *upstream*-Bereich des *int*-Gens (A). Sequenz des P_{ltp} -Fragments mit der 5'UTR des *ltp*-Gens (B). Sequenz des $P1$ -Fragments mit dem *upstream*-Bereich des *crh*-Gens (C). Gezeigt sind die 16 Adenin-Basen des Oligo d(T)-Anchor Primers sowie die davon ausgehend lokalisierten Transkriptionsstartpunkte (+1). Die Sequenz des Oligo d(T)-Anchor Primers ist in Bild A dargestellt. Lokalisierte Transkriptionsstartpunkte der Promotoren P_{int} , P_{ltp} und $P1$ im *upstream*-Bereich der Gene *int*, *ltp* und *crh* in 5' → 3'-Richtung (D). Gezeigt sind die Transkriptionsstartpunkte (+1), sowie die davon ausgehend ermittelten -10- und -35-Regionen der Promotoren. Die Ribosomenbindestellen (RBS) und potenziellen Terminationssequenzen (Mohamed, 2010) sind unterstrichen.

4.2 Gewinnung von aktiven Proteinen für biochemische Analysen

Die Gewinnung von TP-J34-, *E. coli* und *S. thermophilus* J34f-2-Proteinen zur funktionellen und biochemischen Analyse erfolgte durch eine induzierte Überproduktion rekombinanter Proteine in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen und eine anschließende Aufreinigung der Proteine aus dem Zellextrakt mit Hilfe einer Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. Die Aufreinigung der Proteine Crh* und Rir* (ehemals ORF3*) wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich durchgeführt (Koberg Diplomarbeit, 2012; Faulhaber Diplomarbeit, 2012).

Eine Mutante des Crh-Proteins wurde mit Hilfe einer LDA und dem mutagenen Primer 'FDGKPL' durch Einfügen von drei Punktmutationen in das *crh*-Gen in pSK6 gewonnen (3.3.7). Das gewonnene Plasmid mit 5.327 bp wurde als pSK6LDA bezeichnet (Abb. 19).

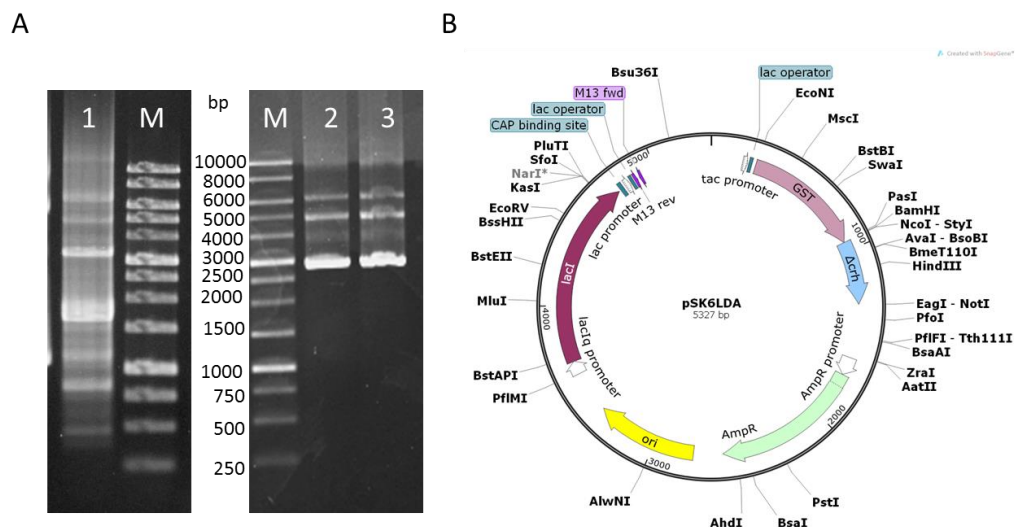


Abb. 19. Erzeugung von Punktmutationen im *crh*-Gen des Plasmids pSK6 durch eine LDA. Das Produkt der LDA (A1) zeigte auf einem Agarosegel (0,8 %) das für eine LDA typische Bandenmuster und das gewonnene Plasmid pSK6LDA (A2), dessen Plasmidkarte in B gezeigt ist, wies nach Auftrennung im Agarosegel die gleiche Größe auf wie das Ausgangsplasmid pSK6 (A3). M: DNA Ladder 1 kb (AppliChem).

Für die Konstruktion eines Vektors zur *coh*-Überexpression wurde das entsprechende Gen mit Hilfe der Primer '*cro*_BamHI_for' und '*cro*_EcoRI_rev' aus dem Genom von *S. thermophilus* J34f-2 amplifiziert (Tab. 20). Aus der PCR resultierte ein DNA-Abschnitt mit einer BamHI-Restriktionsstelle am 5'-Ende und einer EcoRI-Restriktionsstelle am 3'-Ende sowie einer Länge von 222 bp (Abb. 20, A). Das PCR-Produkt wurde in die BamHI-/EcoRI-Schnittstelle des pGEX-6P-1-Vektors eingefügt und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Das aus den Transformanten gewonnene Konstrukt wurde durch eine Sequenzierung mit den Klonierungsprimern als pBSK*cro* mit einer Größe von 5.185 bp verifiziert (Abb. 20, B).

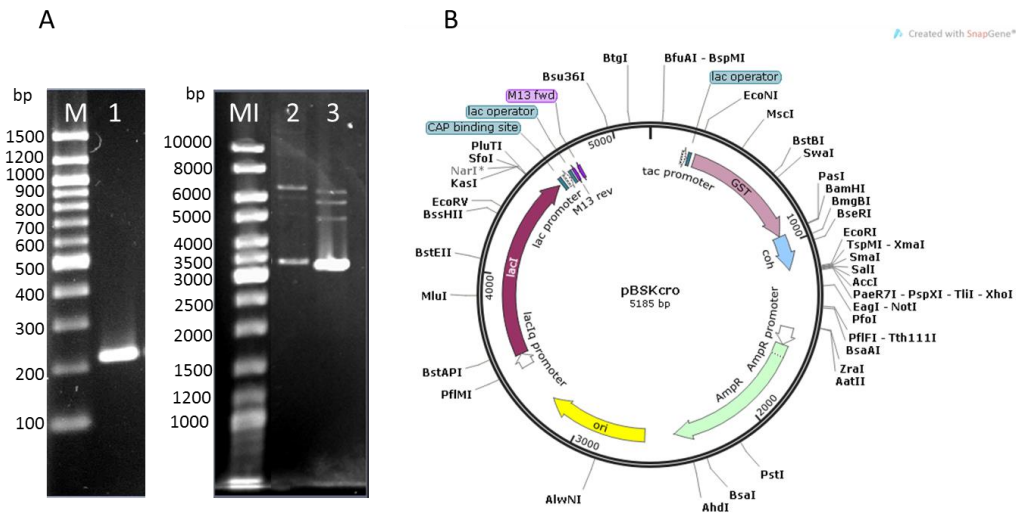


Abb. 20. Klonierungsstrategie zur Konstruktion von pBSKcro. Das *coh*-PCR-Produkt (222 bp) wurde aus dem Prophagenom in *S. thermophilus* J34f-2 generiert und über eine 2%ige Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (A1). Das verdauete PCR-Produkt wurde in die BamHI- und EcoRI-Schnittstellen von pGEX-6P-1 (A3) ligiert, wodurch pBSKcro mit einem langsameren Laufverhalten im Agarosegel entstand (A2). Die Plasmidkarte von pBSKcro (5.185 bp) ist in B dargestellt. M: 100 bp DNA Ladder (NEB); MI: GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

Das *recA*-Gen aus dem Genom von *S. thermophilus* J34f-2 wurde mit Hilfe der Primer 'recA_BamHI.2' und 'recA_NotI', die anhand des *recA*-Gens aus *S. thermophilus* LMD-9 *designed* worden, gewonnen (Tab. 20). Das 1.173 bp große PCR-Produkt (Abb. 21, A) wurde in die BamHI- und NotI-Schnittstelle von pGEX-6P-1 ligiert und es wurde pGEXrecA gebildet (Abb. 21, B).

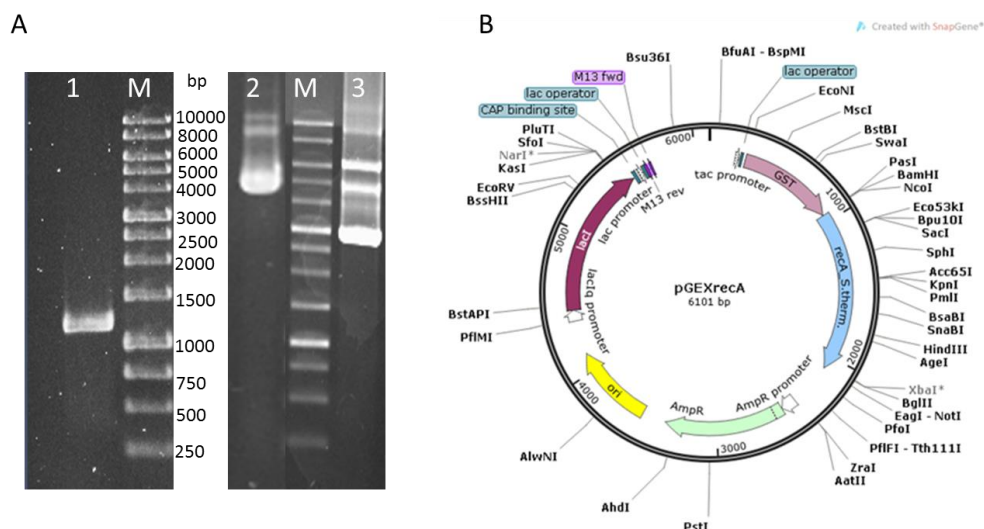


Abb. 21. Konstruktion von pGEXrecA. Die Größe von 1.173 bp wurde für das *recA*-Gen aus *S. thermophilus* J34f-2 durch Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel bestätigt (A1). Es wurde mit den BamHI- und NotI-Schnittstellen von pGEX-6P-1 ligiert. Das resultierende pGEXrecA (A2) lief im Agarosegel deutlich langsamer, als das Leerplasmid pGEX-6P-1 (A3). Die Plasmidkarte von pGEXrecA (6.101 bp) ist in B dargestellt. M: DNA Ladder 1 kb (AppliChem).

Zur Konstruktion von pGEX*lexA* (5.767 bp) wurde das 627 bp große PCR-Produkt (Abb. 22, A) durch die Primer '*lexA_BamHI_f*' und '*lexA_HindIII_r*' aus dem Genom von *E. coli* BL21 (DE3) amplifiziert und in die BamHI- und HindIII-Schnittstellen von pSK6 ligiert (Abb. 22).

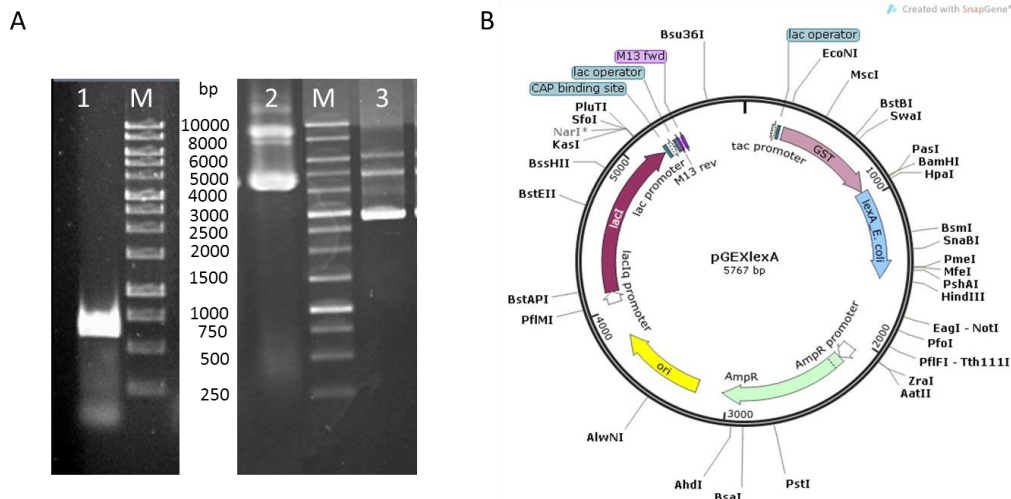


Abb. 22. Konstruktion von pGEX*lexA*. Das *lexA*-Gen zeigte auf einem Agarosegel die richtige Größe von 627 bp (A1) und wurde mit den BamHI- und HindIII-Schnittstellen von pSK6 ligiert. Das entstandene pGEX*lexA* (A2), dessen Plasmidkarte (5.767 bp) in B gezeigt ist, wies ein langsames Laufverhalten als pGEX-6P-1 (A3) im Agarosegel auf. M: DNA Ladder 1 kb (AppliChem).

Das *hdiR*-Gen aus *S. thermophilus* J343f-2 wurde mit Hilfe der Primer '*hdiR_BamHI_f*' und '*hdiR_pGEX_NotI*' (Tab. 20), die anhand des *hdiR*-Gens von *S. thermophilus* LMD-9 gewählt wurden, amplifiziert. Das PCR-Produkt mit einer Größe von 692 bp (Abb. 23, A) wurde in die BamHI- und NotI-Schnittstellen von pGEX-6P-1 gesetzt, sodass pGEX*hdir* mit 5.651 bp entstand (Abb. 23, B).

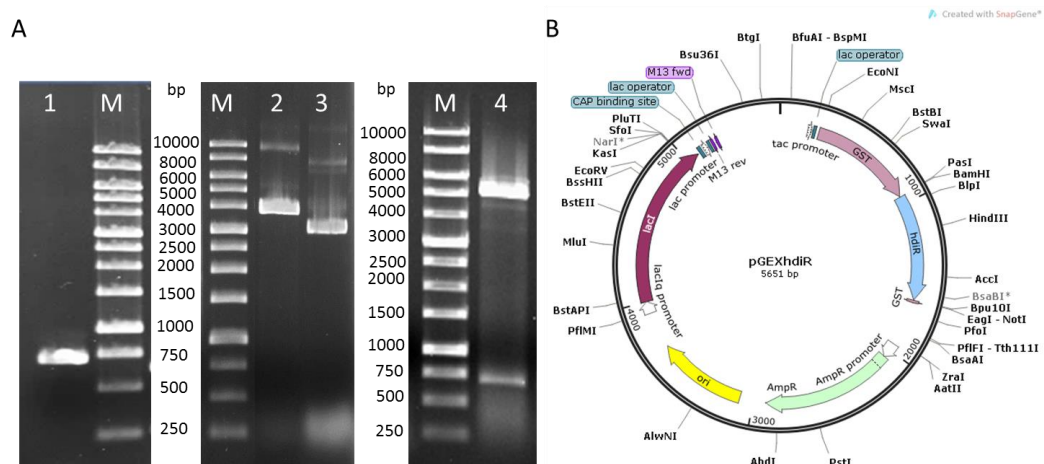


Abb. 23. Konstruktion von pGEX*hdir*. Die Größe von 692 bp wurde für das *hdiR*-PCR-Produkt durch Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel bestätigt (A1). Nach BamHI- und NotI-Verdau wurde es mit den entsprechenden Schnittstellen von pGEX-6P-1 ligiert. Das entstandene pGEX*hdir* (A2), dessen Plasmidkarte (5.651 bp) in B gezeigt ist, wies ein langsames Laufverhalten als pGEX-6P-1 (A3) auf. Der Verdau von pGEX*hdir* mit BamHI und NotI schnitt ein dem *hdiR*-PCR-Produkt entsprechendes Stück heraus (A4). M: DNA Ladder 1 kb (AppliChem).

Nach Etablierung der Expressionskonstrukte in *E. coli* BL21(DE3) wurden 500 ml dieser Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert und bis zu 5 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Vor der Induktion wurde 1 ml Kultur und nach je einer Stunde eine entsprechende Zellmenge gemessen an der OD₅₈₅ abgenommen. Die Analyse der Zellproben mit einer 12%igen SDS-PAGE zeigte, dass die Überproduktion der Fusionsproteine in *E. coli* erfolgreich war. Die Protein-Überproduktion war anhand einer Bande in den Zellextrakten induzierter *E. coli*-Zellen zu erkennen, die in den Extrakten vor der Induktion nicht oder in sehr geringer Konzentration auftauchte (Abb. 24, Stern). Die Menge der produzierten Proteine GST-Crh (A), GST-Rir (B) und GST-Coh (C) blieb in den 1 bis 3 h nach der Induktion ungefähr konstant. Zur Überprüfung einer Überproduktion der rekombinanten Proteine GST-RecA (D), GST-LexA (E), GST-HdiR (F) und GST-Crh_{Mut} (G) wurden nur die Zellextrakte 1 h nach der Induktion analysiert. Die Proteinbanden besaßen die Größe der jeweiligen Proteine zuzüglich des GST-tags mit 26 kDa.

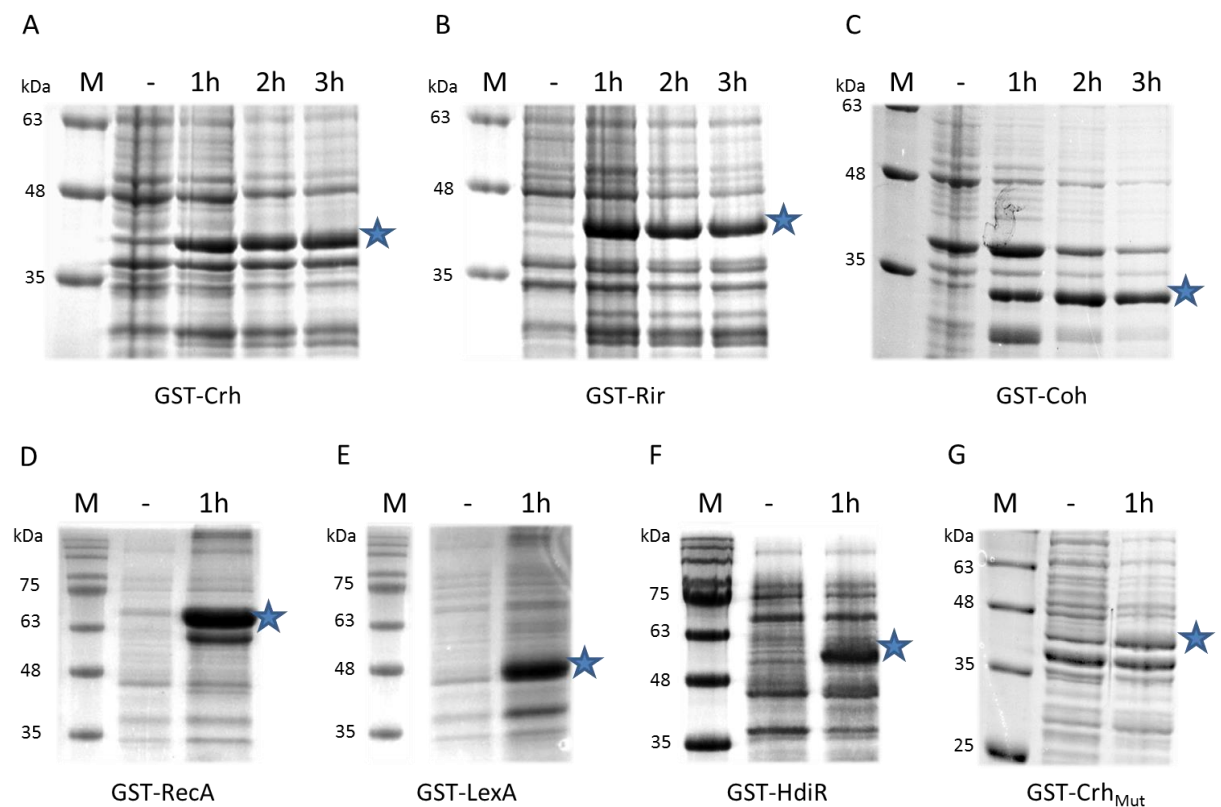


Abb. 24. Überproduzierte Fusionsproteine GST-Crh (A), GST-Rir (B), GST-Coh (C), GST-RecA (D), GST-LexA (E), GST-HdiR (F) und GST-Crh_{Mut} (G) in *E. coli* BL21(DE3)-Zellextrakten aufgetrennt durch eine 12%ige SDS-PAGE. Die Zellextrakte der für 1 bis 3 h mit 0,1 mM IPTG induzierten *E. coli* wiesen das überproduzierte Fusionsprotein (Stern) auf, das in den Extrakten der nicht-induzierten Zellen (-) nur schwach auftauchte. M: Protein Marker VI (AppliChem).

Die Aufreinigung der überproduzierten Fusionsproteine aus den *E. coli*-Zellextrakten erfolgte durch eine Säulenaффinitätschromatographie. Die Fusionsproteine blieben beim Durchlaufen der Säule an der Matrix gebunden, erkennbar durch Vergleich der Spuren mit Lysat (L) und Durchlauf (D) am Beispiel von GST-Crh (Abb. 25). Je nach Bedarf wurden die GST-Proteine von der Säule eluiert (Abb. 26) oder der GST-tag von den Proteinen abgespalten (Abb. 25 und 27).

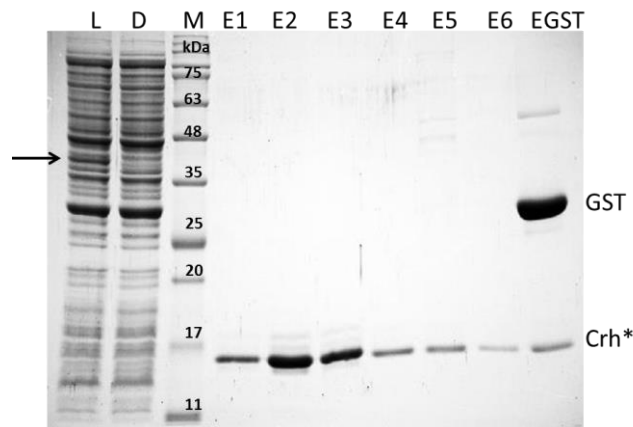


Abb. 25. Aufreinigungsschritte des Crh*-Proteins analysiert über eine 15%ige SDS-PAGE. Der Zellextrakt (Lysat = L) enthielt das Fusionsprotein GST-Crh (Pfeil), das im Durchlauf (D) infolge der Bindung an die Säule verschwand. Nach einer Übernacht-Inkubation mit der *PreScissionTM* Protease wurde Crh* mit 1x PBS eluiert und in 6 Fraktionen à 500 µl aufgefangen, von denen je 10 µl aufgetragen wurden (E1 bis E6). Im letzten Schritt wurde die vom Protein abgespaltene GST (26 kDa) mit Elutionspuffer von der Säule gewaschen (EGST). M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

GST-Crh wies nach Aufreinigung aus dem Zellextrakt eine Größe von rund 40 kDa (Abb. 26, A), GST-Rir eine Größe von 41 kDa (B), GST-RecA eine Größe von rund 65 kDa (C), GST-LexA eine Größe von 43 kDa (D), GST-HdiR eine Größe von 53 kDa (E) und GST-Crh_{Mut} eine Größe von 40 kDa (F) auf. GST-Coh wurde direkt vom GST-tag abgespalten und besaß im induzierten Zellextrakt eine Größe von etwa 34 kDa (Abb. 24, C). Die Laufhöhe der Proteine in der SDS-PAGE stimmten etwa mit der theoretischen Größen der Proteine, die mit Hilfe von *ProtParam (ExPASy)* (Tab. 29) bestimmt wurden, überein. Nur GST-LexA zeigte eine deutliche Abweichung zur berechneten Größe. In den Eluatens der Fusionsproteine waren zum Teil mehrere, niedermolekular laufende Proteinbanden zu erkennen. Besonders bei GST-Rir und GST-LexA traten diese auf, während bei GST-Crh und GST-Crh_{Mut} nur eine Bande unmittelbar kleiner dem Fusionsprotein und bei GST-RecA drei bis vier Banden auftauchten (Abb. 26), die zum Teil auch durch den GST-Antikörper detektiert wurden (Abb. 65, Anhang).

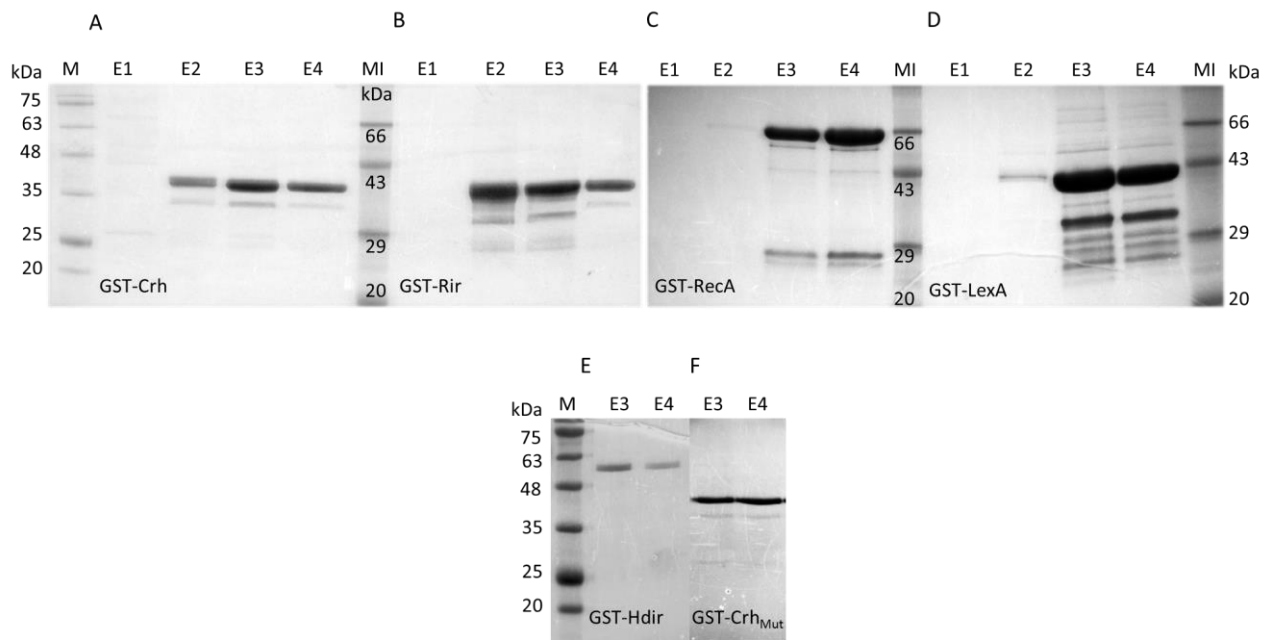


Abb. 26. Eluate 1 bis 4 (E1-E4) der rekombinanten Proteine GST-Crh (A), GST-Rir (B), GST-RecA (C), GST-LexA (D), GST-Hdir (E) und GST-Crh_{Mut} (F) aufgetrennt über eine 12%ige SDS-PAGE. Die Proteine wurden nach dem Waschen der Säule mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Eluate wurden à 500 µl aufgefangen und jeweils 10 µl auf das Gel aufgetragen. M: Protein Marker VI (AppliChem); MI: Roti[®]-Mark Standard (Carl Roth).

Durch Abspaltung des GST-tags gewonnene Proteine wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet, da sie am N-terminalen Ende fünf Aminosäuren ('GPLGS') aus der Spaltstelle der *PreScission*TM Protease trugen (Aminosäuresequenzen s. Abb. 64, Anhang). Bedingt durch die zusätzlichen Aminosäuren stieg die Größe der Proteine um etwa 0,4 kDa. Das Crh*-Protein ordnete sich im Gel bei etwa 15 kDa ein (Abb. 27, A), das Rir*-Protein bei etwa 13 kDa (B) und das Coh*-Protein bei etwa 8 kDa (C). Crh_{Mut}* wies die gleiche Laufhöhe wie Crh* auf (D), das wiederum ein höheres Laufverhalten als Rir* zeigte, während GST-Crh auf etwa gleicher Höhe wie GST-Rir lief (Abb. 26). In den Eluaten von Rir* wurden mehrere niedermolekulare Proteine detektiert (Abb. 27, B). Die aufgereinigten Proteine wurden für verschiedene *in vitro*-Versuche eingesetzt. Da der GST-tag weder die Aktivität von RecA aus *S. thermophilus* J34f-2 noch die Spaltung von LexA und Hdir beeinflusste, wurde er nicht abgespalten.

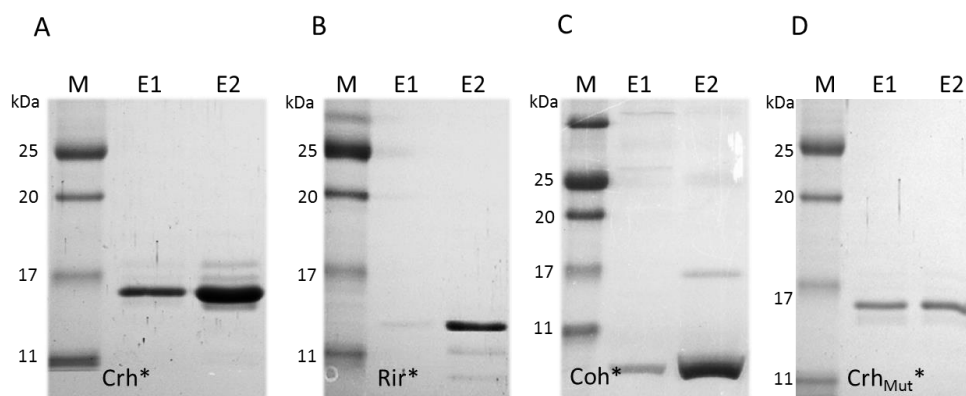


Abb. 27. Eluate 1 und 2 (E1 und E2) der Proteine Crh* (A), Rir* (B), Coh* (C) und Crh_{Mut}* (D) nach Entfernung des GST-tags durch die *PreScissionTM* Protease aufgetrennt durch eine 15%ige SDS-PAGE. In dem Eluat E2 von Rir* sind zwei niedermolekulare Produkte zu erkennen. Es wurden jeweils 10 µl der 500 µl-Fractionen aufgetragen. M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

4.3 Bioinformatische Analyse der aufgereinigten Proteine

Die in der folgenden Tabelle 29 aufgeführten physikalischen und chemischen Parameter der aufgereinigten Proteine wurden mit Hilfe des Programms *ProtParam (ExpASy)* (Wilkins *et al.*, 1999) ermittelt.

Tab. 29. Physikalische und chemische Parameter der aufgereinigten Proteine (*ProtParam*).

Protein	Molekulargewicht (kDa)	Aminosäuren	isoelektrischer Punkt (pI)
Crh*	13,7	121	5,15
Crh _{Mut} *	13,7	121	5,48
GST-Crh	40,1	352	5,55
GST-Crh _{Mut}	40,1	352	5,67
Coh*	8,0	72	8,90
Rir*	15,2	122	5,22
GST-Rir	41,6	353	5,48
GST-RecA	68,3	615	5,21
GST-LexA	49,2	433	5,95
GST-HdiR	53,2	460	5,04

Das mittels LDA (3.3.7.) erzeugte Plasmid pSK6LDA trug drei Punktmutationen im *crh*-Gen (T283G, G289C, C295G), die zu einer Transversion von 'FDGKPL' zu 'VDRKAL' in der Aminosäuresequenz von Crh_{Mut} führten (Abb. 28, A). Auf die Sekundärstruktur hatten die Mutationen keinen Einfluss (Abb. 28, B).

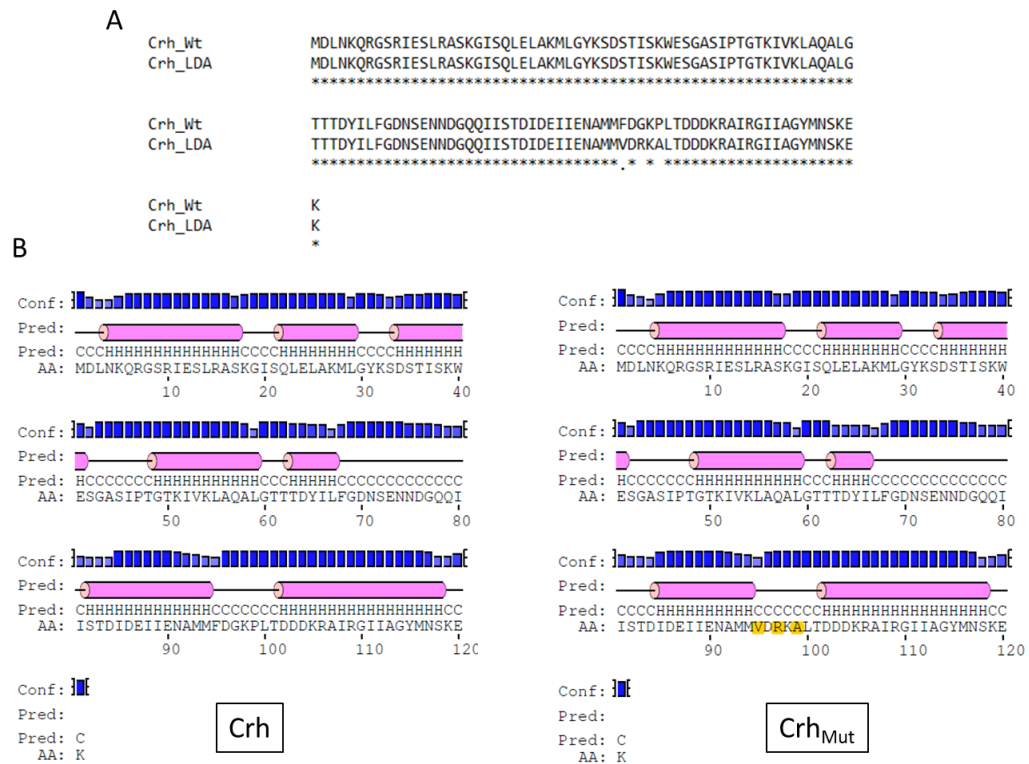


Abb. 28. Aminosäuresequenzen-Alignment (*Clustal Omega*) (A) und postulierte Sekundärstrukturen der Proteine Crh und Crh_{Mut} (*PSIPRED*) (B). Die drei Punktmutationen in Crh_{Mut} sind gelb markiert.

Die bis *dato* unbekanntenen Sequenzen des RecA-homologen Gens und des *hdiR*-Gens aus *S. thermophilus* J34f-2 konnten durch Sequenzierung der Plasmidinserts in pGEX*recA* (Abb. 21) und pGEX*hdiR* (Abb. 23) bestimmt werden. Das *recA*-Gen aus *S. thermophilus* J34f-2 glich in seiner Nukleotidabfolge zu 100 % dem *recA*-Gen aus *S. thermophilus* LMG 18311 und zu 99 % denen aus den Stämmen CS8, S9, ND03. Das Protein besaß die gleiche Aminosäureabfolge wie die RecA-Proteine aus *S. thermophilus* LMG 18311, ND03 und MN-ZLW-002. *HdiR* entsprach in seiner Nukleotidabfolge zu 99 % (1-2 Basen Abweichung) den Genen aus anderen *S. thermophilus* Stämmen (beides Abb. 63 im Anhang). Das HdiR-Protein wies die gleiche Aminosäuresequenz wie die Proteine aus den *S. thermophilus* Stämmen CS8, S9, CNRZ1066 und LMG18311 auf.

4.4 Lokalisierung von Repressorbindestellen im Lysogeniemodul von TP-J34

Die Proteine Crh*, Coh* und Rir* wurden auf ihre DNA-Bindefunktion mit Hilfe von EMSA und Kompetitionsassays untersucht. Für die Versuche wurden die aufgereinigten Proteine mit verschiedenen DNA-Abschnitten aus dem Lysogeniemodul kombiniert. Bevor die PCR-Produkte DO1A, DO1B, DO_{crh}, DO1B_{coh} und DO_{coh} für einen EMSA eingesetzt wurden, wurde ihre richtige Größe durch Auftrennung mit einem Agarosegel bestätigt (Abb. 29, oben). Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und die DNA-Konzentrationen bestimmt. In einem EMSA mit 21 nM DO1A und 32 nM DO_{crh} kombiniert mit ansteigenden Crh*-Konzentrationen (0 bis 9,5 µM) war zu erkennen, dass DO1A mit drei postulierten Operatoren auf mehrere Höhen geshiftet wurde, während der Kontroll-DNA-Abschnitt DO_{crh} ungebunden blieb (Abb. 29, A). Insgesamt wurden vier Protein-DNA-Komplexe (I bis IV) unterschiedlicher Größe gebildet, die als undeutlicher Schmier auftraten. Im Ansatz mit 0,24 µM Crh* war der erste Komplex (I) erkennbar und im Ansatz mit 2,8 µM Crh* wurde die gesamte DO1A-DNA durch das Crh*-Protein gebunden. Ab hier trat auch ein höher laufender Komplex (II) auf. Bei einer Konzentration von 9,5 µM Crh* tauchten zwei noch größere Protein-DNA-Komplexe (III und IV) auf. In dem zweiten EMSA wurde das Crh*-Protein mit DNA-Abschnitten kombiniert, die aus dem RsaI-Verdau des DO1B-PCR-Produkts stammten (Abb. 29, B). Die gebildeten Fragmente DO1B_{coh} und DO_{coh} lagen mit jeweils 21 nM in den Reaktionsansätzen vor. Wie im ersten Assay wurde nur der DNA-Abschnitt mit einer postulierten Operatorsequenz gebunden, wohingegen DO_{coh} ohne bekannte Operatorsequenz nicht gebunden wurde. Im Unterschied zum ersten Assay wurde ab einer Crh*-Konzentration von 0,24 µM ein deutlich erkennbarer Protein-DNA-Komplex (I) gebildet, der bis zur Crh*-Höchstkonzentration erkennbar war. Bei dieser Konzentration erschien ein weiterer, größerer Protein-DNA-Komplex (II). Das Coh*-Protein wurde in einem EMSA mit 32 nM DO1A und 20 nM DO1B (Abb. 29, C und D) getestet. Das Protein konnte lediglich DO1A binden, wobei ein einziger Protein-DNA-Komplex (I) als Schmier gebildet wurde (Abb. 29, C). Da DO1B ungebunden blieb, mussten keine weiteren DNA-Abschnitten im Zusammenhang mit Coh* untersucht werden. In einem EMSA mit GST-Rir (ehemals GST-ORF3) wurde gezeigt, dass die putative Zink-Metalloprotease mit einem N-terminalen GST-tag nicht an die DNA im TP-J34-Lysogeniemodul bindet (Faulhaber Diplomarbeit, 2012). Um eindeutig eine DNA-Bindefunktion ausschließen zu können, wurde ein EMSA mit dem Rir*-Protein ohne GST-tag wiederholt. Das Rir*-Protein zeigte keine DNA-Bindeaktivität (Abb. 29, E und F).

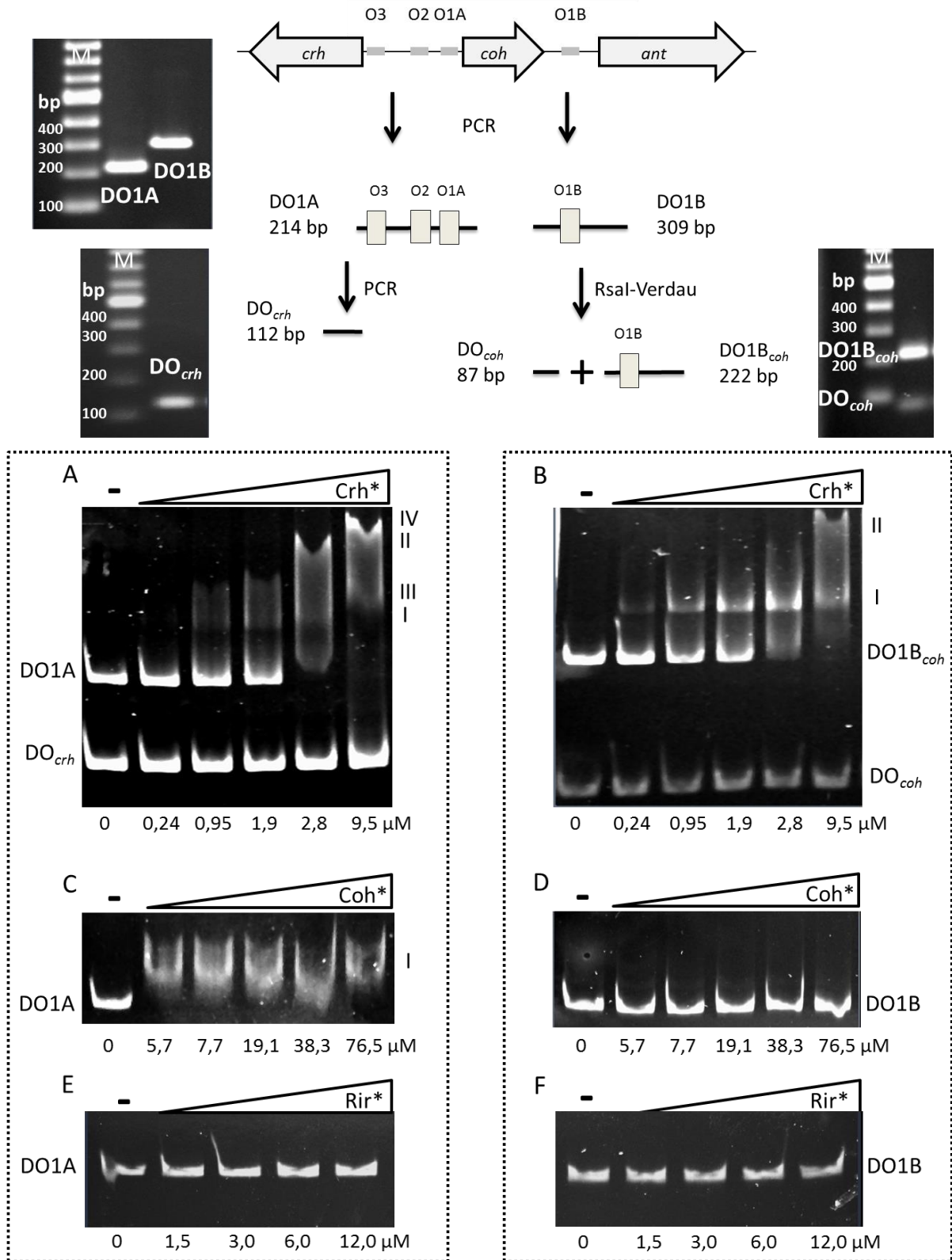


Abb. 29. EMSA zur Ermittlung der DNA-Bindeaktivität von Crh*, Coh* und Rir*. Die affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteine wurden in ansteigenden Konzentrationen für 20 min mit verschiedenen DNA-Abschnitten aus dem TP-J34-Lysogeniemodul (oben) inkubiert und durch eine 6%ige, native PAGE aufgetrennt (unten). Als Kontrolle dienen die DNA-Abschnitte DO_{crh} und DO_{coh} ohne Operatorsequenzen. Crh* (0 bis 9,5 µM) mit 21 nM DO1A und 32 nM DO_{crh}. (A). Crh* (0 bis 9,5 µM) mit 21 nM DO1B_{coh} und 21 nM DO_{coh}. (B). Coh* (0 bis 76,5 µM) mit 32 nM DO1A (C). Coh* (0 bis 76,5 µM) mit 20 nM DO1B (D). Rir* (0 bis 12 µM) mit 21 nM DO1A (E). Rir* (0 bis 12 µM) mit 21 nM DO1B (F). - DNA ohne Protein. I bis IV: putative Protein-DNA-Komplexe. M: DNA Ladder 100 bp plus (AppliChem).

In einem EMSA mit bis zu 80 μM GST-HdiR wurde weder DO1A noch DO1B gebunden (Abb. 30, A). Die Mutation in GST-Crh_{Mut} verhinderte nicht die Bindung des Proteins an DO1A (Abb. 30, B).

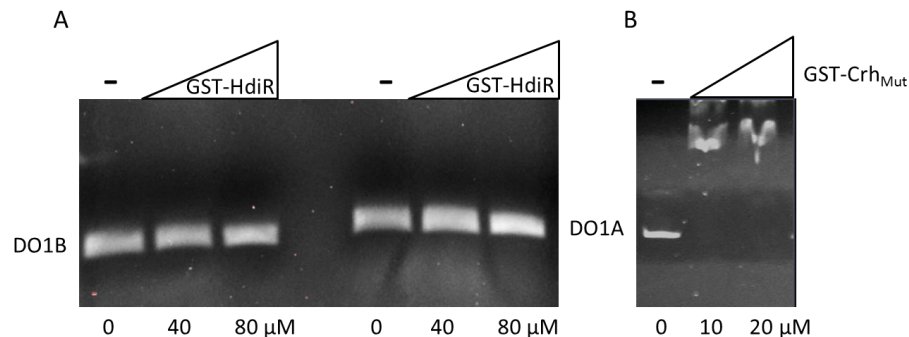


Abb. 30. EMSA zur Ermittlung der DNA-Bindeaktivität von GST-HdiR (A) und GST-Crh_{Mut} (B). Die affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteine wurden in ansteigenden Konzentrationen für 20 min mit den DNA-Abschnitten DO1B und DO1A aus dem TP-J34-Lysogeniemodul inkubiert und durch eine 6%ige, native PAGE aufgetrennt. Es wurden 0 bis 80 μM GST-HdiR mit 20 nM DO1B bzw. DO1B (A) und 0 bis 20 μM GST-Crh_{Mut} mit 20 nM DO1A zusammengegeben (B). - DNA ohne Protein.

Im nächsten Schritt sollten die Bindestellen (Operatoren) in den intergenen Regionen von *crh* und *coh* bzw. *coh* und *ant* genau lokalisiert werden. Dazu wurden Wettbewerbsassays mit 21 bp langen, hybridisierten Oligonukleotiden angewendet (Tab. 28). Alle Kompetitoren (ds-O1A, ds-O1B, ds-O2 und ds-O3) konnten bei Crh* mit dem DO1B-DNA-Abschnitt konkurrieren (Abb. 31, a bis c). Zu erkennen war dies an der ungebunden vorliegenden DNA bei ansteigenden Kompetitor-Konzentrationen wie sie im Kontroll-Ansatz ohne Protein (-) vorlag. Weiterhin ergaben die Assays, dass die Affinität von Crh* zu O1A bzw. O1B größer war, als die zu O2 und O3. Erkennbar war dies daran, dass ds-O1A bzw. ds-O1B schon mit etwa 750 μM (40facher molarer Überschuss) das Protein abfangen konnten, während es bei ds-O2 und ds-O3 erst bei etwa 1,5 nM (75facher molarer Überschuss) dazu kam. Als Kontrolle, dass es sich bei der Bindung von Crh* um spezifische Bindungen handelt, wurden bis zu 400 pmol (40 nM) der Kompetitoren ds-O3x (Daten nicht gezeigt) und ds-O4 eingesetzt, die nicht von Crh* gebunden wurden (Abb. 31, g). Im Assay mit Coh* konnte nur der Kompetitor O3 das Protein abfangen (Abb. 31, d).

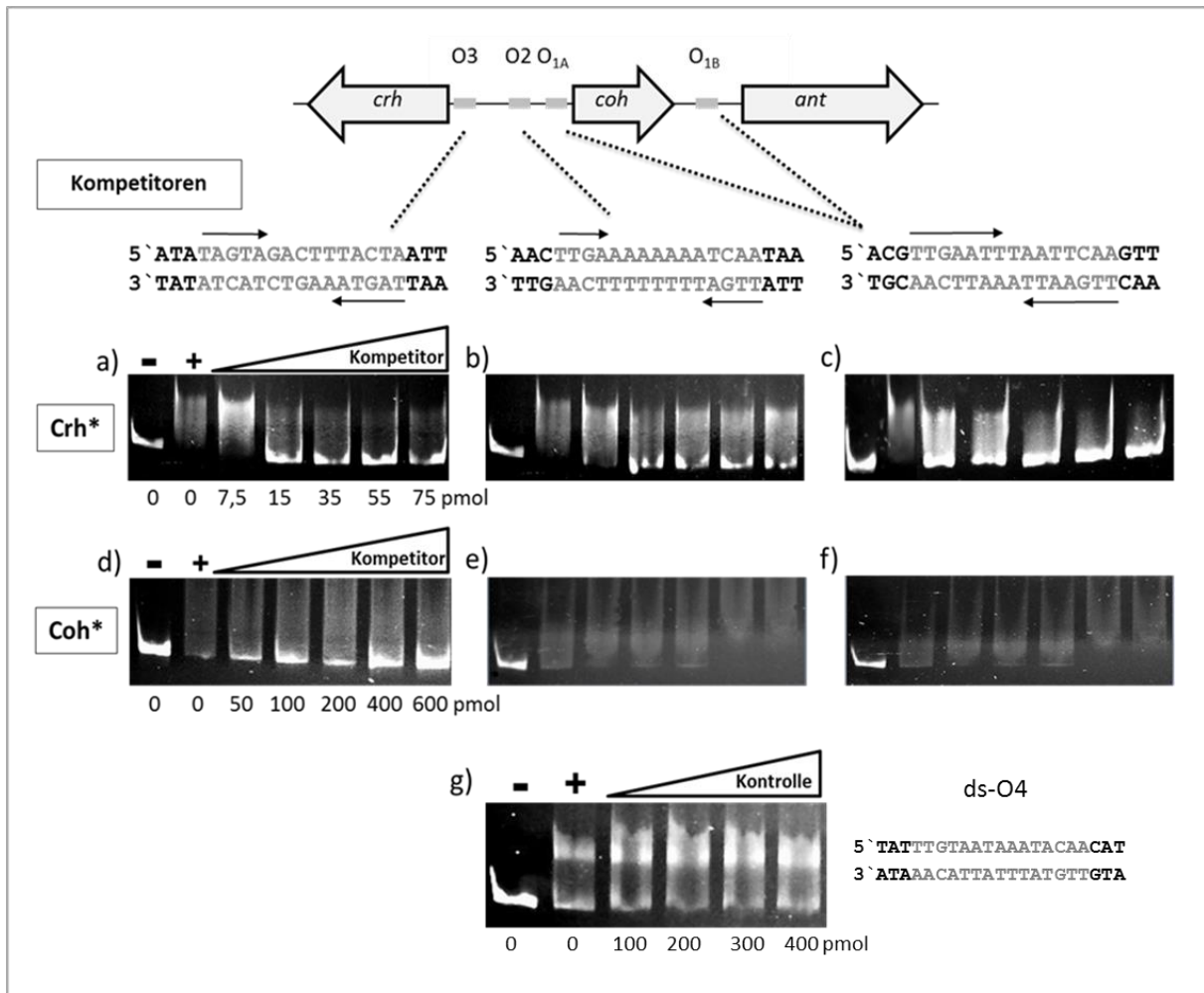


Abb. 31. Kompetitionsassays zur Ermittlung und Lokalisierung der Repressor-Bindestellen (Operatoren) im Lysogeniemodul des TP-J34-Phagen. Es wurden konstant 20 nM DO1B mit 5 nM Crh*-Protein und ansteigenden Kompetitor-Mengen (0 bis 75 pmol) kombiniert bzw. 20 nM DO1A mit 15 nM Coh*-Protein und 0 bis 600 pmol der Kompetitoren. Die Sequenzen der doppelsträngigen Kompetitoren mit je 21 bp Länge sind angegeben. Sie umfassten je eine postulierte Operatorstelle von 15 bp, die durch die Pfeile dargestellt ist. Kompetitionsassay des Crh*-Proteins mit DO1B und Kompetitor ds-O3 (a), Kompetitor ds-O2 (b) und Kompetitor ds-O1A (c). Kompetitionsassay des Coh*-Proteins mit DO1A und Kompetitor ds-O3 (d), Kompetitor ds-O2 (e) und Kompetitor ds-O1A (f). Als Kontroll-Kompetitor für Crh* wurden bis zu 400 pmol ds-O4 eingesetzt (g). Kontrollen: - DNA ohne Protein; + DNA mit Protein, ohne Kompetitor.

Um die Vermutung einer kooperativen Bindung des Repressors Crh an die Operatoren O1A und O2 zu bestätigen, wurden zwei Kompetitionsassays mit Crh* und den Kompetitoren ds-O1A und ds-O2 sowie dem Kompetitor ds-O1A-O2 durchgeführt. In dem Assay mit dem kombinierten Kompetitor ds-O1A-O2 (Abb. 32, rechts) wurde Crh* früher abgefangen als in dem Assay mit den beiden einzeln vorliegenden Kompetitoren (Abb. 32, links). Von ds-O1A-O2 reichten etwa 3,75 pmol (375 μ M) aus, während von ds-O1A und ds-O2 etwa 15 pmol (1,5 nM) benötigt wurden um eine sichtbare Konkurrenz hervorzurufen. Dieses wurde auch durch ein früher auftretendes Auflösen der Crh*-DNA-Komplexe mit dem Kompetitor ds-O1A-O2 sichtbar.

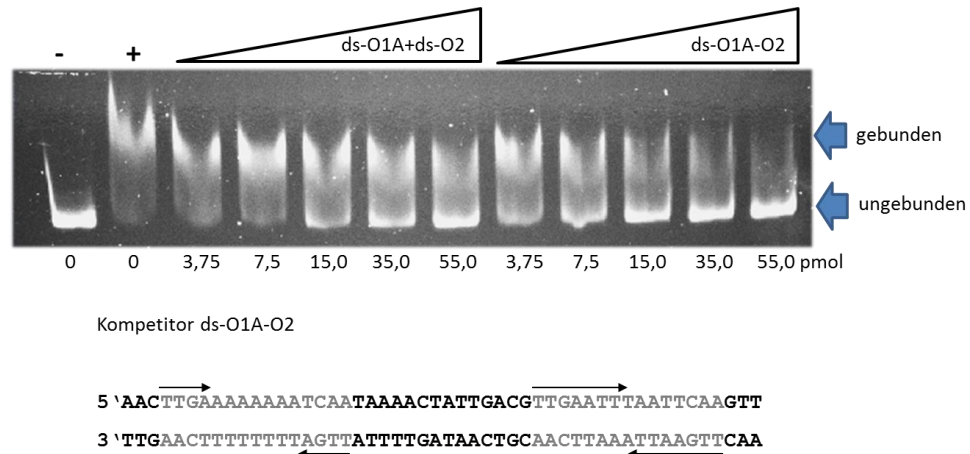


Abb. 32. Kooperative Bindung des Crh*-Proteins an die Operatoren O1A und O2 gezeigt durch einen Kompetitionsassay mit den Kompetitoren ds-O1A und ds-O2 (links) sowie dem kombinierten Kompetitor ds-O1A-O2 (rechts). Es wurden konstant 6 μM Crh*-Protein und 20 nM DO1B mit ansteigenden Mengen (3,75 bis 55 pmol) der Kompetitoren zusammengegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse der Reaktionen erfolgte durch eine native TBE-PAGE (6%). Die Sequenz des Kompetitors ds-O1A-O2 ist unterhalb des Assays angegeben.

Zusammenfassend konnten mit den Ergebnissen der EMSA und Kompetitionsassays folgende Aussagen getroffen werden: Das Crh*-Protein bindet in der intergenen Region von *crh* und *coh* an die Operatoren O1A, O2 und O3 sowie in der von *coh* und *ant* an O1B. Das Coh*-Protein bindet nur an Operator O3 in der Region zwischen *crh* und *coh*. Rir* und GST-HdiR besitzen keine DNA-Bindefunktion, während die Bindung von GST-Crh_{Mut} an DO1A durch die Mutation nicht beeinflusst wird.

4.5 Interaktionsanalyse der Proteine Crh* und Rir*

Die in einem Operon kodierten Proteine Crh und Rir wurden näher auf ihre Interaktion hin untersucht. Dabei wurden verschiedene Verfahren zur Aufdeckung von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Hierzu zählten Kompetitionsassays, Quervernetzungen mit Glutaraldehyd und eine Auftrennung der Proteine mit Hilfe einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

In einem Kompetitionsassay mit GST-Rir (ehemals GST-ORF3) als Kompetitor wurde die DNA-Bindung von Crh* gehemmt (Koberg Diplomarbeit, 2012; Faulhaber Diplomarbeit, 2012). Zur weiteren Analyse wurde ein Kompetitionsassay mit den *tag*-freien Proteinen Crh* und Rir* und drei verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt (Abb. 33). Rir* inhibierte die DNA-Bindung von Crh*, wenn beide Proteine gleichzeitig mit 15 nM der DNA

(DO1B) zusammengeführt wurden (Abb. 33, A). 1,6 μM Crh*-Protein konnten keinen sichtbaren *Shift* wie im Kontrollansatz (+) hervorrufen. Ein vierfacher Überschuss an Rir* gegenüber Crh* reichte aus, um die Bindung zu verhindern. Wurde Crh* mit DO1B für 20 min präinkubiert, bevor das Rir*-Protein dazugegeben wurde, konnten die gebildeten Crh*-DO1B-Komplexe nicht durch Rir* aufgelöst werden (Abb. 33, B). Im gesamten Assay lag die DNA wie im Kontrollansatz (+) durch Crh* gebunden vor. Genau wie eine simultane Zusammenführung aller Komponenten verhinderte auch die Präinkubation von Crh* und Rir* für 20 min eine DNA-Bindung durch Crh* (Abb. 33, C). In einem weiteren Kompetitionsassay wurde die inhibierende Wirkung von Rir* auf die DNA-Bindung der Mutanten Crh_{Mut}* untersucht. Hier konnte ein etwa 20facher molarer Überschuss von Rir* gegenüber Crh* keine Hemmung hervorrufen (Abb. 33, D). Die DNA-Bindung von Coh* wurde nicht durch Rir* beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

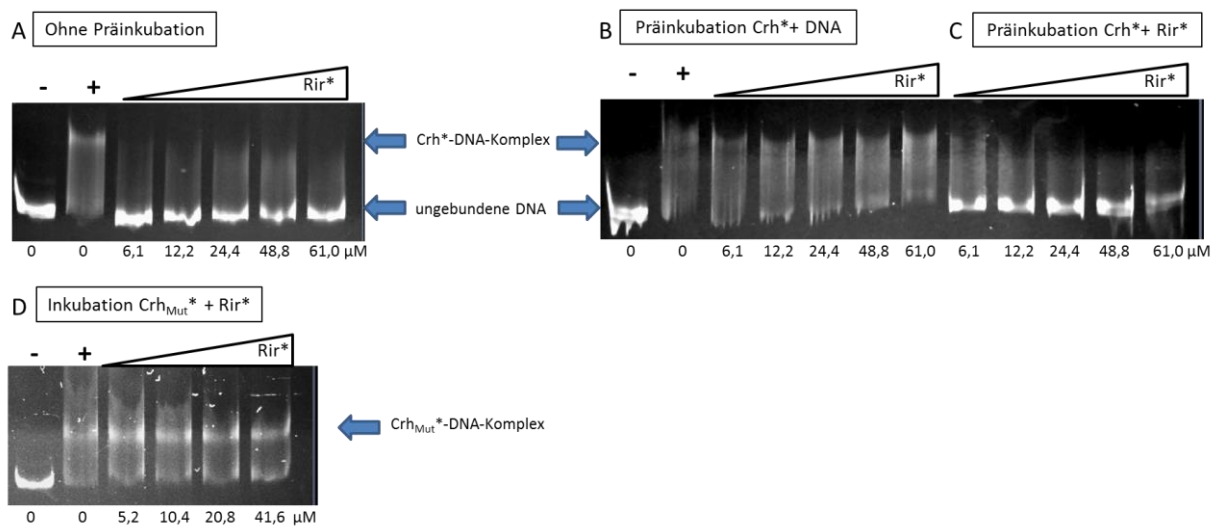


Abb. 33. Interaktionsanalyse der Proteine Crh* bzw. Crh_{Mut}* und Rir* durch einen Kompetitionsassay. Konstant 1,6 μM Crh* und 15 nM DO1B wurden mit ansteigenden Rir*-Konzentrationen (6,1 bis 61 μM) inkubiert. Es wurden verschiedene Versuchsvarianten gewählt, in denen Crh* und Rir* simultan zur DNA gegeben wurden (A), Crh* und die DNA 20 min präinkubiert wurden, bevor Rir* hinzugefügt wurde (B) und eine Präinkubation von Crh* und Rir* erfolgte, bevor die DNA zugegeben wurde (C). In einem weiteren Assay wurden konstant 1,6 μM Crh_{Mut}* mit ansteigenden Rir*-Konzentrationen (5,2 bis 41,6 μM) inkubiert (D). Die Analyse der Reaktionen erfolgte durch eine native TBE-PAGE (6%). Die DNA wurde mit SYBR® *Safe DNA Gel stain* (Invitrogen) visualisiert.

In einem Quervernetzungsansatz mit Glutaraldehyd wurde die Interaktion zwischen GST-Rir und Crh* sowie GST-Rir und Coh* analysiert (Abb. 34). GST bildet bekanntermaßen selbst Dimere (Rufer *et al.*, 2005), die bei 0,01 % Glutaraldehyd zur Bildung schwach erkennbarer Oligomere von GST-Rir führten. Zwischen GST-Rir und Coh* konnte bei dieser Glutaraldehyd-

hyd-Konzentration keine Komplexbildung detektiert werden. Im Ansatz mit Crh* reichten hingegen 0,005 % Glutaraldehyd aus, um GST-Rir und Crh* zu Oligomeren mit einer Laufhöhe von etwa 55 kDa und 110 kDa zu verknüpfen. Erkennbar war, dass die GST-Rir-Monomere (41 kDa) in den Ansätzen mit Crh* größtenteils verschwanden und höher organisierte Komplexe auftauchten. Der N-terminale GST-*tag* hinderte Rir nicht an einer Interaktion

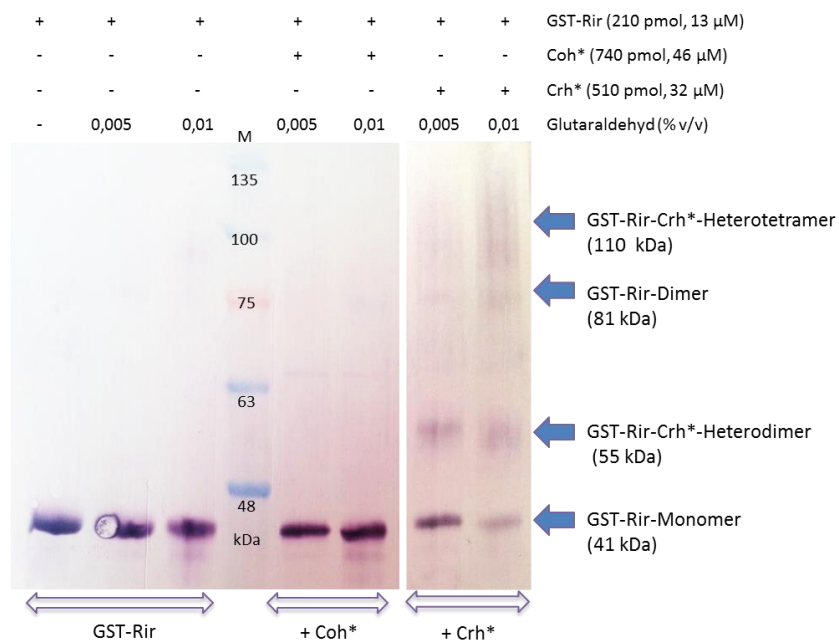


Abb. 34. Quervernetzung von GST-Rir mit Coh* und Crh* durch 0,01 und 0,005 % Glutaraldehyd analysiert über einen *Western Blot*. Die Ansätze wurden über eine 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt und dann geblottet. Die Detektion von GST-Rir erfolgte mit einem GST-Antikörper. Postulierte Komplexe sind mit ihrer Größe in kDa angegeben. M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

mit dem Repressor.

Um auszuschließen, dass GST für die Oligomerisierung verantwortlich ist, wurde eine Glutaraldehyd-Quervernetzung von Biotin-markiertem Rir* und Coh* sowie Crh* analysiert. Auch hier konnten 0,005 % Glutaraldehyd Rir* und Crh* zu einem etwa 29 kDa- und 58 kDa-Komplex verknüpfen, während Rir* allein und in Kombination mit Coh* bei dieser Glutaraldehyd-Konzentration keine Oligomere bildete (Abb. 35).

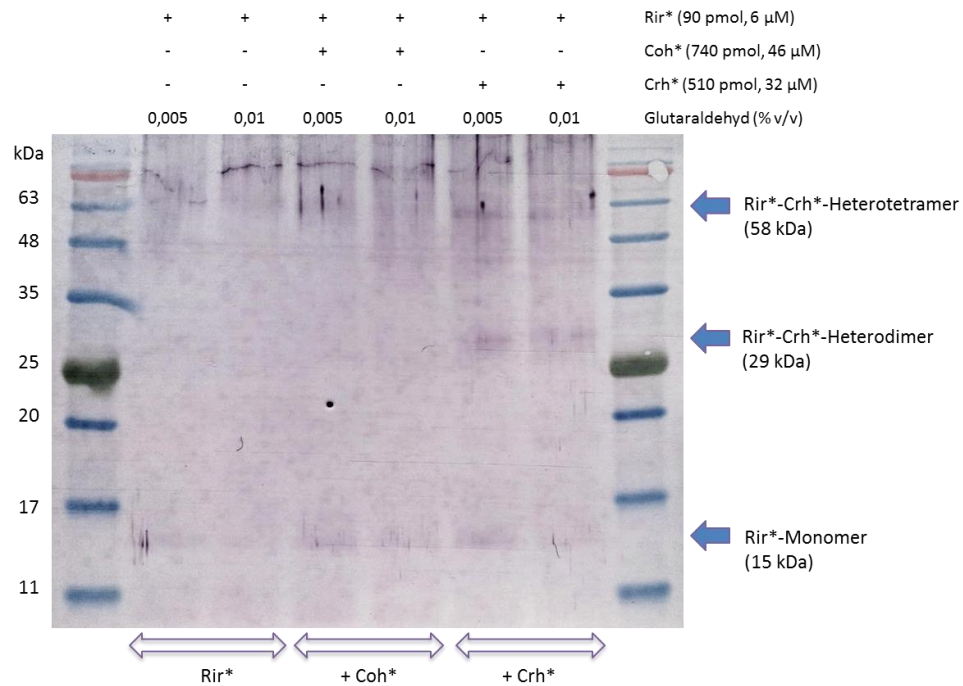


Abb. 35. Quervernetzung des Rir*-Proteins (Biotin-markiert) mit Coh* und Crh* durch 0,005 und 0,01 % (v/v) Glutaraldehyd auf einem *Western Blot* mit Streptavidin-AP detektiert. Die Ansätze wurden über eine 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt und dann geblottet. Postulierte Protein-Protein-Komplexe sind mit ihrer Größe in kDa angegeben. M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

Eine native PAGE wurde eingesetzt, um das natürliche Verhalten von Crh*, Biotin-markiertem Crh* und GST-Rir bzw. Rir* zu analysieren. Auf diese Weise konnten Komplexbildungen von GST-Rir mit Crh* bzw. Rir* mit Biotin-markiertem Crh* sichtbar gemacht werden. Der putative Komplex zwischen GST-Rir und Crh erstreckte sich über einen Bereich von etwa 64 bis 74 kDa (Abb. 36, A). Biotin-markiertes Crh* konnte nach Blotten des nativen Gels bei etwa 49 kDa detektiert werden, während es in Kombination mit Rir* bei über 63 kDa lief (Abb. 36, B).

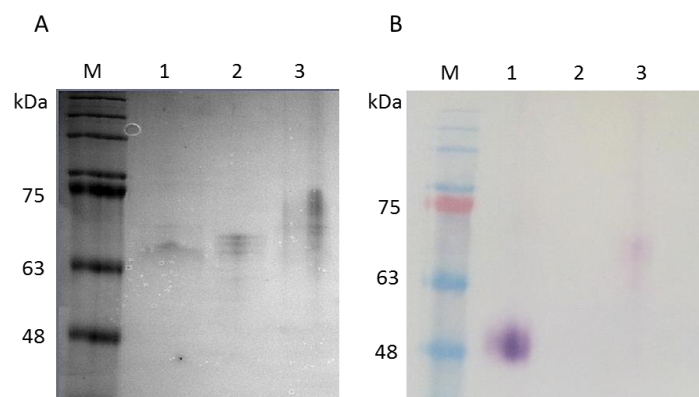


Abb. 36. Interaktionsanalyse der Proteine Crh* und GST-Rir (A) sowie Crh* (Biotin-markiert) und Rir* (B) analysiert durch eine 10%ige native PAGE und im Fall von (B) geblottet. Crh* (A1) wurde mit GST-Rir (A2) 20 min inkubiert und dann über eine native PAGE aufgetrennt (A3). Biotin-markiertes Crh* allein (B1) und nach Inkubation mit Rir* (B3) wurde auf einem Blot mit Streptavidin-AP detektiert. Nicht-markiertes Rir* wurde in Spur B2 aufgetragen. M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

4.6 Auswirkung einer *rir*-Überexpression in *S. thermophilus* J34f-2

Zur Ermittlung der Funktion des Rir-Proteins bei der TP-J34-Induktion wurde ein Konstrukt auf Basis des pMG36e-Vektors hergestellt. Die konstitutive Expression des *rir*-Gens durch den starken P32-Promotor ermöglichte eine *in vivo*-Funktionsanalyse. Mit den Primern 'orf3_SacI_fw' und 'orf3 HindIII.R' wurde ein 444 bp großes *rir*-PCR-Produkt mit SacI- und HindIII-Erkennungssequenzen amplifiziert (Abb. 37, A) und in die entsprechenden Stellen des *shuttle*-Vektors pMG36e ligiert, sodass pSK10 mit einer Größe von 3.998 bp (Abb. 37, B) entstand. Etabliert wurde pSK10 in *L. lactis* Bu2-60 und dann in die *S. thermophilus* J34-Derivate f-2 und 12f transformiert.

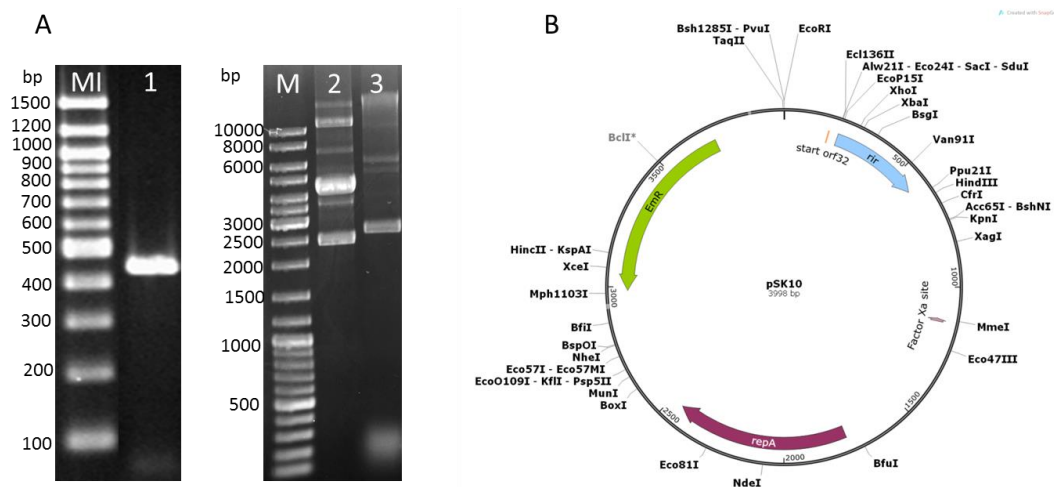


Abb. 37. Konstruktion von pSK10 zur konstitutiven Expression von *rir* in *S. thermophilus* J34f-2 und 12f. Das PCR-Produkt mit einer Größe von 444 bp (A1) umfasste das *rir*-Gen und einen *downstream* Abschnitt. Dieses wurde in die SacI- und HindIII-Schnittstellen des pMG36e-Vektors (A2) eingefügt, sodass pSK10 (A3) gebildet wurde. Die Plasmidkarte von pSK10 (3.998 bp) ist dargestellt (B). MI: 100 bp DNA Ladder (NEB); M: DNA Ladder 1 kb (AppliChem).

Nachdem die J34f-2[pSK10]-Zellen von der Selektionsplatte in thLM17 mit $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Erythromycin angeimpft wurden und über Nacht durchwuchsen, zeigten sie in der zweiten Passage eine Lysekurve (Abb. 38, A). Dabei stiegen sie nach dem Animpfen und einer Inkubation bei 40°C bis zu einer $\text{OD}_{620} \sim 1,2$ an und fielen innerhalb von fünf Stunden auf $\text{OD}_{620} \sim 0,25$ ab. Zum Vergleich wuchs die Leerplasmid-tragende f-2[pMG36e]-Kultur exponentiell bis zu einer stationären Phase mit einer $\text{OD}_{620} \sim 1,6$ an. Der Stamm 12f[pSK10] zeigte im Vergleich zum Leerplasmid-tragenden Stamm 12f[pMG36e] ein etwas langsames Wachstum. Durch *spotten* der filtrierten ($0,45 \mu\text{m}$) Kulturüberstände auf den Prophagen-kurierten Stamm J346-f (Abb. 38, B) und TEM-Aufnahmen der Filtrate (Abb. 38, C), konnten TP-J34-Virionen im Überstand von f-2[pSK10], nicht aber in dem von f-2[pMG36e] und 12f[pSK10] nachgewie-

sen werden. Eine lytische Anzucht von Phagen (3.2.5) auf dem Stamm J346-f konnte nur mit dem Überstand der f-2[pSK10]-Kultur erfolgen (Daten nicht gezeigt).

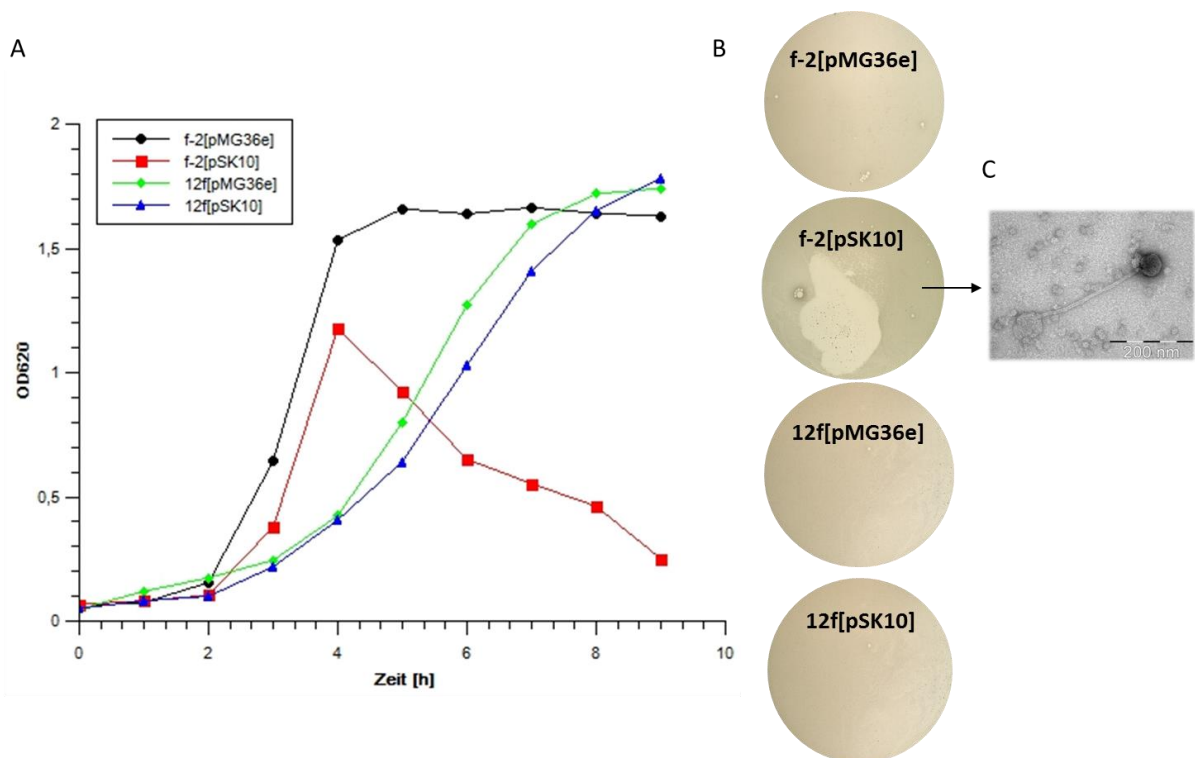


Abb. 38. Induktion der lytischen Entwicklung des Phagen TP-J34 durch eine *vir*-Überexpression mit pSK10 in *S. thermophilus* J34f-2[pSK10] dargestellt in einer Wachstumskurve der Stämme J34f-2[pMG36e], J34f-2[pSK10], J34-12f[pMG36e] und J34-12f[pSK10] bei 40 °C nach 1%iger Inokulation von thLM17 zuzüglich 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Erythromycin (A), in Spotttests der Überstände auf J346-f (B) und in einer TEM-Aufnahme des Überstandes von J34f-2[pSK10] (C).

Eine Behandlung der pSK10-tragenden Stämme mit 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MMC zeigte, dass lediglich der Prophage aus f-2[pSK10] und f-2[pMG36e] induzierbar war, nicht aber der aus 12f[pSK10] und 12f[pMG36e] (Daten nicht gezeigt).

4.7 *In vivo*- und *in vitro*-Untersuchung einer Crh-Prozessierung

Der Repressor der lytischen Gene wurde *in vivo* und *in vitro* hinsichtlich einer möglichen Degradierung zur Einleitung der lytischen Phagenentwicklung untersucht. Zu diesem Zweck wurde das in *S. thermophilus* J34f-2 exprimierte Fusionsprotein GST-Crh im lysogenen Zustand und im induzierten Zustand bezüglich seiner Größe verglichen. Weiterhin wurde das Repressor-Protein direkt mit RecA aus *E. coli* und GST-RecA aus *S. thermophilus* J34f-2 inkubiert. Eine Inkubation des Repressors GST-Crh in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten sollte zusätzlich Aufschluss über eine pH-abhängige Autoproteolyse geben.

Für eine konstitutive Expression wurde das *gst-crh*-Gen mit den Primern 'GST-Crh_XbaI_f' und 'GST-Crh_HindIII_r' (Tab. 20) aus dem Plasmidkonstrukt pSK6 amplifiziert (Abb. 39, A) und dann in die Restriktionsschnittstellen XbaI und HindIII des Vektors pMG36e (Abb. 61, Anhang) eingefügt. Das resultierende Konstrukt besaß mit dem 1.075 bp großen *insert* eine Größe von 4.652 bp und wurde als pSK20 bezeichnet (Abb. 39, B). Aufgrund der fälschlicherweise gewählten HindIII-Schnittstelle, die auch im *crh*-Gen auftaucht, musste auf eine vollständige Klonierung des Gens geachtet werden.

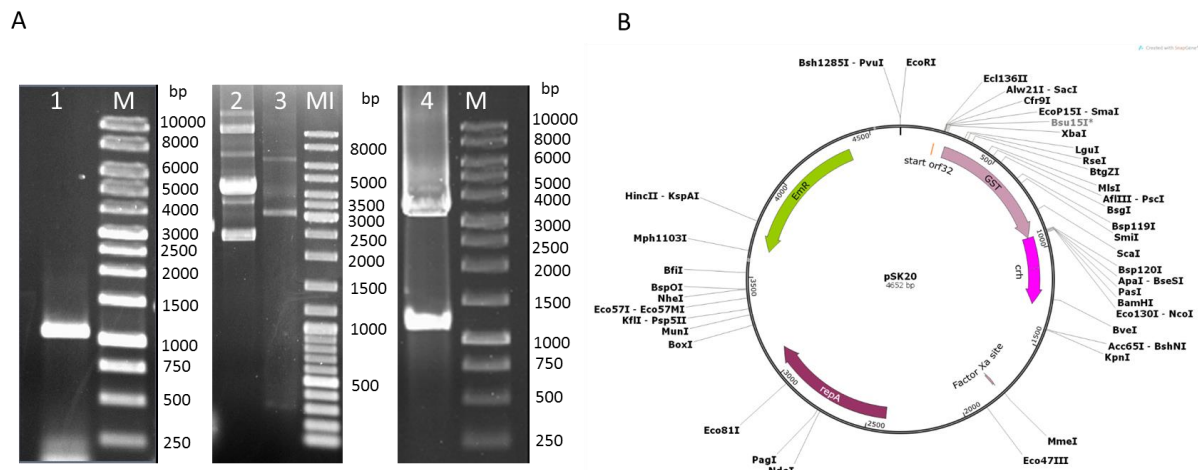


Abb. 39. Konstruktion von pSK20 zur konstitutiven Expression von *gst-crh* in *S. thermophilus* J34f-2 und 12f. Ein 1.075 bp großes PCR-Produkt aus dem pSK6 Plasmid (A1) wurde in die XbaI- und HindIII-Schnittstellen von pMG36e ligiert. Auf diese Weise entstand pSK20 (A3), das im Agarosegel langsamer lief als pMG36e (A2) und aus dem das *gst-crh*-Fragment mit 111 bp großer *downstream*-Region durch XbaI und KpnI herausgeschnitten wurde (A4). M: *DNA Ladder 1 kb* (AppliChem); MI: *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific).

Ein Vorversuch mit MMC-Konzentrationen von 0,3 und 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ zeigte, dass die Expression von *gst-crh* in *S. thermophilus* J34f-2[pSK20] die Induktion des Prophagen verzögerte. Während der Leerplasmid-tragende Stamm J34f-2[pMG36e] bereits bei 0,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MMC eine durch die Prophageninduktion hervorgerufene Lysekurve 90 min nach Zugabe von MMC aufwies, wurde das Wachstum des *gst-crh*-exprimierenden Stammes J34f-2[pSK20] nach Zugabe dieser MMC-Konzentration ähnlich dem des MMC-behandelten Stammes J34-12f[pSK20] lediglich verlangsamt (Abb. 40, A). Erst bei 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MMC zeigte sich bei J34f-2[pSK20] eine Lyse, die 3 h nach Zugabe von MMC später auftrat, als beim Leerplasmid-tragenden Stamm (Abb. 40, B).

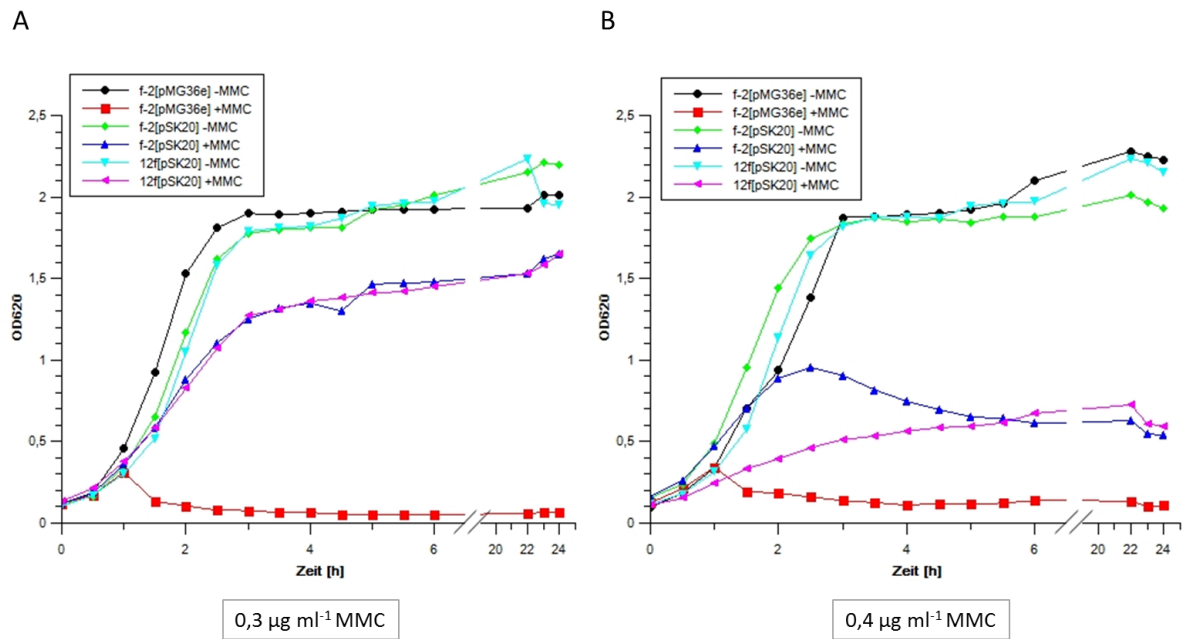


Abb. 40. Induzierbarkeit des Prophagen aus *gst-crh*-exprimierenden *S. thermophilus* J34f-2[pSK20] durch $0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ MMC im Vergleich zum Leerplasmid-tragenden Stamm J34f-2[pMG36e] und der *rir*-Mutanten J34-12f[pSK10]. Je 5 ml thLM17 mit $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Erythromycin wurden 1%ig angeimpft und bei einer OD_{620} 0,2 mit den angegebenen MMC-Konzentrationen versetzt. Die OD_{620} wurde alle 30 min gemessen und die Mittelwerte aus drei Ansätzen zur Kurvenerstellung berechnet.

Die Detektion des GST-Crh-Proteins aus 10 ml unbehandelten J34f-2[pSK20]-, J34cu50[pSK20]- (nicht in Abb. 40 dargestellt) und J34-12f[pSK20]-Kulturen und aus solchen, die mit $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ MMC behandelt wurden, offenbarte keine eindeutige Degradierung des GST-Crh während der Induktion des TP-J34-Prophagen (Abb. 41). Sowohl in den unbehandelten als auch in den MMC-behandelten Kulturen wurden zwei Banden durch den GST-Antikörper detektiert, die zwischen 35 und 48 kDa groß waren und sich in etwa 2 bis 3 kDa Größe unterschieden. Die Proteine aus der MMC-behandelten J34f-2- (1+) und cu50-Kultur (2+) schienen ein minimal tieferes Laufverhalten aufzuweisen, als die aus den unbehandelten Kulturen (1-, 2-, 3-) und der MMC-behandelten J34-12f-Kultur (3+). Nach Aufreinigung der Proteine aus je 500 ml unbehandelter und mit $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ MMC behandelter Kultur über eine GST-Affinitätschromatographie und Konzentrierung der Proteine (*Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters*, 10 kDa) zeigte sich das gleiche Bild von zwei Produkten auf dem SDS-Gel (Abb. 41, B) und *Western Blot* (Abb. 41, C), wobei eine niedrigere Laufhöhe des Proteins aus induzierten Zellen zu erkennen war. Das zum Vergleich aus *E. coli* BL21 (DE3) aufgereinigte und geblottete GST-Crh trat ebenfalls in diesen zwei Formen auf (Abb. 41, D).

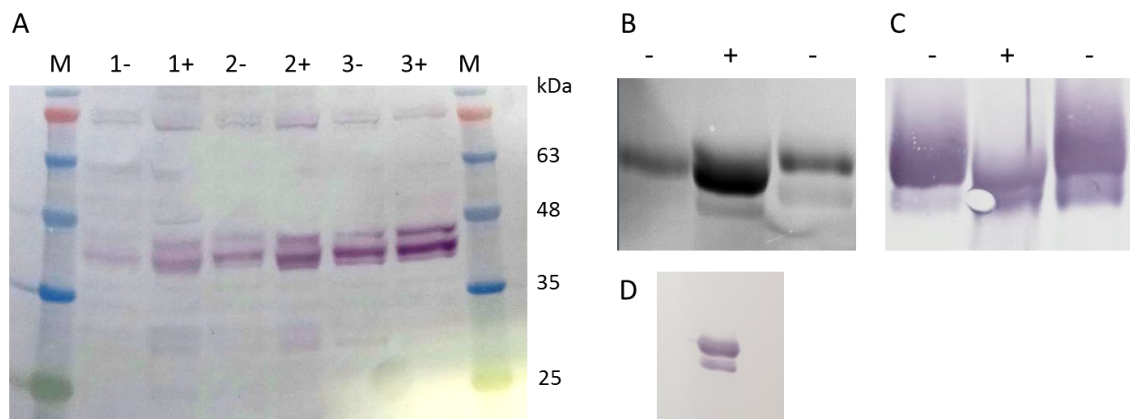
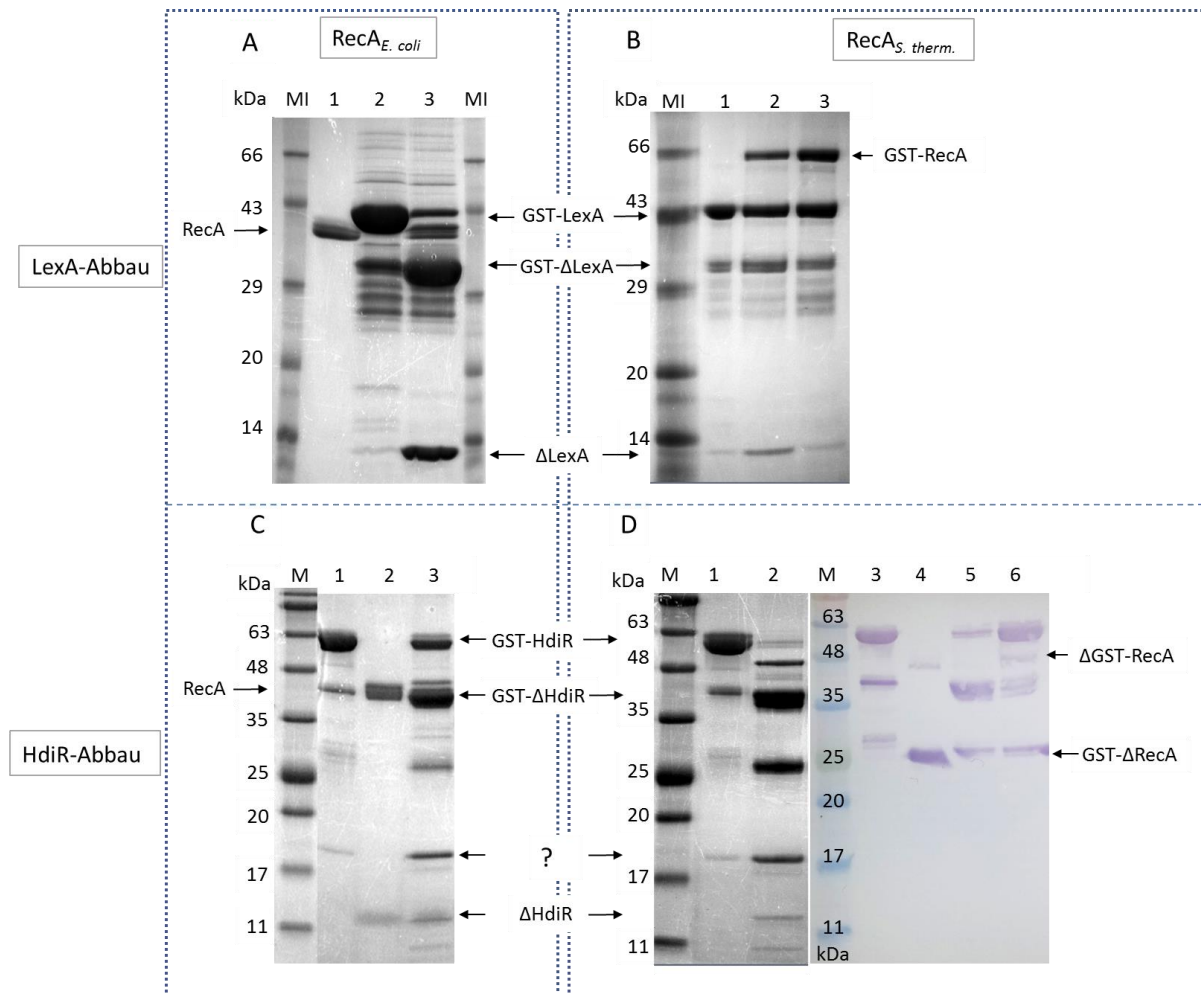


Abb. 41. *In-vivo*-Analyse des Repressorproteins GST-Crh aus unbehandelten (-) und mit $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ MMC behandelten (+) *S. thermophilus* J34f-2[pSK20] (1), J34cu50[pSK20] (2) und J34-12f[pSK20] (3) durch eine 12%ige SDS-PAGE und einen *Blot* (A). Aufgereinigte und konzentrierte GST-Crh-Proteine aus 500 ml nicht-induzierter (-) und mit $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ MMC induzierter (+) J34f-2[pSK20]-Kultur aufgetrennt durch eine 12%ige SDS-PAGE (B) und geblottet (C). Zum Vergleich wurde GST-Crh aus *E. coli* aufgereinigt und geblottet (D). Die Detektion der GST-Proteine erfolgte mit einem GST-Antikörper (C). M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

Für die Analyse einer *in vitro*-Autoproteolyse wurden zunächst die RecA-Proteine aus *E. coli* und *S. thermophilus* J34f-2 auf ihre proteolytische Aktivität getestet, nachdem sie durch Inkubation mit einzelsträngiger DNA und ATP- γ -S aktiviert wurden. Hierfür diente der autoproteolytische Abbau der rekombinanten Proteine GST-LexA und GST-HdiR, der in einer 15%igen SDS-PAGE sichtbar gemacht wurde. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde GST-LexA fast vollständig durch *E. coli* RecA degradiert (Abb. 42, A). Es tauchte ein Spaltprodukt mit einer Größe von über 30 kDa und ein Fragment kleiner als 14 kDa auf (Spaltprodukte wurden in Abb. 42 mit Δ gekennzeichnet). GST-HdiR wurde weniger effizient abgebaut und zeigte ein Spaltprodukt bei etwa 40 kDa und 17 kDa sowie ein schwaches bei etwa 13 kDa (Abb. 42, C). Durch die Aktivierung von GST-RecA aus *S. thermophilus* J34f-2 trat ein Zerfall des 67 kDa großen Proteins in Fragmente von etwa 40 kDa und 25 kDa Größe auf (Abb. 42, Anhang). GST-RecA spaltete GST-HdiR in ein etwa 40 kDa und 13 kDa großes Fragment (Abb. 42, D), konnte GST-LexA aber kaum proteolytisch spalten (Abb. 42, B). Das 13 kDa-Fragment wurde nicht auf einem *Western Blot* detektiert. Beide RecA-Proteine erzeugten bei den Proteinen GST-LexA und GST-HdiR die gleichen Spaltmuster, folglich auch die Bande mit über 17 kDa Größe bei GST-HdiR.



Protein/Spaltprodukt	Spur	Größe in SDS-PAGE	theoretische Größe
GST-LexA	A2, A3, 1, B2, B3	40 kDa	49 kDa
GST-ΔLexA	A3, B2	32 kDa	36 kDa
ΔLexA	A3, B2	13 kDa	13 kDa
GST-HdiR	C1, C3, D1, D2, D3, D5, D6	55 kDa	53 kDa
GST-ΔHdiR	C3, D2, D5	40 kDa	40 kDa
ΔHdiR	C3, D2	12 kDa	13 kDa
?	C3, D2	18 kDa	-
RecA (<i>E. coli</i>) aktiv	C2, C3	38 kDa	38 kDa
GST-RecA (<i>S. therm.</i>) nicht-aktiv	B3, D6	66 kDa	68 kDa
GST-RecA (<i>S. therm.</i>) aktiv	B2, D2, D4, D5	25 kDa und 42 kDa	68 kDa

Abb. 42. *In vitro*-Nachweis einer proteolytischen Aktivität des *E. coli* RecA und des *S. thermophilus* J34f-2 GST-RecA durch LexA- und HdiR-Abbau auf einer 15%igen SDS-PAGE und im Fall von D auf einem *Western Blot* gezeigt. Die Detektion der GST-Fusionsproteine erfolgte durch Anti-GST. Die Proteine wurden 20 min bei 37 °C inkubiert. Infolgedessen wurde GST-LexA in die zwei Fragmente GST-ΔLexA und ΔLexA gespalten. GST-HdiR wurde in GST-ΔHdiR und ΔHdiR sowie ein nicht-definierbares Fragment (?) gespalten. Die vorliegenden Proteine bzw. auftretenden Spaltprodukte in den einzelnen Spuren sind in der Tabelle angegeben. M: Protein Marker VI (AppliChem); MI: *Roti*[®]-Mark Standard (Carl Roth).

Weder GST-Crh noch Crh* wiesen nach Inkubation mit *E. coli* RecA und *S. thermophilus* J34f-2 GST-RecA Spaltprodukte auf (Abb. 43, A und B). Auch in Kombination mit GST-Rir* wurde kein Abbau des Repressors erzielt (Abb. 43, B).

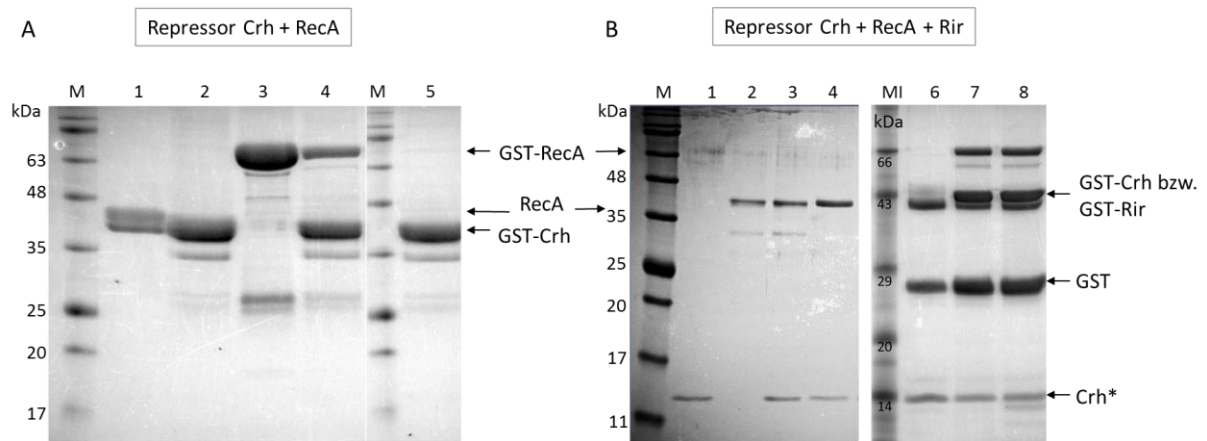


Abb. 43. *In vitro*-Analyse des Repressors Crh nach Inkubation mit aktiviertem RecA aus *E. coli* und GST-RecA aus *S. thermophilus* J34f-2. GST-Crh, das in Spur A5 aufgetragen wurde, wurde mit RecA (A1) in Spur A2 und mit GST-RecA (A3) in Spur A4 zusammengegeben. Zusätzlich wurde Crh* (B1) mit GST-Rir (B2) in Spur B3 und mit GST-Rir und *E. coli* RecA in Spur B4 inkubiert. GST-Crh, Crh* und GST (B6) wurden mit GST-RecA in Spur B7 und zusätzlich mit GST-Rir in Spur 8 inkubiert. Die Proteine wurden 20 min bei 37 °C inkubiert und dann über eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt. M: Protein Marker VI (AppliChem); MI: Roti[®]-Mark Standard (Carl Roth).

Für die *in vitro*-Analyse einer pH-induzierten Autoproteolyse wurde GST-Crh sowie GST-RecA und GST-LexA als Kontrollen in verschiedenen pH-Werten über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Ansätze über eine 15%ige SDS-PAGE analysiert. Die Ansätze mit GST-Crh wurden zusätzlich geblottet und mit Antikörpern behandelt. GST-Crh zeigte bei pH 4,6 und 7,6 ein Spaltprodukt kleiner als 30 kDa (Abb. 44, A), welches durch den Antikörper gebunden wurde und ebenfalls in dem Ansatz von GST-LexA mit pH 4,6 (Abb. 44, C), nicht aber bei GST-RecA (Abb. 44, B) auftauchte. Das 48 kDa große GST-LexA verschwand bei einem pH-Wert von 10,6 fast vollständig.

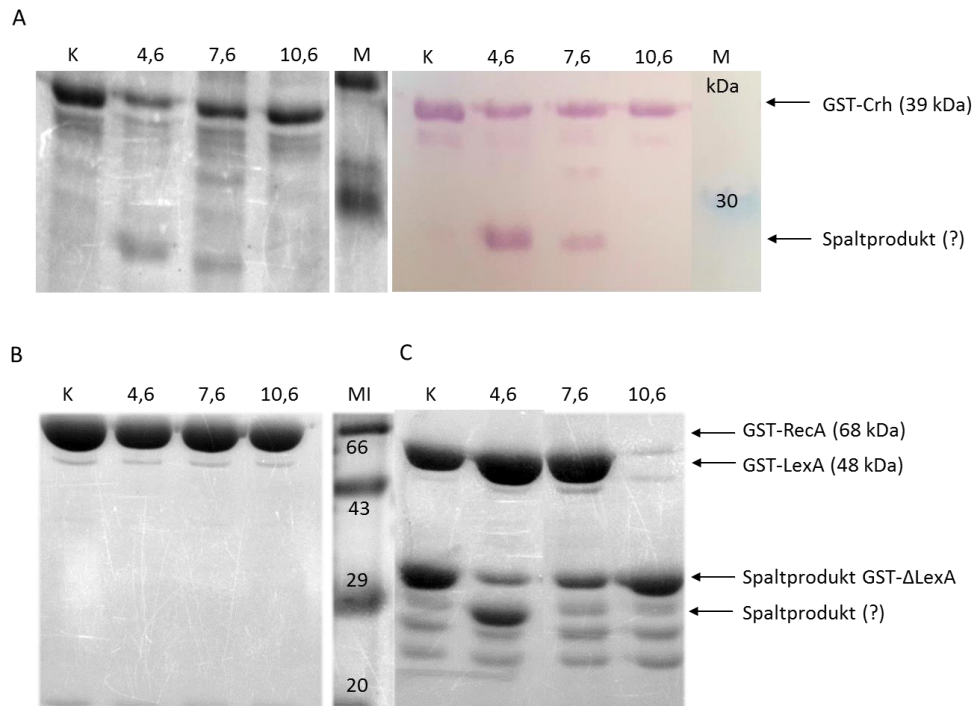


Abb. 44. *In-vitro*-Analyse einer pH-abhängigen Autoproteolyse des Repressor-Proteins GST-Crh (A). GST-RecA mit einer fehlenden Autoproteolysefähigkeit wurde als Negativkontrolle (B) und GST-LexA mit einer bekannten Autoproteolyse als Positivkontrolle (C) mitgeführt. Alle Proteine wurden ohne Zugabe eines Puffers (K: pH 8) und in 1x PBS mit den angegebenen pH-Werten 4,6, 7,6 und 10,6 über Nacht bei 37 °C inkubiert, über eine 15% ige SDS-PAGE aufgetrennt und im Fall von GST-Crh auf einem *Western Blot* mit Anti-GST (A) detektiert. M: Roti[®]-Mark 10-150 (Carl Roth); MI: Roti[®]-Mark Standard (Carl Roth).

4.8 Analyse einer RecA-abhängigen TP-J34 Induktion

Zur Ermittlung einer RecA-abhängigen Induktion des TP-J34-Prophagen wurde das chromosomale *recA*-Gen in *S. thermophilus* J34f-2 ausgeschaltet. Dafür wurde ein 587 bp großes, internes Fragment des *recA*-Gens mit den Primern '*recA_for_XhoI*' und '*recA_rev*' (Tab. 17) aus dem Genom von *S. thermophilus* J34f-2 amplifiziert (Abb. 45, A) und mit den XhoI- und EcoRI-Schnittstellen von pG⁺host9 ligiert. Auf diese Weise entstand pGh*recA* mit einer Größe von 4.414 bp (Abb. 45, B).

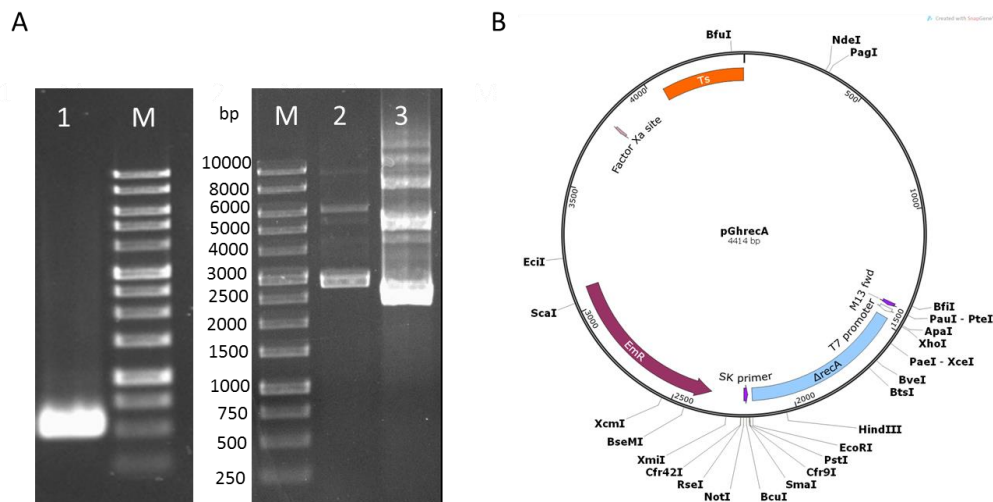


Abb. 45. Konstruktion von pGhrecA zum *Knockout* von *recA*. Ein 587 bp großes, internes *recA*-Produkt (A1) wurde in die *Xho*I- und *Eco*RI-Schnittstellen von pG⁺host9 (A2) ligiert, sodass pGhrecA (A3) entstand. Die Plasmidkarte von pGhrecA (4.414 bp) ist in B dargestellt. M: *DNA Ladder 1 kb* (AppliChem).

Das Konstrukt wurde bei einer permissiven Temperatur von 30 °C in *S. thermophilus* J34f-2 transformiert. Die erfolgreiche Integration in das *recA*-Gen wurde mit Hilfe einer Plasmidpräparation und einer PCR nachgewiesen (3.3.12). Aus der Integranten konnte kein pGhrecA isoliert werden, während die bei 30 °C gezogene Kultur freies pGhrecA aufwies (Abb. 46).

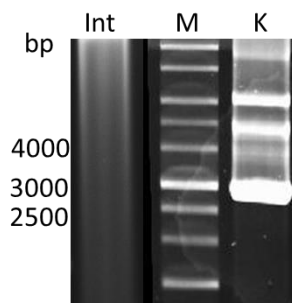


Abb. 46. Plasmidpräparationen nach Andersson & McKay aus *S. thermophilus* J34f-2 nach Integration von pGhrecA (Int) in das Genom und aus der bei 30 °C angezogenen Kultur (K). M: *DNA Ladder 1 kb* (AppliChem).

Nachdem die chromosomale DNA aus der putativen Integranten und der Kontrollkultur isoliert wurde (3.3.11), wurde eine PCR mit Primern, von denen einer im Genom und einer im pGhrecA bindet, durchgeführt. Dabei wurde bei der Integranten, nicht aber bei der bei 30 °C angezogenen Kultur ein PCR-Produkt mit einer Länge von 1.350 bp mit den Primerpaaren 'pGh9-seq-r-new' und 'cro_O1B' gebildet (Abb. 47, A). Mit dem Primerpaar 'recA_BamHI.2' und 'recA_NotI', das zur Amplifizierung des *recA*-Gens verwendet wurde und einer Elongationszeit von 60 s (Tab. 17) wurde bei der Integranten kein Produkt gebildet, während aus den Kontrollen J34f-2 und J34f-2[pGhrecA, 30°C] ein 1.042 bp großes Produkt amplifiziert wurde (Abb. 47, B).

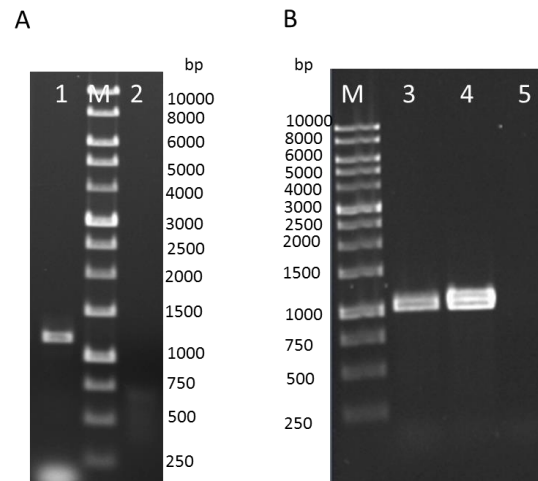


Abb. 47. PCR zum Integrationsnachweis des pGhrecA-Vektors in das *recA*-Gen von *S. thermophilus* J34f-2. Aus der Integranten konnte ein PCR-Produkt mit 'pGh9-seq-r-new' und 'cro_O1B' gebildet werden (A1), das bei dem bei 30 °C angezogenen Stamm J34f-2[pGhrecA] nicht auftrat (A2). Aus der Integranten konnte kein PCR-Produkt mit 'recA_BamHI.2' und 'recA_NotI' und einer Elongationszeit von 60 s gewonnen werden (B5), während die Kontrollen J34f-2 (B3) und der bei 30 °C angezogene Stamm J34f-2[pGhrecA_Nicht-Int] (B4) Produkte generierten. M: DNA Ladder 1 kb (AppliChem).

Nachdem eine Integration nachgewiesen war, wurden die *recA*-Integrante und die Kontrolle J34f-2[pGhrecA_Nicht-Int] mit $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ MMC behandelt. Während sich der Phage aus der bei 30 °C kultivierten Kontrolle induzieren ließ, zeigte die Kultur mit der Integration nur eine leichte Stagnation im Wachstum (Abb. 48). Im Überstand der Kontrolle konnten mittels Plaquetest auf J346-f 4×10^2 PbE ml^{-1} detektiert werden, die im Überstand der Integranten nicht auftraten.

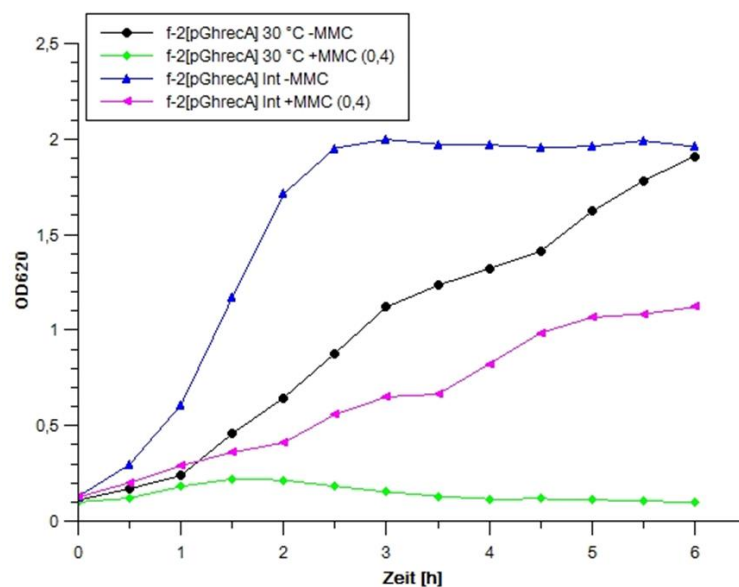


Abb. 48. Induzierbarkeit des Prophagen aus der *recA*-Knockout-Mutanten *S. thermophilus* J34f-2 durch $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ MMC im Vergleich zum Prophagen aus J34f-2[pGhrecA-Nicht-Int], die bei 30 °C kultiviert wurden. Je 5 ml thLM17 zuzüglich $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Em wurden 1%ig angeimpft und bei einer OD_{620} 0,2 mit $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ MMC versetzt. Die OD_{620} wurde alle 30 min gemessen und die Mittelwerte aus drei Ansätzen zur Kurvenerstellung berechnet.

5 Diskussion

5.1 Transkripte im Lysogeniemodul generiert durch P_{ltp} und P_{int}

Die Regulation von Genen ist essentiell für die Anpassung sowohl von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen, als auch von Phagen an ihre Umwelt. Der Entwicklungszyklus tempererter Phagen wird durch die Transkription lysogener und lytischer Gene, die im Lysogeniemodul in Operons organisiert sind, reguliert. Als Startpunkte für deren Transkription verfügen Phagen wie Bakterien über Promotoren, die von einer Wirts-RNA-Polymerase oder einer eigenen, erkannt werden. Divergent orientierte, frühe Promotoren wie P1 und P2 des Phagen TP-J34 bilden das Grundelement jedes genetischen Schalters (Madsen *et al.*, 2001). Die Detektion unterschiedlicher mRNA-Transkripte aus dem TP-J34-Lysogeniemodul durch *Northern Blots* und RT-PCR ließ neben den frühen Promotoren P1 und P2 zusätzlich Promotoren für die Gene *ltp* und *int* vermuten (Mohamed, 2010). Zur Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte wurde erfolgreich intakte Gesamt-RNA aus dem lysogenen Stamm *S. thermophilus* J34f-2 isoliert. Die Integrität der RNA war anhand der scharfen Banden und der etwa doppelt so starken Intensität der 23S rRNA-Bande im Vergleich zur 16S rRNA-Bande zu erkennen. Die -10- und -35-Regionen des P1-Promotors konnten nach Lokalisierung des Transkriptionsstartpunktes auf dem 380 bp großen PCR-Produkt aufgrund der guten Konsensussequenzen leicht ermittelt werden. Die Lokalisierung des P2-Promotors wurde ausgespart, da dessen Konsensussequenzen nahezu identisch zu denen des P1-Promotors waren, nur in entgegengesetzte Richtung weisend (Abb. 49).

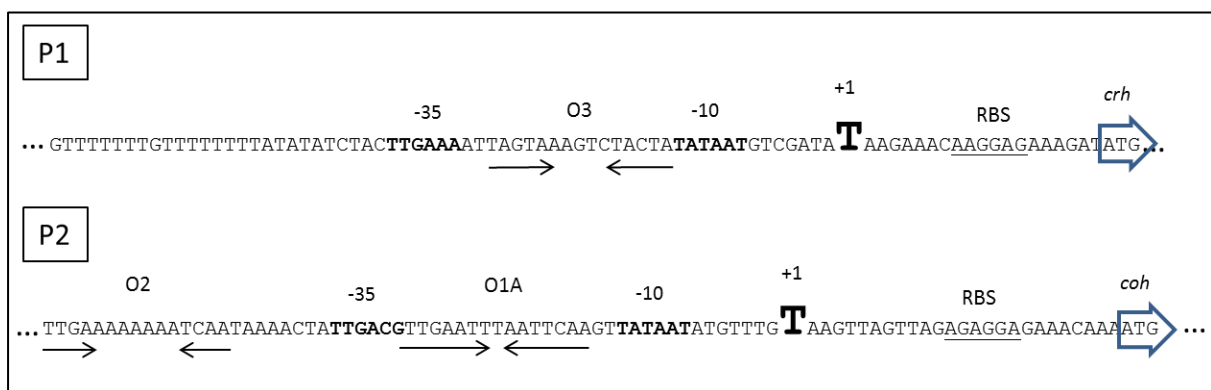


Abb. 49. Genetische Schalterregion in der intergenen Region von *crh* und *coh* mit den divergent orientierten Promotoren P1 und P2 (5' → 3'). Promotor P1 wird von Operator O3 überlappt und Promotor P2 von Operator O1A. Die Konsensussequenzen (-10/-35) beider Promotoren sind nahezu identisch (vgl. Tab. 30). Die Transkriptionsstartpunkte (+1) und Ribosomenbindestellen (RBS) sind angegeben.

Starke Promotoren zeichnen sich durch Adenin-Thymin-reiche Sequenzen im Bereich vor dem Transkriptionsstartpunkt aus, da diese die Aufspaltung der DNA-Doppelhelix während

der Transkription erleichtern (Tang *et al.*, 2005). Außerdem zeigen starke Promotoren eine hohe Übereinstimmung mit der abgeleiteten Konsensussequenz aus *E. coli*. Der optimale Abstand zwischen der -10- und der -35-Region beträgt dabei 17 ± 1 nt, was einer Länge von ca. zwei DNA-Helixwindungen entspricht (Munk, 2010). Alle diese Kriterien werden von den Promotoren P1 und P2 erfüllt (Tab. 30).

Tab. 30. Vergleich der Promotor-Strukturen von P1, P2, P_{ltp} und P_{int} mit *E. coli*-Konsensussequenzen.

	P1	P2	P _{ltp}	P _{int}	<i>E. coli</i>
-35-Region (5' → 3')	TTGAAA	TTGACG	TACAAA	AAGCCC	TTGACA
-10-Region (5' → 3')	TATAAT	TATAAT	AAATTT	GACAAT	TATAAT
Übereinstimmung mit <i>E. coli</i>	92 %	92 %	67 %	50 %	-
Transkriptionsstartpunkt (+1)	T	T	G	T	A
Abstand +1 ↔ -10	7 nt	7 nt	5 nt	6 nt	5 - 9 nt
Abstand -10 ↔ -35	17 nt	17 nt	20 nt	16 nt	17 ± 1 nt
Aktivität im lysogenen Zustand	Ja	Nein	Ja	Ja	-
Aktivität im lytischen Zustand	Ja	Ja	Ja	Ja	-

Als starke Promotoren gewährleisten P1 und P2 eine optimale Bindung der Wirts-RNA-Polymerase und ermöglichen auf diese Weise einen häufigen Start der Transkription. Ob beide Promotoren gleichwertig sind und deswegen nach der Injektion der TP-J34-DNA gleich stark abgelesen werden, ist bisher nicht bekannt. Die Transkription wird jeweils durch einen Terminator, der eine Haarnadelstruktur (*stem-loop structure*) in der RNA bildet, beendet (Mohamed, 2010). Die Länge des mRNA-Transkripts der Gene *crh*, *rir* und *ltp* vom Transkriptionsstart bis zum Ende des Terminators wurde auf 1.322 nt berechnet. Für das *coh-ant-orf7-orf8-orf9*-Transkript wurde durch einen *Northern Blot* mit einer *ant*-Sonde eine Länge von etwa 1.900 nt bestimmt (Mohamed, 2010). Das Transkript reicht bis zu einer Terminatorsequenz *downstream* von *orf9*. Mit Hilfe von *Northern Blots* und RT-PCR wurde im lysogenen und induzierten Zustand außerdem ein monocistronisches *ltp*-Transkript und ein *int*-Transkript detektiert (Mohamed, 2010). Durch Einsatz der *5'RACE-PCR* konnten die Transkriptionsstartpunkte am 5'-Ende der Gene lokalisiert werden. Die zu diesem Zweck generierten DNA-Fragmente konnten erst durch die zweite PCR in geringer Menge gewonnen werden, was an einer gehemnten Bindung der GSP durch die postulierten Sekundärstrukturen (in diesem Fall Terminatorstrukturen) in der mRNA liegen könnte (*Troubleshooting* Thermo Fisher Scientific). Die Größe des P_{ltp}-Fragments passte zu den berechneten 188 bp, wohingegen das P_{int}-Fragment mit unter 100 bp eine geringere Größe als die erwarteten 153 bp zeigte (vgl. Abb. 17). Dies könnte auf eine Instabilität des *int*-Transkripts oder der cDNA zurückzuführen sein. Die Schwierigkeit ein PCR-Produkt zu generieren könnte auch damit zusammenhängen,

dass mehrere Transkripte detektiert wurden (Mohamed, 2010). Die Transkriptionsstartpunkte lagen in den postulierten Terminatorstrukturen der intergenen Region von *rir* und *ltp* bzw. von *ltp* und *int* (vgl. Abb. 18). Für die zugehörigen Promotorregionen (-10, -35) von P_{ltp} konnte nur für die -10-Region eine moderate Sequenz gefunden werden, während für P_{int} keine hinreichend guten Konsensussequenzen (Tab. 30) identifiziert werden konnten. Dies könnte eine Erklärung für die schwache Transkription von *int* sein (Mohamed, 2010).

Die Länge des *ltp*-Transkripts wurde aufgrund der Terminatorsequenz im *downstream*-Bereich des *ltp*-Gens auf 524 nt geschätzt. Diese Größe stimmte mit dem *Northern Blot*-Produkt nach Mohamed überein, der 550 nt postulierte (Mohamed, 2010). Bei P_{ltp} handelt es sich um einen Subpromotor oder Tandempromotor, da er im Transkriptionsbereich des Promotors P1 liegt. Der DNA-Abschnitt, der das *ltp*-Gen samt Promoter und Terminator umfasst, könnte als ein sogenanntes Moron (zusätzliches Gen eines Prophagen ohne Bedeutung für den lysogenen Zyklus) mittels horizontalem Gentransfer in das Genom von TP-J34 integriert worden sein (Ali *et al.*, 2014). Ein solcher Fall wurde für den Phagen HK97 beschrieben (Cumby *et al.*, 2012). Ein eigener Promotor für das Zink-Metalloprotease-Motiv-Gen wurde ebenfalls bei Sfi21 beschrieben (Ventura *et al.*, 2002), dessen intergene Region 96 % Übereinstimmung mit der von TP-J34 aufweist. Ein Terminator in der intergenen Region des *sie*-vermittelnden Gens und *int* kommt ebenfalls bei anderen Phagen vor (Riipinen *et al.*, 2007). Dieser Terminator markiert das Ende der *crh-rir-ltp*- und *ltp*-Transkripte und bedingt das Vorhandensein eines neuen Transkriptionsstartpunkts für *int* gegeben durch P_{int} . Das *int*-Transkript läuft weit in das Genom von TP-J34 hinein und besitzt eine geschätzte Größe von 1.800 nt (Mohamed, 2010). Da Terminatorstrukturen gefunden wurden, kann von einer Rho-unabhängigen Termination, wie sie auch bei Sfi19 beschrieben wurde, ausgegangen werden (Ventura und Brüssow, 2004). Der *int*-Promotor des Phagen λ liegt unmittelbar *downstream* einer Terminatorsequenz (Benedik *et al.*, 1983). Er wird durch das CII-Protein im lysogenen Zustand aktiviert. Ob die Promotoren P_{ltp} und P_{int} ebenfalls einer Regulierung durch Proteine aus dem TP-J34-Lysogeniemodul unterliegen, wurde bisher nicht untersucht. Allerdings gibt es einen Hinweis dafür, dass Rir eine Rolle bei der Regulation von P_{int} spielt (Mohamed, 2010). Im Gegensatz zu Promotor P1 und P2 werden die Promotoren P_{ltp} und P_{int} nicht über Operatoren reguliert.

5.2 Aufreinigung aktiver TP-J34-, *S. thermophilus* J34f-2- und *E. coli*-Proteine

Die Aufreinigung aktiver Proteine bildete die Grundlage für die meisten Versuche in dieser Arbeit. Sie erfolgte über den Protein-tag GST kodiert in pGEX-6P-1. Die Größe der meisten mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteine stimmte mit der von ihrer Sequenz abgeleiteten, theoretischen überein. Crh* und GST-LexA wiesen ein von der theoretischen Größe leicht abweichendes Laufverhalten in der SDS-PAGE auf: Crh* lief zu hoch, während GST-LexA zu niedrig lief. Ein von der theoretischen Größe abweichendes Laufverhalten in einer SDS-PAGE wird oft mit dem isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins in Zusammenhang gebracht. Basische Proteine (hoher pI) würden demnach langsamer laufen. Für das Laufverhalten von GST-Crh und GST-LexA ist dies keine Erklärung, da beide Proteine einen relativ niedrigen pI besitzen. In allen Eluaten mit GST-Proteinen tauchten neben einer Hauptbande, die das gewünschte Fusionsprotein bildete, zusätzlich kleinere Banden auf. Diese wurden teilweise im *Western Blot* durch den GST-Antikörper detektiert. Wie von den Herstellern GE Healthcare und Macherey-Nagel beschrieben (*Troubleshooting*), könnten diese durch Proteolyse der Fusionsproteine entstanden sein, da keine Proteasehemmer verwendet wurden. Diese hätten ebenfalls die proteolytische Aktivität von RecA und Rir gehemmt und viele Versuche inhibiert. Weiterhin kann das GST-Protein selbst instabil sein (*Troubleshooting* Thermo Fisher Scientific). Eine Proteolyse im Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) kann hingegen weitgehend ausgeschlossen werden, da es sich um einen Protease-defizienten Stamm handelt (Ratelade *et al.*, 2009). Eine unzureichende Waschung der Säule zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine könnte ebenfalls ein Grund für zusätzliche Banden sein. Bei GST-LexA und GST-HdiR entstanden Proteine auf Höhe derer, die durch eine Autoproteolyse zwischen Alanin und Glycin entstehen würden. Bei Rir* und GST-Rir* war eine Instabilität in Form von mehreren Spaltprodukten zu beobachten (s. Diskussion 5.5). Alle aufgereinigten Proteine zeigten eine biologische Aktivität.

5.3 Crh und Coh bilden die Repressoren im Lysogeniemodul

In der Aminosäuresequenz der Proteine Crh und Coh wurden N-terminal gelegene HTH-Motive lokalisiert, die bekanntermaßen als DNA-Bindedomäne agieren (Neve *et al.*, 1998; Rohs *et al.*, 2010). Diese Eigenschaft und ihre Position direkt *downstream* der Promotoren P1 und P2 ließen vermuten, dass es sich um die Repressoren des genetischen Schalters im Lysogeniemodul von TP-J34 handelt. Die inhibierte Induzierbarkeit des Prophagen in *gst-crh*-

exprimierenden *S. thermophilus* J34f-2 (4.7) war ein eindeutiger Beweis dafür, dass Crh als Repressor für die Etablierung und Aufrechterhaltung des lysogenen Zustands verantwortlich ist. Mit Hilfe von Wettbewerbsassays wurden die genauen Bindestellen (Operatoren) der beiden Proteine im Lysogeniemodul lokalisiert. Crh* konnte an alle vier postulierten Operatoren O1A, O1B, O2 und O3 binden, während Coh* nur an O3 in der P1-Promotorregion binden konnte. Die Entstehung mehrerer Protein-DNA-Komplexe bei höheren Proteinkonzentrationen im EMSA (vgl. Abb. 29) kann mit einer „Sandwichbildung“ eines Proteinoligomers mit zwei DNA-Molekülen erklärt werden (Papp *et al.*, 2002). Coh formte im EMSA nur einen Komplex, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass das Protein keine Dimere bilden kann. Die Wettbewerbsassays offenbarten, dass die Bindungsaffinität von Crh* zu den einzelnen Operatoren unterschiedlich stark ist (vgl. Abb. 31). Aufgrund der ähnlichen, jedoch nicht identischen Operator-Sequenzen mit mehr oder weniger vollständigen *inverted repeats*, war dieses Ergebnis zu erwarten (Abb. 50).

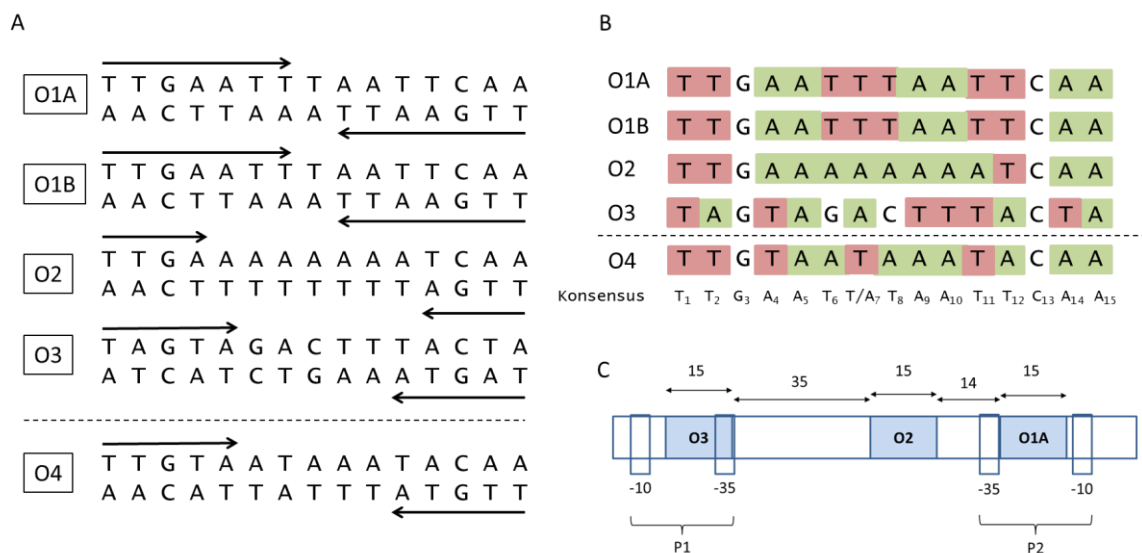


Abb. 50. Sequenzvergleich der Operatoren O1A, O1B, O2, O3 und des nicht-gebundenen Operators O4 in 5' → 3'-Richtung im Lysogeniemodul von TP-J34. Die 15 bp langen Sequenzen sind AT-reich und besitzen mehr oder weniger vollständige Symmetrien (*inverted repeats*), die durch die Länge der Pfeile dargestellt sind (A). Die Basenverteilung in den Operatoren führt zur einer Konsensussequenz von TTGAATT/ATAATTCAA (B). Abstände zwischen den Operatoren O1A, O2 und O3 angegeben in bp (C).

Während O1A und O1B ein fast vollständiges Palindrom bilden, formen die Sequenzen von O2 und O3 ein weniger perfektes Palindrom. Das Thymin an zweiter Position sowie das Adenin an vierter Position in den Operatorsequenzen O1A, O1B und O2 scheinen ein Ausschlusskriterium für die Bindung von Coh zu sein (Abb. 50). Für die Bindung von Crh scheinen die ersten vier Basen essentiell zu sein. Die Affinität von Crh* zu den Operatoren O1A und O1B war stärker, als die zu O2 und O3. Geschlussfolgert wurde dies daraus, dass die

Operatoren O1A und O1B bereits bei niedrigeren Crh*-Konzentrationen gebunden wurden als O2 und O3 (vgl. Abb. 31). Aus diesen Erkenntnissen konnte folgende Gleichung für die Affinitätsverhältnisse im TP-J34-Lysogeniemodul aufgestellt werden:

$$O1A = O1B > O2 = O3$$

Wahrscheinlich hemmt Crh in erster Linie den Promotor der lytischen Gene durch Bindung an O1A und reguliert bei höheren Konzentrationen die eigene Transkription und die des *rir* sowie *ltp* ausgehend von Promoter P1 über die Bindung an O3. Es kann von einer kooperativen Bindung von O1A und O1B ausgegangen werden, da beide Operatoren identische Sequenzen besitzen und somit eine gleich starke Affinität von Crh für sie vorliegen dürfte. Einen Hinweis für eine kooperative Bindung der Operatoren O1A und O2 lieferte ein Kompetitionsassay (vgl. Abb. 32) und der geringe Abstand der beiden Operator-Zentren von 28 bp (Abb. 50), der etwa 2,6 Helixwindungen entspricht. Ein solch geringer Abstand wurde bereits bei anderen Phagen als Voraussetzung für eine kooperativen Bindung angegeben (Das *et al.*, 2007). Ein weiteres Indiz für eine kooperative Bindung von Operatoren lieferte die Bildung von Crh-Dimeren, -Tetrameren und höher organisierten Oligomeren (Koberg Diplomarbeit, 2012). Kooperative Bindungen werden durch die Oligomerisierungsfähigkeit des Repressors ermöglicht und wurden vielfach bei temperenten Phagen beschrieben (Griffith *et al.*, 1986; García *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 2010). Typischerweise agieren Repressoren als Homodimere (Donner *et al.*, 1997), indem ein Monomer an jede Hälfte des Operators bindet. Nur wenige Repressoren zeigen keine Kooperativität (Bullwinkle *et al.*, 2012). In einigen Fällen kann die kooperative Bindung zur Bildung einer DNA-Schleife (*loop*) führen. Bei TP-J34 würde die kooperative Bindung von O1A, O1B und O2 durch ein Crh-Hexamere vermutlich eine Schleifenbildung ähnlich wie bei dem temperenten *L. lactis* Phagen TP901-1 hervorrufen (Abb. 51).

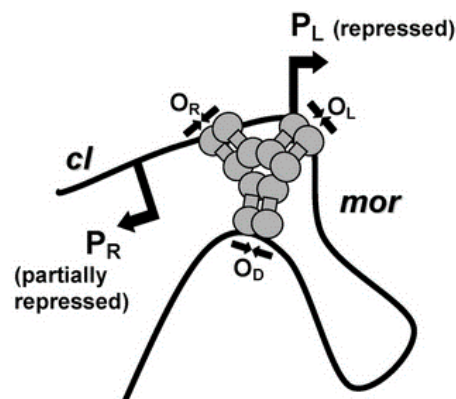


Abb. 51. Bildung einer DNA-Schleife durch kooperative Bindung der Operatoren O_R, O_L und O_D durch ein CI-Repressor-Hexamere in TP901-1 (Pedersen *et al.*, 2010). Für die kooperative Bindung von O1A, O1B und O2 durch Crh im Lysogeniemodul von TP-J34 könnte ein ähnliches Szenario postuliert werden.

Diese würde wie bei TP901-1, dem *Lb. casei* Phagen A2 und λ zur Verdrängung der RNA-Polymerase vom Promotor der lytischen Gene führen. Mutmaßlich wird auf diese Weise eine vollständige Repression des P2-Promotors gewährleistet. Gleichzeitig könnte Crh durch die Bindung an Operator O3 seine eigene Transkription regulieren, ein Phänomen was als Autoregulation bezeichnet wird und u. a. auch beim Phagen λ beschrieben wurde (Michalowski und Little, 2005). Eine Autoregulation gewährleistet eine ideale Balance der Repressorkonzentration, um einen lysogenen Zustand aufrecht zu erhalten und gleichzeitig schnell auf induzierende Signale zu reagieren (Auchtung *et al.*, 2007). Weitere Parallelen zum Phagen λ bestehen in den unterschiedlichen Affinitäten von CI und Cro zu den Operatoren (Little *et al.*, 1999) und in der kooperativen Bindung von CI (Babic und Little, 2007). Die Bindungsaffinität des Coh-Proteins schien schwächer zu sein, als die des Crh, was an der höheren erforderlichen Proteinkonzentration im EMSA zur Bindung von DO1A und der größeren Oligonukleotidmenge zur Kompetiton im Kompetitionsassay erkennbar war. Es gibt grundsätzlich zwei Arten wie ein Cro-ähnlicher Repressor agiert. Zum einen gibt es Repressoren, die eine DNA-Bindeaktivität aufweisen und den Promotor der lysogenen Gene reprimieren und zum anderen Repressoren, die direkt mit dem Repressor der lytischen Gene interagieren, sogenannte Antirepressoren. Zu diesen zählt das Cro-Äquivalent (*orf75-Gp*) des temperenten *S. thermophilus* Phagen Sfi21 (Bruttin *et al.*, 2002) und der *modulator of repression* (MOR) des *L. lactis* Phagen TP901-1 (Alsing *et al.*, 2011). Cro-homologe Repressoren mit keiner direkten Antirepressor-Funktion wie Coh, die an den Operator im *upstream*-Bereich des Repressors lytischer Gene binden, wurden vielfach beschrieben (Hammerl *et al.*, 2015; Ladero *et al.*, 1998). Coh ist offensichtlich an der Festlegung des lytischen Zyklus beteiligt, indem er Crh antagonisiert. Anders als z. B. Cro des Phagen λ scheint Coh aber nicht der alleinige, für die Prophagen-Induktion entscheidende Faktor zu sein, denn dessen Bindung an Operator O3 führt nicht zu einer vollständigen Repression des P1-Promotors. Transkriptionsanalysen zeigten, dass die Menge des *crh-rir-ltp*-Transkripts ausgehend von Promotor P1 nach Induktion zunächst zunimmt, um dann wieder abzunehmen (Mohamed, 2010). Der Anstieg könnte durch ein Wegfallen der Crh-Autoregulation und die Abnahme durch Repression des P1-Promotors durch Coh begründet sein. Coh scheint weniger essentiell für die Induktion zu sein, als mehr eine Rolle bei der Entscheidung lysogene vs. lytische Entwicklung bei der Infektion zu spielen. Damit der lytische Zyklus eingeleitet werden kann, muss der Repressor Crh an der Operatorbindung gehindert werden, indem er inaktiviert wird.

5.4 RecA-abhängige Induktion des Prophagen TP-J34 ohne RecA-katalysierte Autoproteolyse des Repressors

Viele Prophagen werden spontan oder durch Umweltreize mit DNA-schädigender Wirkung aus ihrer Wirtszelle induziert (Nanda *et al.*, 2014). Letztere aktivieren die SOS-Antwort der Wirtszelle, deren Regulator RecA die Autoproteolyse des Prophagen-Repressors anregt und die lytische Entwicklung einleitet (Galkin *et al.*, 2009; Fornelos *et al.*, 2011; Nanda *et al.*, 2014). Proteine, die RecA in Struktur und Funktion ähneln, kommen in allen Lebensformen vor (Patel *et al.*, 2010). Die Autoproteolyse durch RecA wird bei den meisten Repressoren an einer Alanin-Glycin-Stelle in der Dimerisierungsdomäne stimuliert (Roberts und Roberts, 1975; McCabe *et al.*, 2005). Es wurden aber auch Cystein-Glycin- (Eguchi *et al.*, 1988) und Leucin-Glycin-Stellen (Koudelka *et al.*, 2004) gefunden und bei nicht aus Phagen stammenden Repressoren wurden Phenylalanin-Methionin- (Bose *et al.*, 2008) und Leucin-Arginin-Stellen (Ludanyi *et al.*, 2014) beschrieben. Eine Übersicht von Repressoren mit und ohne Ala/Gly-Stelle zeigt Tabelle 31.

Tab. 31. Repressoren mit und ohne Ala/Gly-Stelle.

Name	Phage	Wirt	Größe	Ala/Gly	Spaltung	Referenz
CI	λ	<i>E. coli</i>	237	ja	Ala/Gly	Roberts und Roberts, 1975
CI	434	<i>E. coli</i>	95	ja	Ala/Gly	McCabe <i>et al.</i> , 2005
C2	P22	<i>Salmonella</i>	216	ja	Ala/Gly	Sauer <i>et al.</i> , 1982
FsoR	Fels-1	<i>Salmonella</i>	231	ja	ja	Lemire <i>et al.</i> , 2011
ORF297	BK5-T ¹	<i>L. lactis</i>	297	ja	n. n.	Boyce <i>et al.</i> , 1995
Rro	r1t ¹	<i>L. lactis</i>	278	ja	n. n.	Nauta <i>et al.</i> , 1996
CI	Tuc2009 ¹	<i>L. lactis</i>	286	ja	n. n.	Kenny <i>et al.</i> , 2006
CI	A2 ¹	<i>Lb. casei</i>	224	ja	n. n.	Ladero <i>et al.</i> , 1998
CI	Phi11	<i>S. aureus</i>	239	ja	n. n.	Das <i>et al.</i> , 2007
CI	Phi80	<i>E. coli</i>	236	nein	Cys/Gly	Eguchi <i>et al.</i> , 1988
CI	Phi186	<i>E. coli</i>	192	nein	nein	Shearwin <i>et al.</i> , 1998
CI	933W	<i>E. coli</i>	235	nein	Leu/Gly	Koudelka <i>et al.</i> , 2004
CB	N15	<i>E. coli</i>	203	nein	n. n.	Lobocka <i>et al.</i> , 1996
GfoR	Gifsy-1	<i>Salmonella</i>	136	nein	nein	Lemire <i>et al.</i> , 2011
GfhR	Gifsy-2	<i>Salmonella</i>	138	nein	nein	Lemire <i>et al.</i> , 2011
Rep	SPC32H	<i>Salmonella</i>	198	nein	nein	Kim und Ryu, 2013
CB	PhiKO2	<i>Kleb. oxytoca</i>	202	nein	n. n.	Hammerl <i>et al.</i> , 2016
CI	TP901-1 ²	<i>L. lactis</i>	180	nein	nein	Pedersen <i>et al.</i> , 2010
CI	O1205 ²	<i>S. therm.</i>	134	nein	n. n.	Stanley <i>et al.</i> , 1997
CI	Sfi21 ²	<i>S. therm.</i>	127	nein	n. n.	Madsen <i>et al.</i> , 2001
Crh	TP-J34 ²	<i>S. therm.</i>	121	nein	nein	diese Arbeit
CI	TP-778	<i>S. therm.</i>	121	nein	n. n.	Ali <i>et al.</i> , 2014
ORF	TP-DSM20617	<i>S. therm.</i>	116	nein	n. n.	Ali <i>et al.</i> , 2014
Cpg	g1e ²	<i>Lb. plantarum</i>	132	nein	n. n.	Kakikawa <i>et al.</i> , 2000
Rad	adh ²	<i>Lb. gasseri</i>	108	nein	n. n.	Engel <i>et al.</i> , 1998

ImmR	ICEBsI*	<i>B. subtilis</i>	127	nein	Phe/Met	Bose <i>et al.</i> , 2008
DdrO	-	<i>D. deserti</i>	129	nein	Leu/Arg	Ludanyi <i>et al.</i> , 2014

Die Größe der Repressoren ist in Aminosäuren angegeben; weiß: Repressoren mit Ala/Gly-Stelle, grau: Repressoren ohne Ala/Gly-Stelle; ¹ Klasse-I-Repressoren und ² Klasse-II-Repressoren von Milchsäurebakterien-Phagen nach Wood und Warner, 2003; * mobiles genetisches Element; n. n.: nicht nachgewiesen

Alternative Induktionsstrategien, bei denen der Repressor nicht (Shearwin *et al.*, 1998; Pedersen *et al.*, 2010; Lemire *et al.*, 2011), oder nicht direkt durch RecA degradiert wird, was bisher nur bei bakteriellen Repressoren beschrieben wurde, sind bekannt. Hier findet die Inaktivierung durch Antirepressoren statt (Shearwin *et al.*, 1998), die teilweise durch LexA reguliert werden, welches wiederum durch RecA kontrolliert wird (Lemire *et al.*, 2011; Kim und Ryu, 2013). *S. thermophilus* besitzt kein LexA-Homologon (Giliberti *et al.*, 2006), aber ein Protein mit LexA-ähnlicher Funktion. Dieser *heat and DNA damage inducible regulator* (HdiR) wird bekanntermaßen in *S. uberis* und *L. lactis* analog zu LexA durch ein RecA-Homologon aus der SOS-Antwort zur Autoproteolyse zwischen Alanin und Glycin angeregt (Savijoki *et al.*, 2003; Varhimo *et al.*, 2007). Eine Proteolyse von HdiR durch RecA in *S. thermophilus* wurde bisher nicht untersucht und konnte erstmals in dieser Arbeit nachgewiesen werden. HdiR verwirklicht seine regulatorische Funktion in *S. uberis* durch Bindung mehrerer Operatoren (Varhimo *et al.*, 2007). Ein direkter Einfluss von HdiR auf die Transkription der Antirepressoren durch Bindung in der genetischen Schalterregion von TP-J34 und damit eine Funktion ähnlich der LexA-Repressoren bei der Induktion der Phagen SPC32H, N15 und Phi186 konnte durch EMSA ausgeschlossen werden. Als Kontrolle einer erfolgreichen Aktivierung der RecA-Proteasen, wurden der *E. coli* LexA-Repressor und HdiR ebenfalls N-terminal mit einem GST-tag fusioniert. Der 229 aa große Regulator HdiR besitzt ein N-terminales HTH-Motiv, das zur DNA-Bindung dient und eine C-terminale Dimerisierungsdomäne, die dem LexA-Repressor homolog ist. In der Dimerisierungsdomäne liegt die RecA-induzierte, autokatalytische Spaltstelle zwischen Alanin und Glycin an Position 116 und 117 (vgl. Abb. 64 im Anhang). Durch die RecA-katalysierte Autoproteolyse an diesen spezifischen Stellen werden die beiden Domänen des Repressors voneinander getrennt, wie es für *E. coli* LexA schematisch gezeigt ist (Abb. 52).

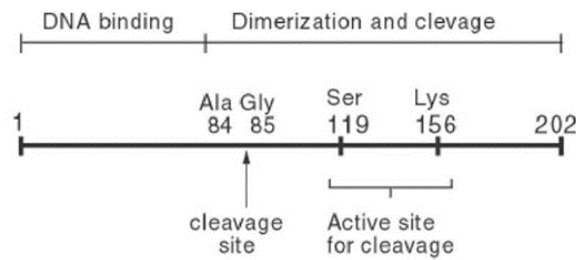


Abb. 52. Schematischer Aufbau des LexA-Repressors aus *E. coli*. Der Repressor ist wie die Repressoren von Prophagen durch eine Verbindungsregion in zwei funktionelle Domänen aufgeteilt: Eine N-terminale DNA-Bindedomäne und eine C-terminale Dimerisierungsdomäne mit integrierter RecA-Spaltstelle zwischen Ala₈₄ und Gly₈₅ (Pfeil). Die für die Spaltung katalytisch aktiven Stellen Ser₁₁₉ und Lys₁₅₆ sind ebenfalls dargestellt (Quelle: <http://what-when-how.com/molecular-biology/lexa-repressor-molecular-biology/>).

Die theoretische Größe der Spaltprodukte, die durch Autoproteolyse zwischen Alanin und Glycin entstehen, wurde für GST- Δ LexA auf 36 kDa und für Δ LexA auf 13,2 kDa mittels *ProtParam* bestimmt. Die der Spaltprodukte GST- Δ HdiR und Δ HdiR von HdiR wurde auf 40,2 kDa bzw. 13,05 kDa bestimmt. Diese stimmten mit den Größen der Spaltprodukte auf den SDS-PAGE überein. Einem HdiR-Fragment mit ungefähr 18 kDa Größe konnte keine entsprechende Spaltstelle in der Aminosäuresequenz zugeordnet werden. In einer Kreuzreaktion, bei der GST-RecA aus *S. thermophilus* J34 mit GST-LexA aus *E. coli* bzw. RecA aus *E. coli* mit GST-HdiR aus J34f-2 inkubiert wurde, zeigte sich das identische Spaltmuster der Proteine, jedoch war die Spaltung weniger effizient. Die beiden Rekombinasen besitzen 60 % Homologie und könnten aus diesem Grund auch mit den jeweils anderen Repressoren interagieren, denen der Besitz einer Ala-Gly-Stelle und der katalytisch aktiven Aminosäuren Serin und Lysin gemein ist. Das Ergebnis wäre ein Beweis für den konservierten Charakter von RecA in Bakterien (Karlin und Brocchieri, 1996). Der Repressor Crh wurde weder *in vitro* durch die aktivierten Proteine RecA (NEB) und GST-RecA noch *in vivo* durch Aktivierung der SOS-Antwort in *S. thermophilus* J34f-2 zur Autoproteolyse angeregt, denn es traten keine Spaltprodukte auf. Repressoren, die einer RecA-induzierten Autoproteolyse unterliegen, zeigen auch eine Autoproteolyse bei alkalischen pH-Werten ($\geq 10,3$) ohne Einfluss von RecA (Little, 1984). Für ImmR wurde keine Autoproteolysefähigkeit postuliert (Bose *et al.*, 2008) und auch für den Repressor Crh konnte keine Autoproteolyse durch einen alkalischen pH-Wert nachgewiesen werden (4.7). Bei saurem und neutralem pH 4,6 und 7,6 wiesen die Ansätze mit GST-Crh und GST-LexA ein Spaltprodukt von etwa 25 kDa auf, das auf dem *Western Blot* durch den GST-Antikörper gebunden wurde und auf eine vom Hersteller beschriebene Instabilität von GST-Fusionsproteinen zurückzuführen sein könnte. Diese trat ebenfalls

bei der Aktivierung von GST-RecA in 1x RecA-Puffer mit pH 7,6 auf (vgl. Abb. 66, Anhang). Auch hier konnte das Spaltprodukt im Blot mit dem Antikörper nachgewiesen werden. Aufgrund der Größe des Spaltprodukts und der Aktivität von RecA wurde von einer Spaltung in der Region zwischen dem N-terminalen GST-Protein und dem fusionierten Protein ausgegangen. Bei einem pH-Wert von 10,6 verschwand GST-LexA erwartungsgemäß durch Autoproteolyse zwischen Ala84 und Gly85 analog zur katalysierten Autoproteolyse durch *E. coli* RecA (vgl. Abb. 42 mit Abb. 44).

Die Induktion des TP-J34-Prophagen ist RecA-abhängig. Ein Indiz dafür lieferte die Induzierbarkeit des Prophagen durch MMC und UV-Strahlung (Neve *et al.*, 2003), bei der die SOS-Antwort von *S. thermophilus* J34 aktiviert wird. Allgemein wird die Induzierbarkeit von Prophagen auf diese Weise als Beweis für eine proteolytische Inaktivierung des Repressors während der SOS-Antwort anerkannt (Boyce *et al.*, 1995; Ladero *et al.*, 1998; Banks *et al.*, 2003). Ein weiterer Beweis für diese Hypothese war die Nicht-Induzierbarkeit von TP-J34 in *recA-Knockout*-Mutanten von *S. thermophilus* J34f-2 (4.8). Wood und Warner beschrieben zwei Klassen von Repressoren bei Milchsäurebakterien-Phagen (Wood und Warner, 2003; Fox, 2004): Klasse-I-Repressoren zeichnen sich durch eine Größe von 220 bis 300 aa und ein Ala/Gly-Motiv in der C-terminalen Domäne zur RecA-vermittelten Autoproteolyse aus. Klasse-II-Repressoren, zu denen Crh gezählt wird, sind kleiner und weisen keine RecA-Spaltstelle auf. Die Induktion der Phagen mit diesen Repressoren ist vermutlich trotzdem RecA-abhängig. Diese Gruppe von Repressoren kommt typischerweise bei *S. thermophilus* Phagen vor, während Klasse-I-Repressoren eher bei Laktokokken-Phagen zu finden sind (Fox, 2004) (vgl. Tab. 31).

5.5 Rir besitzt eine Antirepressor-Funktion

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse verschiedener Versuche konnte von einer Interaktion zwischen der putativen Zink-Metalloprotease Rir und dem Repressor Crh ausgegangen werden. Rir* blockierte die Bindung des Repressors an die Operatoren durch Bildung eines Komplexes mit dem Repressor-Monomer in Lösung (4.5). Die Bindung durch Rir könnte somit die Dimerbildung des Repressors, die für die Operatorbindung essentiell ist, verhindern. DNA-gebundenes Crh* konnte durch Rir* nicht gebunden werden. Ein solcher Komplex wäre durch einen höheren *shift* in den Kompetitionsassays (vgl. Abb. 33) sichtbar geworden. Auch konnte Rir* bestehende Crh*-DNA-Komplexe nicht auflösen. Da Rir* selbst keine DNA-Bindefunktion besaß, konkurrierte es nicht mit Crh* um die Bindestellen (4.4). Infolge seiner

Repressor-antagonistischen Wirkung wurde Rir die Funktion eines Antirepressors zugesprochen und von ehemals ORF3 in Repressor-inaktivierender Regulator (Rir) umbenannt. Eine Antirepressor-Funktion besitzen auch das Cro-ähnliche-Protein des *S. thermophilus* Phagen Sfi21 (Bruttin *et al.*, 2002), das MOR-Protein des *L. lactis* Phagen TP901-1 (Alsing *et al.*, 2011), das Tum-Protein des Coliphagen 186 (Shearwin *et al.*, 1998), das Ant-Protein des *Salmonella* Phagen SPC32H (Kim und Ryu, 2013), die Proteine GfoA und GfhA der *Salmonella* Phagen Gifsy-1 bzw. -2 (Lemire *et al.*, 2011) und das AntC-Protein des Coliphagen N15 (Mardanov und Ravin, 2007). Diese Antirepressoren werden in gegensätzliche Richtung zum Repressor transkribiert (Cro, MOR) oder liegen in weit entfernten Operons, wo sie durch LexA-homologe Proteine reguliert werden (Ant, Tum, GfoA, GfhA und AntC). Im Gegensatz dazu liegt *rir* im TP-J34-Lysogeniemodul direkt *downstream* des Repressors und wird ausgehend von Promotor P1 mit diesem in einem Operon transkribiert. Folglich müssten simultan gleich viele Moleküle Crh und Rir gebildet und Crh auch im lysogenen Zustand durch Rir inhibiert werden. Gründe für eine nicht ständig erfolgende Induktion des Prophagen könnte eine unterschiedliche post-transkriptionale Prozessierung von Rir und Crh sein. Weiterhin könnte Rir durch Komponenten im lysogenen Zustand inaktiviert oder gehemmt werden bzw. könnte das inaktive oder wenig aktive Rir durch Komponenten der SOS-Antwort (vornehmlich RecA) aktiviert werden. Auch könnte eine Instabilität von Rir im lysogenen Zustand vorliegen, die durch Komponenten der SOS-Antwort stabilisiert würde. Die Tatsache, dass Rir ein instabiles Protein ist, wurde anhand der Abbauprodukte in GST-Rir- (vgl. Abb. 26, B) und Rir*-Eluaten (vgl. Abb. 27, B) veranschaulicht. Es wurden Zink-Metalloproteasen beschrieben, die für ihre Aktivierung einer Selbstspaltung unterliegen (Berzigotti *et al.*, 2012). Somit könnte auch der umgekehrte Effekt, nämlich, dass RecA Rir zur Spaltung anregt und dadurch aktiviert, vermutet werden. Unterstützt wird diese Vermutung durch das Auftreten zahlreicher GST-Rir-Spaltprodukte in Ansätzen mit aktiviertem RecA aus *S. thermophilus* J34f-2 (vgl. Abb. 67 im Anhang). Freie, intrazelluläre TP-J34-DNA, die nicht in dem Stamm J34-12 mit *rir*-Mutation gefunden wurde (Neve *et al.*, 2003), spricht für eine unterschwellige, spontane Induktion des Prophagen hervorgerufen durch Rir. Eine Überproduktion von Rir durch den Vektor pSK10 induzierte den TP-J34-Wildtyp-Prophagen, nicht aber die Rir-*Knockout*-Mutante aus *S. thermophilus* J34-12f (4.6). Eine Wiederherstellung des induzierbaren Wildtyp-Phänotyps durch pSK10 konnte in der *rir*-Mutanten J34-12f nicht nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte sein, dass die Expression von *rir* durch den P32-Promotor in pSK10 nicht ausreicht, um das native Rir zu komplementieren. Bei lysogenen *S. thermophilus* wurde zwar das Phänomen der Autolyse beschrieben (Husson-Kao *et al.*, 2000; Neve *et al.*, 2003),

diese tritt aber eher bei ungünstigen Umweltbedingungen auf und müsste auch den Stamm f-2[pMG36e] und nicht nur f-2[pSK10] betreffen. Das gleiche Phänomen wurde bei der Derepression des *ICEBsI*-Transposons von *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) durch die putative Zink-Metalloprotease ImmA und des ImmR-ähnlichen Repressors cϕ105 des *B. subtilis* Phagen ϕ105 durch ein ImmA-ähnliches Protein beobachtet (Bose und Grossman, 2011). Als putative Zink-Metalloproteasen ist ImmA und Rir ein H-E-X-X-H -Motiv mit proteolytischer Aktivität (Abb. 53), das ebenfalls in IrrE aus *Deinococcus deserti* und *radiodurans* vorkommt (Earl *et al.*, 2002; Ludanyi *et al.*, 2014), gemein.

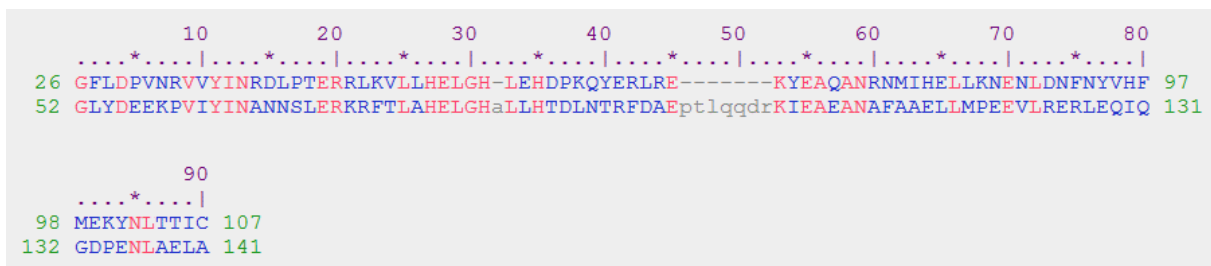


Abb. 53. Konservierte Domäne der Proteine Rir (oben) und ImmA (unten) mit dem Zink-Bindemotiv HELGH (NCBI).

Die Kristallstruktur von IrrE offenbarte ebenfalls eine N-terminale Peptidase-ähnliche Domäne (HEISH) und ein zentrales HTH-Motiv (Vujčić-Zagar *et al.*, 2009). Die für die Radioaktivitätstoleranz essentielle Metalloprotease inaktiviert den Repressor DdrO, wodurch die Transkription verschiedener Gene in Gang gebracht wird, die dem Bakterium das Überleben einer hohen Strahlendosis ermöglichen (Ludanyi *et al.*, 2014; Devigne *et al.*, 2015). Auch bei der Resistenzvermittlung gegen Penicillin in *Staphylococcus aureus* inaktiviert eine Zink-Metalloprotease (BlaR1) einen Repressor (BlaI), sodass eine Beta-Lactamase (BlaZ) gebildet wird (Hackbarth und Chambers, 1993). Die Inaktivierung eines Repressors durch eine Zink-Metalloprotease als Reaktion auf bestimmte Umweltreize scheint ein allgemeineres, regulatorisches System zu sein. Bei Betrachtung der genetischen Organisation des *ICEBsI*-Transposons, in dem ImmA lokalisiert ist (Bose und Grossman, 2011), fällt die Ähnlichkeit zum TP-J34-Lysogeniemodul auf (Abb. 54). Bose *et al.* erkannten bereits eine Ähnlichkeit zwischen dem linken Teil des *ICEBsI*-Transposons und den Modulen einiger Phagen von Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (Bose *et al.*, 2008). Die Homologien bestehen zwischen dem ausgehend von *PimmR* synthetisierten Repressor ImmR, der Zink-Metalloprotease ImmA und einer Rekombinase (Integrase). Sowohl aktiviertes RecA aus der SOS-Antwort als auch der sensorische Regulator RapI können auf noch unbekannte Weise ImmA stimulieren, welches dann die Proteolyse und Inaktivierung des Repressors ImmR induziert (Abb. 54, A, unten). Damit besitzt ImmA ebenfalls die Funktion eines Antirepressors. Eine Überproduktion

von ImmA in *B. subtilis* führt offenbar homolog zur Rir-Überproduktion in *S. thermophilus* J34f-2 zu einer Inaktivierung des Repressors auch ohne die Einwirkung von aktivem RecA. Die Tatsache, dass ImmA für die Inaktivierung des Repressors essentiell ist (Bose *et al.*, 2008) wurde durch nicht-induzierbare *rir-Knockout*-Mutanten auch für TP-J34 erkannt (Mohamed, 2010). Weiterhin wurde für ImmA ebenfalls eine Instabilität postuliert (Bose und Grossman, 2011). Aufgrund der Übereinstimmungen in Organisation und Art der Proteine könnte eine ähnliche Regulation der Induktion von TP-J34 vermutet werden (Abb. 54, B, unten).

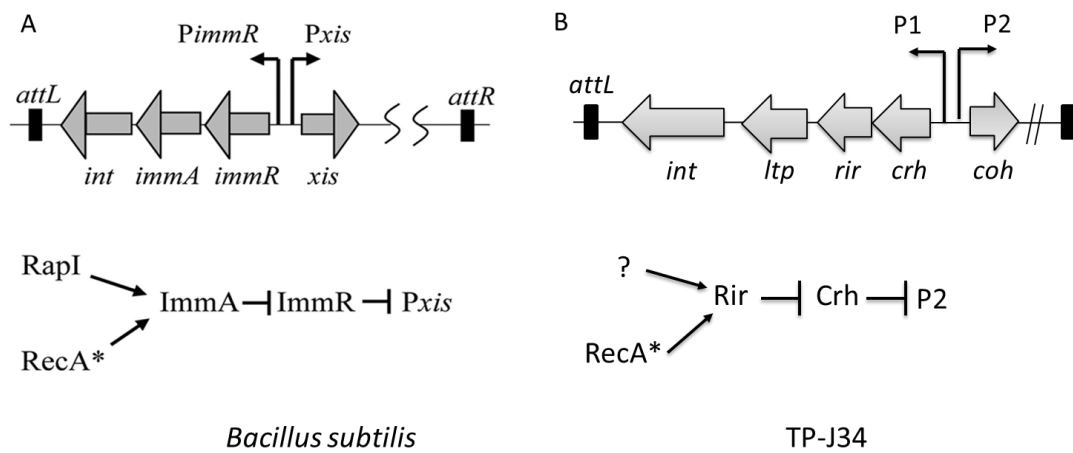


Abb. 54. Organisation und Regulation des ICEBsI-Transposons von *Bacillus subtilis* (Bose und Grossman, 2011) (A) im Vergleich zur Organisation des TP-J34-Lysogeniemoduls und einer möglichen Regulation der Induktion durch RecA (B).

Die Spaltung von ImmR durch ImmA aus *B. subtilis* erfolgt zwischen Phenylalanin und Methionin an Position 95 und 96, sodass die N-terminale DNA-Bindedomäne von der C-terminalen Domäne abgespalten wird (Bose *et al.*, 2008). Zur Identifizierung einer möglichen Rir-Interaktionsstelle in Crh wurden die Aminosäuresequenzen von *Streptococcus* Phagen-Repressoren, die *downstream* von einer Rir-homologen Zink-Metalloprotease begleitet werden, miteinander verglichen. Dabei wurde am Anfang der C-terminalen Dimerisierungsdomäne der Repressoren ein konserviertes 'FDGKPL'-Motiv identifiziert, innerhalb dessen bei Crh an Position 95 Phenylalanin und an Position 96 Asparaginsäure liegt (Abb. 55).

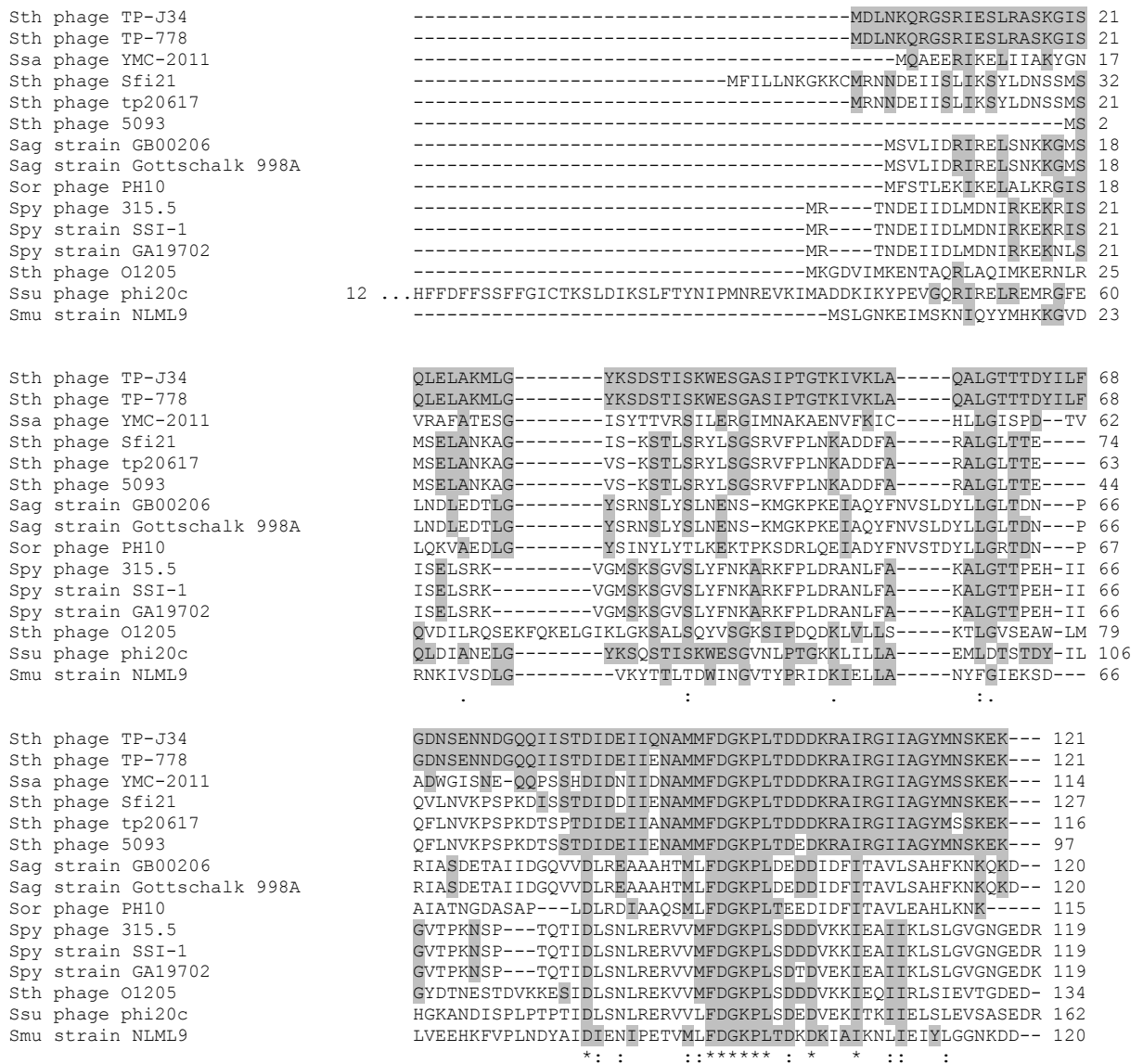


Abb. 55. Vergleich der Aminosäuresequenzen von Repressor-Proteinen aus *Streptococcus* Phagen mit *downstream* assoziierter, Rir-homologer Protease in einem multiplen Alignment (Cobalt, NCBI). Es wurden 15 Proteine aus der NCBI-Datenbank (BlastP) miteinander verglichen. Allen gemeinsam ist die Sequenz 'FDGKPL' in der C-terminalen Domäne. Sth: *S. thermophilus*; Ssa: *S. salivarius*; Sag: *S. agalactiae*; Sor: *S. oralis*; Spy: *S. pyogenes*; Ssu: *S. suis*; Smu: *S. mutans*

Das 'FDGKPL'-Motiv scheint zu 100 % konserviert in der Spezies *S. thermophilus* zu sein, während bei Verwandten wie *L. lactis* KF147 (Siezen *et al.*, 2010) und *S. mutans* SF12 (Cornejo *et al.*, 2013) ähnliche Motive ('FDGRPL' bzw. 'FEGKPV') gefunden wurden. Weiterhin fiel auf, dass die Proteine mit 'FDGKPL'-Motiv mit einer Größe von 97 bis 162 aa etwa halb so groß waren wie Phagen-Repressoren, die von keiner Metalloprotease mit Zink-Bindemotiv begleitet werden und dass sie keine *S24_LexA-like*-Domäne, die einer RecA-Autoproteolyse unterliegt, wie Repressoren ohne 'FDGKPL'-Motiv aufwiesen. Somit könnten diese Repressoren den bereits genannten Klasse-II-Repressoren zugewiesen werden. Die Analyse der

durch *PSIPRED* postulierten Sekundärstruktur von Crh und ImmR ergab, dass das 'FDGKPL'-Motiv (Abb. 56, A) bzw. die 'FM'-Spaltstelle (B) zwischen zwei Helices lokalisiert sind und somit gut zugänglich für einen Interaktionspartner wären. Mit Hilfe des Programms *PredictProtein* zur Proteinsequenzanalyse wurde eine Proteinbindestelle an Position 95, 97 und 98 innerhalb des 'FDGKPL'-Motivs von Crh identifiziert (Ofran und Rost, 2007) (Abb. 56, C). Das 'FDGKPL'-Motiv wurde somit als Interaktionsdomäne von Rir postuliert.

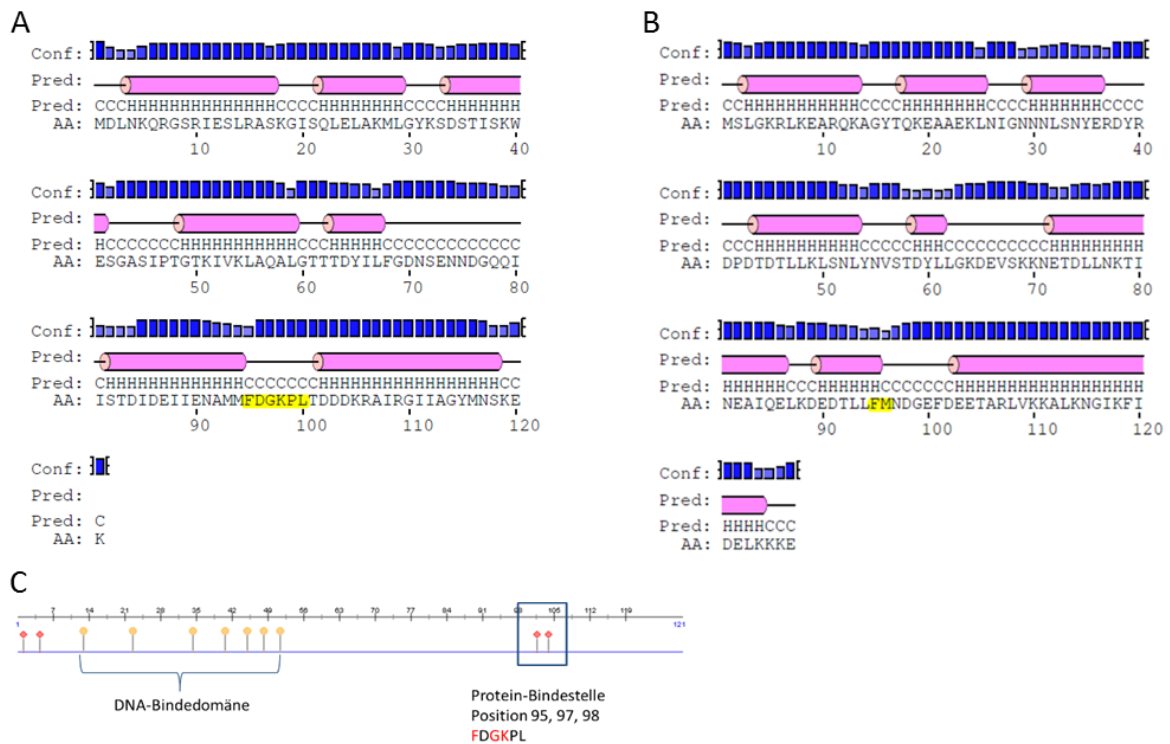


Abb. 56. Postulierte Sekundärstruktur des Repressors Crh (A) und ImmR aus *B. subtilis* (B) (*PSIPRED*). Die 'FDGKPL'-Sequenz in Crh, innerhalb derer eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne (ISIS) durch *PredictProtein* postuliert wurde (C) und die ImmA-Spaltstelle 'FM' in ImmR sind in gelb hervorgehoben. Helices sind durch H, coils durch C gekennzeichnet.

Die Position der Spaltstellen in ImmR zwischen zwei Helices scheint das Protein leicht zugänglich für die Protease zu machen. Auch die 'FDGKPL'-Sequenz liegt an einer entsprechenden Position. Zur Ermittlung, ob die Bindung in diesem Bereich stattfindet, wurde eine Crh-Mutante (Crh_{Mut}) generiert, die statt 'FDGKPL' das Motiv 'VDRKAL' trug. Diese zeigte dennoch eine DNA-Bindeaktivität in einem EMSA, die durch GST-Rir nicht gehemmt werden konnte (vgl. Abb. 33). Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis dafür sein, dass die Bindung von Rir tatsächlich in dem 'FDGKPL'-Motiv am Anfang der Oligomerisierungsdomäne von Crh stattfindet. Trotz der putativen Proteaseaktivität von Rir konnte weder durch das Protein allein, noch in Kombination mit aktiviertem RecA, eine Spaltung des Repressors nach-

gewiesen werden. Zwar traten immer wieder zwei Formen des Proteins mit einem Größenunterschied von 2 bis 3 kDa auf, die bereits bei der Aufreinigung aus *E. coli* ausgemacht wurden, jedoch konnte das größere Protein nicht durch Inkubation mit Rir und RecA in das kleinere überführt werden. Diese zwei Proteine mit geringem Größenunterschied wurden auch bei anderen GST-Proteinen wie der Crh-Mutanten GST-Crh_{Mut} (vgl. Abb. 26) und GST-RecA (vgl. Abb. 65 im Anhang) detektiert und schienen daher keine für das Protein spezifische Spaltung darzustellen. Bis auf diesen Unterschied der Nicht-Spaltung könnte aufgrund folgender Parallelen von einer äquivalenten Regulation der Induktion von TP-J34 und dem ICEBsI-Transposon ausgegangen werden: i) identische genetische Organisation mit divergent transkribierten Genen; ii) Aufeinanderfolge eines Repressors und einer Zink-Metalloprotease in einem Operon; iii) Unterdrückung der Transkription durch den Repressor; iiiii) fehlende RecA-Autoproteolyse-Stelle in den Repressoren; und iiiiii) fehlende pH-induzierte Autoproteolyse der Repressoren. Neben den beiden bereits genannten Antirepressor-Systemen temperenter Phagen wie sie durch Kim und Ryu (Kim und Ryu, 2013) zusammengefasst wurden, stellt das hier beschriebene System mit einer *downstream* des Repressors gelegenen Zink-Metalloprotease als Antirepressor ein neuartiges dar. Aufgrund der Ergebnisse der *in vivo*- und *in vitro*-Analysen von Crh wird vermutet, dass der Repressor zur Induktion des lytischen Zyklus nicht degradiert wird (4.1.5). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass bisher keine Systeme, in denen Phagen-Repressoren durch einen Antirepressor proteolytisch gespalten werden, beschrieben wurden. Dies ist bisher nur von bakteriellen Repressor-Antirepressor-Systemen bekannt (Bose *et al.*, 2008; Ludanyi *et al.*, 2014). Weiterhin wurden noch keine Repressoren beschrieben, die einer Proteolyse in einem 'FDGKPL'-Motiv unterliegen. Damit würde Crh neben den Repressoren der Phagen Phi186, Gifsy-1/-2, SPC32H und TP901-1 zu den Repressoren zählen, die zur Inaktivierung nicht gespalten werden. Es wird von einer RecA-abhängigen Induktion des Phagen TP-J34 ausgegangen, bei der RecA den Repressor nicht direkt inaktiviert, sondern wahrscheinlich über eine Aktivierung oder Stabilisierung von Rir eine Inaktivierung des Repressors durch dessen Bindung induziert (Abb. 57). Inwiefern RecA und eventuell andere Komponenten der SOS-Antwort Einfluss auf Rir haben kann nicht abschließend gesagt werden.

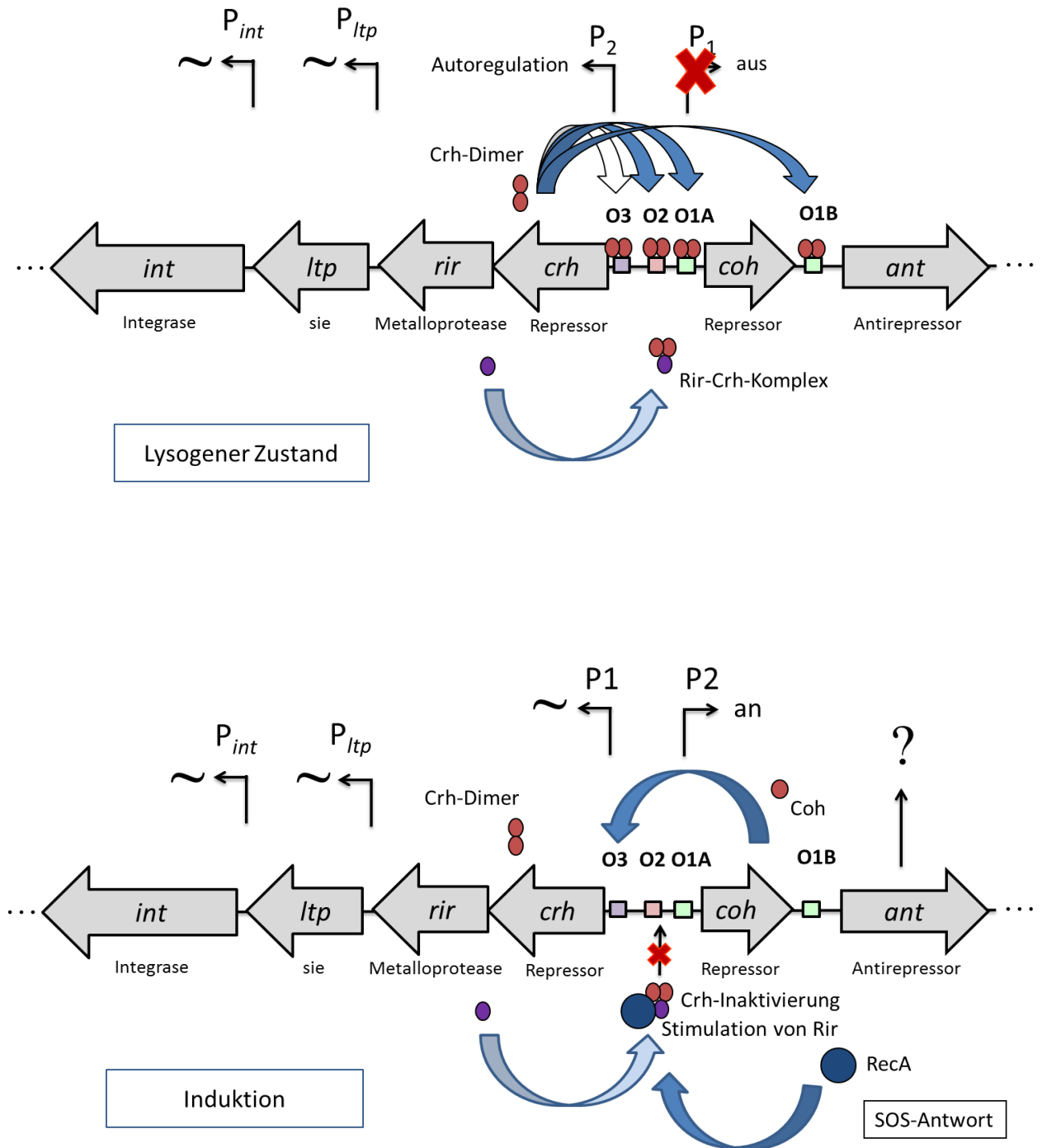


Abb. 57. Postuliertes Modell zur Erhaltung des lysogenen Zustands und zur Induktion des Prophagen TP-J34 während der SOS-Antwort.

6 Ausblick

Diese Arbeit lieferte Erkenntnisse über ein neuartiges System der Prophagen-Induktion und stellt somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Phagen-Biologie. Es wurde herausgefunden, dass der Prophage TP-J34 einer RecA-abhängigen Induktion unterliegt, bei der RecA den Repressor nicht direkt zur Autoproteolyse anregt. Stattdessen interagiert Rir als Antirepressor mit Crh. Eine Spaltung des Repressors durch Rir konnte nicht gezeigt werden. Um definitiv eine Spaltung ausschließen zu können müsste dies aber noch eingängiger unter verschiedenen Puffer-Bedingungen, z. B. mit Zink-Ionen, untersucht werden. Mit bereits begonnenen Konstruktionen der Plasmide pBAD crh und pBAD crh_{Mut} sollten das Repressor-Protein und seine Mutante über einen C-terminalen His-tag aufgereinigt werden. Dann sollte eine *in vitro*-Inkubation von Crh-His bzw. Crh $_{Mut}$ -His mit RecA und Rir erfolgen. Die Repressor-Proteine mit His-tag würden den Vorteil bieten, dass sie nicht wie Crh* durch das gleichgroße Rir* auf SDS-PAGE verdeckt würden und ein mögliches Spaltprodukt durch einen His-Antikörper nachweisbar wäre. Zur *in-vivo*-Analyse könnten die His-tag-Repressoren in pMG36e eingebracht und deren Zustand in unbehandelten und mit MMC behandelten *S. thermophilus* J34f-2 untersucht werden. Im Falle eines auftretenden Spaltprodukts des Repressors sollte dieses über eine Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation(MALDI)-Massenspektrometrie analysiert werden, um herauszufinden, ob die Spaltung in der postulierten 'FDGKPL'-Stelle stattfindet. Da hier zumindest eine Rir-Bindungsdomäne vermutet wird, müssten zur Bestätigung dieser Hypothese weitere Interaktionsanalysen der Mutanten GST-Crh $_{Mut}$ bzw. Crh $_{Mut}$ -His und Rir folgen. Herauszufinden wäre außerdem, durch welche Komponenten der SOS-Antwort (vornehmlich RecA) und auf welche Weise Rir beeinflusst wird, damit die Inaktivierung des Repressors induziert und eine lytische Entwicklung eingeleitet wird. Um eine Involvierung von HdiR mit LexA-ähnlicher Funktion bei der Induktion des TP-J34-Prophagen zu ermitteln, würde ein *Knockout* des Gens und die anschließende Analyse einer Induzierbarkeit des Prophagen Aufschluss geben. Die Funktion von Coh und Ant könnte durch eine pMG36e-erzielte Expression in *S. thermophilus* J34f-2 weiter aufgeklärt werden. Das putative Antirepressor-Protein Ant könnte mit Hilfe des bereits konstruierten Plasmids pGEX ant aufgereinigt und auf eine Interaktion mit dem Repressor Crh hin untersucht werden. Zur Interaktionsanalyse der verschiedenen Proteine könnte eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP), die anfänglich erprobt wurde, als weitere Methode herangezogen werden.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die wichtigsten *cis*- und *trans*-regulatorischen Elemente des TP-J34-Lysogeniemoduls auf ihre Funktion hin untersucht und deren Rolle bei der Entscheidung zwischen einer lysogenen und lytischen Entwicklung des Phagen diskutiert. Mit Hilfe von 5`*RACE-PCR* wurden die Promotoren P1, P_{ltp} und P_{int} durch Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte lokalisiert und bestätigt. Die DNA-Bindefunktion der putativen Repressoren Crh* und Coh* wurde mittels EMSA nachgewiesen und deren Bindestellen in der *crh-coh*- und *coh-ant*-intergenen Region mit Kompetitionsassays lokalisiert. Crh* konnte an alle vier postulierten Operatoren O1A, O1B, O2 und O3 binden, während Coh* lediglich an O3 in der P1-Promotorregion binden konnte. In der Aminosäuresequenz des Repressors Crh wurde keine typische RecA-Autoproteolyse-Spaltstelle gefunden und nachweislich erfolgte keine Spaltung durch aktiviertes RecA aus *S. thermophilus* J34f-2, während HdiR mit LexA-ähnlicher Funktion aus *S. thermophilus* J34f-2 erfolgreich degradiert wurde. Außerdem wies Crh* keine pH-abhängige Autoproteolyse auf. Rir*, eine putative Zink-Metalloprotease, konnte aufgrund einer Hemmung der DNA-Bindung von Crh* als Antirepressor ermittelt werden. Ein bestehender Crh*-DNA-Komplex konnte durch Rir* nicht gebunden werden oder der Komplex gelöst werden. Die reprimierende Wirkung erfolgte durch Komplexbildung mit dem Repressor in Lösung, die über Quervernetzungen und native PAGE nachgewiesen werden konnte. Eine Rir-Überproduktion in *S. thermophilus* J34f-2 induzierte eine lytische Entwicklung des Prophagen. Sequenzvergleiche von *Streptococcus* Phagen-Repressoren, die von einer Rir-homologen Protease begleitet werden, ließen eine Interaktion dieser mit dem konservierten, C-terminalen `FDGKPL`-Motiv in den Repressoren vermuten. Tatsächlich konnte Rir* die DNA-Bindung einer Crh*-Mutante mit einem `VDRKAL`-Motiv in einem Kompetitionsassay nicht hemmen. Eine Spaltung von Crh* durch Rir* *in vitro* konnte nicht nachgewiesen werden und auch eine *in vivo*-Degradierung des Repressors während der Induktion von TP-J34 durch MMC konnte nicht eindeutig belegt werden. Aufgrund der vielen Parallelen konnte ein ähnliches regulatorisches System zum ICEBs1-Transposon und Prophagen ø105 von *B. subtilis* postuliert werden, bei dem der Repressor zwar RecA-abhängig, aber nicht direkt durch RecA, sondern durch einen Antirepressor, inaktiviert wird.

8 Summary

In this study, individual components of the TP-J34 lysogenic module were examined for their function and their role in the decision between a lysogenic and lytic development of the phage was discussed. With the aid of 5'RACE-PCR, the promoters P1, P_{tip} and P_{int} were localized and confirmed by determining the transcription start points. The DNA binding function of the putative repressors Crh* and Coh* was shown by means of EMSA and their binding was located to the *crh-coh*- and *coh-ant*-intergenic region with competition assays, respectively. Crh* could bind to all four postulated operators O1A, O1B, O2 and O3, whereas Coh* could only bind to O3 in the P1 promoter region. In the amino acid sequence of the repressor Crh, no typical RecA autoproteolysis cleavage site was found and cleavage by activated RecA from *S. thermophilus* J34f-2 could not be determined, whereas HdiR from *S. thermophilus* J34f-2, which exhibits a LexA-like function, could be successfully degraded. Furthermore, Crh showed no pH-dependent autoproteolysis. Rir*, a putative zinc metalloprotease, could be shown to be an antirepressor due to an inhibition of the DNA binding of Crh*. Crh* bound to the operator DNA could not neither be bound by Rir* nor could the complex be dissociated. The repressing effect was achieved by complexing with the repressor in solution, which could be detected by cross-linking and native PAGE. Rir overproduction in *S. thermophilus* J34f-2 induced lytic development of the prophage. Sequence comparisons of *Streptococcus* phage repressors accompanied by a Rir-homologous protease suggested an interaction of these with the conserved C-terminal 'FDGKPL' motif in the repressor. In fact, Rir* could not inhibit the DNA binding of a Crh* mutant with a 'VDRKAL' motif in a competition assay. A cleavage of Crh* by Rir* *in vitro* could not be demonstrated. In addition, an *in vivo* degradation of the repressor during the TP-J34 induction by MMC could also not be unequivocally demonstrated. Due to the many parallels, a similar regulatory system to the ICEBsI transposon and prophage ϕ 105 of *B. subtilis* could be postulated, in which the repressor is inactivated, but not by RecA, but by an antirepressor.

9 Anhang

Geräte und Materialien

Tab. 32. Bezugsquellen der verwendeten Geräte und Materialien.

Gerät/Material	Model/Typ	Hersteller
Bunsenbrenner	Phoenix II	Schuett, Göttingen
Deckelflasche	25 ml – 2 l	Schott AG, Mainz
Eismaschine	AF 100 AS	Scotsman® Frimont S.p.A. Pogliano MIL (MI)
Elektroporations-Küvette	Gene Pulser/ <i>E. coli</i> Pulser (0,1 cm Spaltbreite)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporator	Electroporator 2510	Eppendorf AG, Hamburg
Erlenmeyerkolben	50 ml – 2 l	Schott AG, Mainz
Falkon-Röhrchen	Cellstar® Tubes, 50 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
Filterpapier	Gel Blot Paper GB005	Whatman, Sanfort (USA)
Filter f. Proteinkonzentrierung	Amicon (3 K, 10 K)	Merck Millipore, Darmstadt
Geldokumentationskammer	Universal Hood II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glasglimmerplatte		Plano GmbH, Wetzlar
Glasperlen	Ø 0,11 mm	B. Braun Biotech Intern. GmbH, Melsungen
Glaspipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Brand GmbH & CO KG, Wertheim
Herdplatte	Ceran	Schott, Jena
Kupfernetz	400 mesh, Ø 3 mm	Plano GmbH, Wetzlar
Kühltruhe (- 20 °C)	Comfort Plus	Siemens AG, München
Kühlzentrifuge	J2-21 5417 R	Beckmann Coulter GmbH Eppendorf AG, Hamburg
Laminiergerät	Typ 381	Krupps GmbH, Offenbach
Magnetrührer	MR3002C	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Messbecher	25 ml – 500 ml	Schott AG, Mainz
Messzylinder	10 ml – 1 l	Schott AG, Mainz
Mikrodialyse-Filter	Millipore (0,2/ 0,45 µm)	Merck Millipore, Darmstadt
Mikroskop	Axioskop 40	Carl Zeiss AG, Jena
NanoDrop	2000c	Peqlab GmbH, VWR, Darmstadt
Nitril-Handschuhe	rotiprotect	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Objektträger		Menzel GmbH, Braunschweig
Parafilm		Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
Petrischale		Greiner Bio-One, Frickenhausen
pH-Metter	Delta 340	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen
Photometer	Nanocolor® 500 D	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
PCR-Tubes		Eppendorf AG, Hamburg
Pipette	Reference Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Filtertips u. ohne Filter	Eppendorf AG, Hamburg
Power-Supply	Mini Power Pack P20	Biometra GmbH, Göttingen
Reinstwasseranlage	arium® pro	Sartorius AG, Göttingen
Schüttler	Rocky	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
SDS-PAGE-Kammer	Eco-Mini	Biometra GmbH, Göttingen
SDS-PAGE-Power Supply	PS304	Biometra GmbH, Göttingen
Seitenarmkolben	100 ml, 300 ml, 500 ml	Schott AG, Mainz

Sicherheitswerkbank	Claire	Berner International GmbH, Elmshorn
Spritze	Syringe, 10 ml	Terumo, Eschborn
Sterilbank	ELB 2448	LAF-Technik, Hamburg
Spritzenfilter (0,2/0,45 µm)	Whatman®	Schleicher und Schüll, Dassel
Thermoblock	CHB-202	BIOER
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Tisch	UV-Transilluminator	UVP, INC.
Vortex Mixer	Vortex Genie 2™ Vortex Mixer	Scientific Industries Inc., Boheia neo Lab, Heidelberg
Waage	AX2202	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	MC	Julabo, Seelbach
Zellmühle	FastPrep FP120	Bio 101 Savant Instruments Inc., Farmingdale (USA)
Zentrifuge	5415 C, 5415 D, 5417 C Labofuge M	Eppendorf AG, Hamburg Heraeus Sepatech
Zentrifugenbecher	500 ml, Thermo Scientific Nalgene®	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Chemikalien

Tab. 33. Verwendete Chemikalien mit ihren Bezugsquellen.

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar	Merck KGaA, Darmstadt
Agar (Bacto-)	BD Becton Dickinson, Le Pont de Claix (F)
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelzen
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ascorbinsäure (L+)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bisacrylamid/Acrylamid Mix (40 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
DL-Threonin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Dimethylsulfoxid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eisessig (99 % Essigsäure)	Merck KGaA, Darmstadt
Erythromycin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelzen
Ethanol (vergällt/unvergällt)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fleischextrakt	BD Becton Dickinson, Sparks (USA)
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glucose (D+)	Merck KGaA, Darmstadt
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>Protino® Glutathione Agarose 4B</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren

Glycerol (85 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt	BD Becton Dickinson, Le Pont de Claix (F)
HEPES	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelzen
IPTG	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magermilch	BD Becton Dickinson, Le Pont de Claix (F)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Mutanolysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Phenol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phyton-Pepton	BD Becton Dickinson, Le Pont de Claix (F)
Poly-Pepton	BD Becton Dickinson, Le Pont de Claix (F)
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (37 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Threonin (DL-)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelzen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypton	BD Becton Dickinson, Sparks (USA)
Uranylacetat	Agar Scientific, Stansted (GB)

Software und Programme

Tab. 34. Eingesetzte Software und ihre Anwendungsbereiche.

Software	Anwendungsbereich	Hersteller/Quelle
<i>BlastN/BlastP</i>	Ableichung einer Nukleotid-/Aminosäuresequenz mit einer Datenbank	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PRO-GRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
<i>Chromas Lite 2.11</i>	Analyse von Chromatogrammen	http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Chromas-Lite.shtml
<i>Clustal Omega</i>	Multiples DNA- und Protein-Alignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
<i>ExPASy ProtParam</i>	Berechnung physikalischer und chemischer Parameter von Proteinen	http://web.expasy.org/protparam/
<i>ExPASy Translate Tool</i>	Translation einer DNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz	http://web.expasy.org/translate/
<i>Ligation Calculator</i>	Berechnung der Menge an Insert-DNA für eine Ligation	http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html
<i>NEBcutter V2.0</i>	Lokalisierung von Restriktionsstellen in einer Nukleotidsequenz	http://nc2.neb.com/NEBcutter2/
<i>OligoAnalyzer 3.1</i>	Primer Design	http://eu.idtdna.com/calc/analyzer

<i>PredictProtein</i>	Proteinanalysen, Vorhersage von Sekundärstrukturen	https://www.predictprotein.org
<i>PSIPRED v.3.3</i>	Vorhersage von Protein-Sekundärstrukturen	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
<i>Quantity One 1-D Analysis Software</i>	Bearbeitung von Agarosegelbildern	Bio-Rad
<i>Sigmaplot</i>	Erstellen von Diagrammen und Graphiken	Systat Software Inc.
<i>SMART</i>	Proteinanalysen	http://smart.embl-heidelberg.de/
<i>Snapgene</i>	Erstellen von Plasmidkarten, Klonierungen, Primer	

Kits

Tab. 35. Verwendete Kits und ihre Anwendungsbereiche.

Kit	Anwendungsbereich	Hersteller
<i>5`/3`RACE Kit, 2nd Generation</i>	Amplifizierung von 5`/3` cDNA-Enden	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>DNA Clean & ConcentratorTM</i>	DNA-Aufreinigung und -Konzentrierung	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg
<i>ZymocleanTM DNA Gel Recovery</i>	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg
<i>High Pure PCR Product Purification</i>	Aufreinigung von PCR-Produkten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>NucleoSpin[®] Plasmid und Plasmid QuickPure</i>	Minipräparation von <i>high-</i> und <i>low-copy</i> Plasmiden	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
<i>Quick LigationTM</i>	Ligation	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
<i>ZR Plasmid MiniprepTM-Classic</i>	Minipräparation von Plasmid-DNA	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg

Physikalische Plasmidkarten

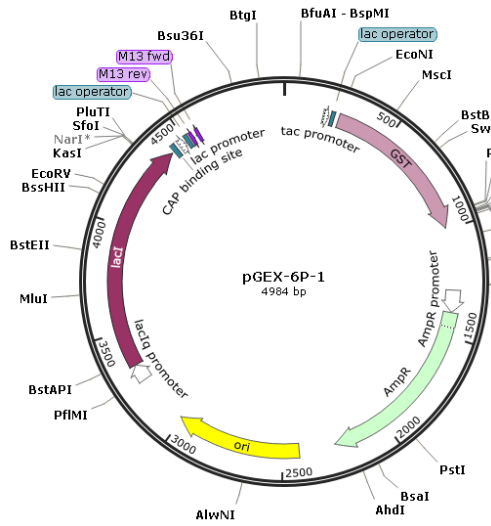


Abb. 58. Plasmidkarte von pGEX-6P-1 (4.984 bp).

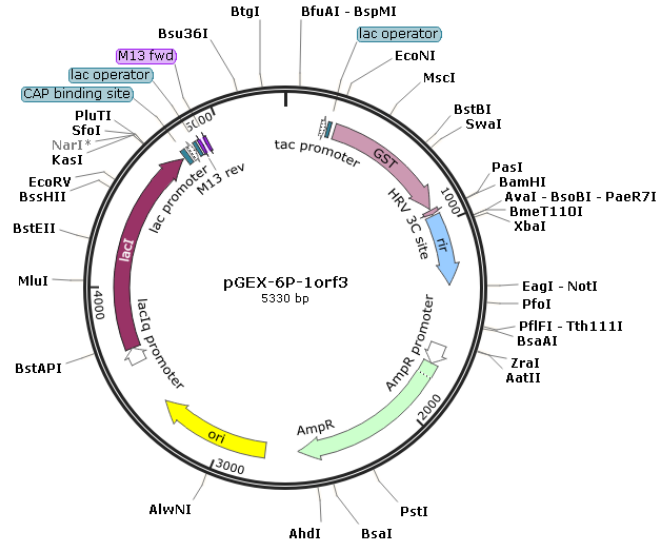


Abb. 59. Plasmidkarte von pGEX-6P-1orf3 (5.330 bp).

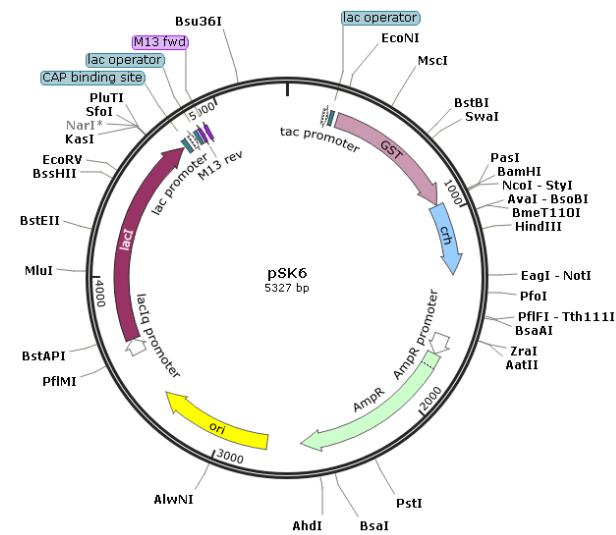


Abb. 60. Plasmidkarte von pSK6 (5.327 bp).

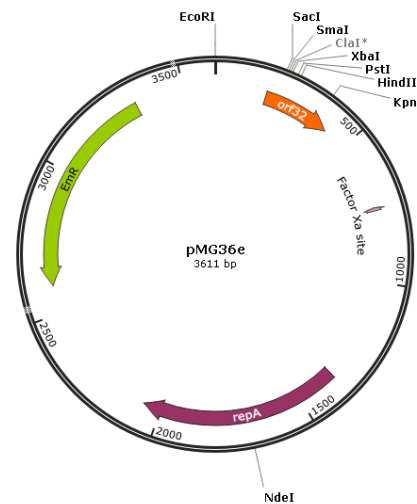


Abb. 61. Plasmidkarte von pMG36e (3.611 bp).

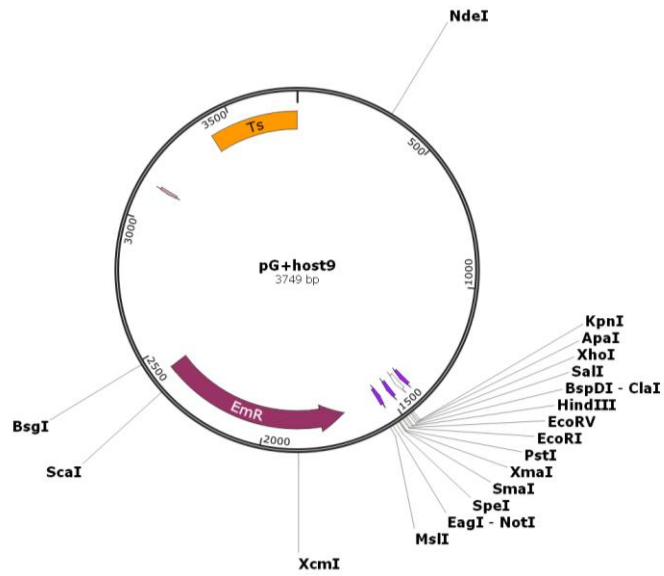


Abb. 62. Plasmidkarte von pG⁺host9 (3.749 bp).

Nukleotidsequenzen der Gene *recA* und *hdiR* aus *S. thermophilus* J34f-2

recA-Gen aus *S. thermophilus* J34 (1.155 bp)

ATGGCTAAGAAAACAAAGAAAACAGAAGAAATCACAAAGAAGTTTGGTGATGAGCGTCGCAAAGCACTCG
 ACGATGCATTAACAAAACATTGAAAAAGATTTTGGTAAGGGTGCAGTTATGCGTCTTGGTGAGCGTGCAGA
 GCAAAAAGTTCAGGTTATGAGCTCAGGCTCGCTAGCTTTGGATATTGCTCTTGGTGCGGGTGGTTACCCT
 AAAGGTCGTATTATTGAAATTTACGGACCAGAATCATCAGGTAACAACAAGTGTGCCCTTCATGCAGTTG
 CTCAGACTCAAAAAGAAGGTGGCATCGCAGCTTTTATCGATGCCGAGCATGCTCTTGACCCTGCGTATGC
 AGCAGCTCTAGGTGTTAATATCGATGAGCTTCTTTTGTGCGAGCCTGATTCTGGTGAGCAAGGTCTCGAA
 ATTGCAGGTAAGCTGATTGACTCTGGTGCAGTGGATTTAGTTGTTGTTGACTCAGTTGCGGCCTTGGTAC
 CACGTGCAGAAATTGATGGAGATATTGGTGACAGTCATGTAGGACTTCAAGCGCGTATGATGAGTCAAGC
 CATGCGTAAACTTTCTGCATCTATTAATAAAAACAAAACGATTGCTATCTTTATTAACCAGTTGCGTGAA
 AAAGTTGGTATCATGTTTGGTAACCCAGAGACTACCCAGGTGGACGTGCTTTAAAATTCTATGCATCAG
 TACGTCTTGATGTACGTGGTAATACACAAATTAAGGAACCGGTGACAAAAGGACAAAATGTTGGTAA
 GGAAACCAAGATTAAGGTTGTTAAAAACAAAGTTGCTCCACCATTTAAAGAAGCTTTTGTGAAATTATG
 TATGGCGAAGGAATTTACAAAACCGGTGAACCTGTAAAAATTGCAAGTGATATAGGCATTATTCAGAAAG
 CCGGAGCTTGGTTCTCATATAATGGGGAGAAAATTGGTCAAGGATCTGAAAATGCTAAAAAGTATTTAGC
 AGATCACCCTGAGATTTTGCAGAAAATCGATCATAAAGTACGCGTACACTACGGTCTGGTTGAGCTAGAT
 GAGGACGATGTTGTTGAAGATACACAAGTTGAAGACACACAAGTTGAAGACACGTCTGATGAACTCATT
 TAGATCTTGATTCAACCATTGAAATCGAAGAATAA

hdiR-Gen aus *S. thermophilus* J34 (690 bp)

ATGTTTTTCAGGACAAAGACTTAAAGAGATTCGAGAAGCACAAAGGAATGAGTCAAGCATCAGTAGCTAAGC
 ATCTAGGGATTTTCGCGCTCCTCTTATTTTAACTGGGAAAATGGTAAGACGAAACCAAATCAAAGAATCT
 ATCGTACTGGCTGAACTATTTGGTGTAGCCGAGACCTATTTTCTGTCTGAACACGAGATTGTTGAAGTG
 TACTTGGAAATTAATGAGGAAAATCGTCAAGAAGCTTTGCGATTCACTAAAGCTCTTCTGGAGGAACAAG
 AAGCAGAAAAGAAGAAATCACCCGTTATCCCACTTTACTCTTACAAAGTTTTTCGAGCGTTTATCAGCCGG
 AACAGGTTATACTTATTTTGGTGATGGCAATTATGATGAAGTTTTCTACGATGAAGAAATAGATCATGAT
 TTTGCATCATGGGTATTTGGAGACTCTATGGAACCTACCTACCTAAATGGTGAAGTCGTGCTGATCAAGC
 AAACAGGTTTTGATTATGATGGCGATGTCTATGCTGTAGACTGGGATGGTCAAACCTATATCAAAAAGGT
 TTATCGTGAGGAGGATGGTCTTCGTTTGGTTTCTCTTAATAAACGGTATGGTGACAAATTTGCTCCTTAT
 GATGAAGACCCTCGAATCATCGGTAATAATTGTTGGTAACTTCATGCTATTGAGGCTTAG

Abb. 63. Nukleotidsequenz des *recA*- und *hdiR*-Gens aus *S. thermophilus* J34f-2. Die Primersequenzen, die anhand der entsprechenden Gene aus *S. thermophilus* LMD-9 konstruiert wurden, sind gelb markiert. Zu den nächsten *BlastN*-hits abweichende Nukleotide im *hdiR*-Gen sind blau dargestellt.

Aminosäuresequenzen der aufgereinigten Proteine und des RecA (NEB)

GST-Crh (352 aa, 40,1 kDa)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVLVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSD**LEVLFGQ`GPLGS**MDLNKQGRSRIESLRASKGISQLELAKMLGYKSDSTISKWESGASIPGTGKIVKLAQALGTTTDDYILFGDENSENDGQQIISTDIDEIENAMMFDGKPLTDDDKRAIRGIIAGYMNSKEK

Crh* (126 aa, 13,7 kDa)

GPLGSMDLNKQGRSRIESLRASKGISQLELAKMLGYKSDSTISKWESGASIPGTGKIVKLAQALGTTTDDYILFGDENSENDGQQIISTDIDEIENAMMFDGKPLTDDDKRAIRGIIAGYMNSKEK

Crh_{Mut}* (126 aa, 13,7 kDa)

GPLGSMDLNKQGRSRIESLRASKGISQLELAKMLGYKSDSTISKWESGASIPGTGKIVKLAQALGTTTDDYILFGDENSENDGQQIISTDIDEIENAMM**VDRKAL**TDDDKRAIRGIIAGYMNSKEK

Rir* (127 aa, 15,2 kDa); mit GST-tag (353 aa, 41,6 kDa)

GPLGSMNESEELLEQFGVSLCEFFSSQWTRDGFDPVNRVYINRDLPTERRLKVLLHELHLEHDPKQYERLREKYEAQANRNMIHELLKNENLDFNRYVHFMEKYNLTTCDETFVKNEYLKLIIET

Coh* (72 aa, 7,6 kDa); mit GST-tag (298 aa, 34,4 kDa)

GPLGSMTEVVPKITIKELRARHNLQEEFAKSVGTTTPQTVSAWEKNQLSISPKNMVVICNKYNIQSSDLYGI

RecA* *S. therm.* J34 (389 aa, 41,9 kDa); mit GST-tag (615 aa, 68,3 kDa)

GPLGSMAKKTKKTEETKFKFGDERRKALDDALKNIEKDFGKGVAMRLGERAEQKVQVMSSGSLALDIALGAGGYPKGRIEIEIYGPESGKTTVALHAVAQTQKEGGIAAFIDAHALDPAYAAALGVNIDELLSQPDSGEGGLEIAGKLIDSGAVDLVVDSVAALVPRAEIDGIDGSHVGLQARMMSQAMRKLASINKTKTIAIFINQLREKVGIMFGNPETTPGGRALKFYASVRLDVRGNTQIKGTGDKKQNVGKETKIKVVKNKVAPPFKEAFVEIMYGGESQTELVKIASDIGI IQKAGAWFSYNGEKIGQGSSENAKYLADHPEIFAEIDHKVRVHYGLVELDEDDVVEDTQVEDTQVEDTSELI LLDLDSTIEIEE

RecA *E. coli* ER2502 NEB (353 aa, 37,9 kDa)

MAIDENKQKALAAALGQIEKQFGKGSIMRLGEDRSMDVETISTGSLSLDIALGAGGLPMGRIVEIYGPESGKTTTLTLQVIAAAQREGKTCAFIDAHALDPIYARKLGVINDNLLCSQPDTEGQALEICDALARSQAVDVVVDSVAALTPKAEIEGEIGDSHMGLAARMMSQAMRKLKAGNLKQSNLLIFINQIRMKI GVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKEGENVVGSETRVKVVKNKIAAPFKQAEFQILYEGEINFYGELVDLVGVEKLEKAGAWYSYKGEKIGQGANATAWLKDNPETAKEIEKKVRELLLSNPNSTPDFSVDDSEGVAETNEDF

HdiR* *S. therm.* J34 (229 aa, 26,4 kDa); mit GST-tag (460 aa, 53,2 kDa)

GPLGS**MFSGQ**RLKEIREAQGMSQASVAKHLGISRSSFYFNWENGKTKPNQKNLSVLAELFGVAETYFLSEHEIVEVYLELNEENRQEALRFTKALLEEQEAEEKKSPVIPLEYSYKVFERLS**AG**TGYTYFGDGNVDEVFYDEEIDHDFASWVFGDSMEPTYLNGEVVLIKQGTGFDYDGDVYAVDWDGQTYIK**KVY**REEDGLRLVSLNKRYPGDKFAPYDEDPRIIGKIVGNF**MPIEA**

LexA* *E. coli* BL21 (DE3) (207 aa, 22,4 kDa); mit GST-tag (433 aa, 49,2 kDa)

GPLGSMKALTARQQEVFDLIRDHISQTMPPTRAEIAQRLGFRSPNAAEEHLKALARKGVIEIVSGASRGIRLLQEEEEGLPLVGRVA**AGE**PLLAQQHIEGHYQVDPFLFKPNADFLLRVSGMSMKDIGIMDGDLLAVHKTDVVRNGQVVVARIDDEVTV**KRLK**QGNKVELLPENSEFKPIVVDLRQQSFTIEGLAVGVIIRNGDWL

Abb. 64. Aminosäuresequenzen der aufgereinigten Proteine mit und ohne (*) GST-tag und des RecA-Proteins aus *E. coli* ER2502 (NEB). Der GST-tag mit der Erkennungssequenz der *PreScission*TM Protease 'LEVLFGQ' (schwarz) ist in hellrot gezeigt. Die Spaltung erfolgt zwischen 'Q' und 'G', sodass die fünf Aminosäuren 'GPLGS' (grün) am N-Terminus der Proteine verbleiben. Punktmutationen sind in hellblau dargestellt. RecA-Autoproteolyse-Spaltstellen 'AG' sind in rot und die katalytisch aktiven Aminosäuren Serin (S) und Lysin (K) in orange dargestellt.

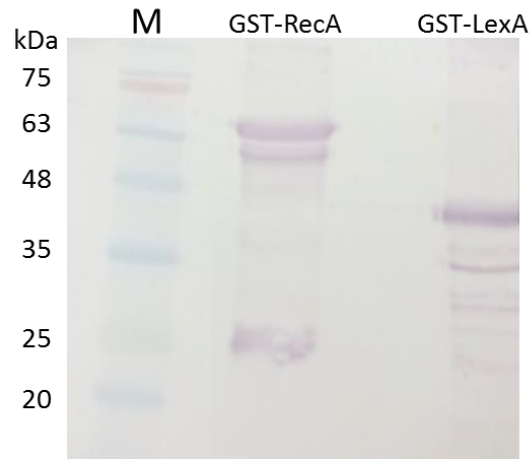


Abb. 65. Aufgereinigte Proteine GST-RecA und GST-LexA mit zusätzlichen, durch Anti-GST auf einem *Western Blot* detektierten Proteinfragmenten. Das Eluat von GST-RecA zeigt mit einer direkt unter dem eigentlichen GST-Fusionsprotein auftretenden Bande ein ähnliches Bandenmuster wie die Eluate von GST-Crh M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

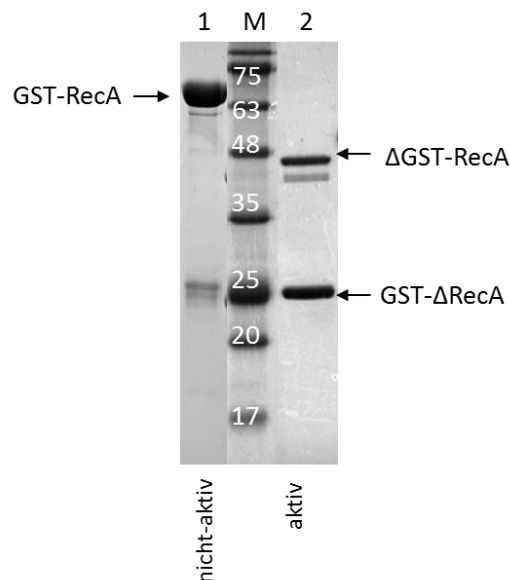


Abb. 66. Spaltung von GST-RecA aus *S. thermophilus* J34f-2 in Δ GST-RecA und GST- Δ RecA im Zuge der Aktivierung gezeigt auf einer 12%igen SDS-PAGE. Nicht-aktives GST-RecA zeigt eine Größe von etwa 68 kDa (1), während über Nacht aktiviertes GST-RecA in zwei Fragmente zerfiel (2). M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

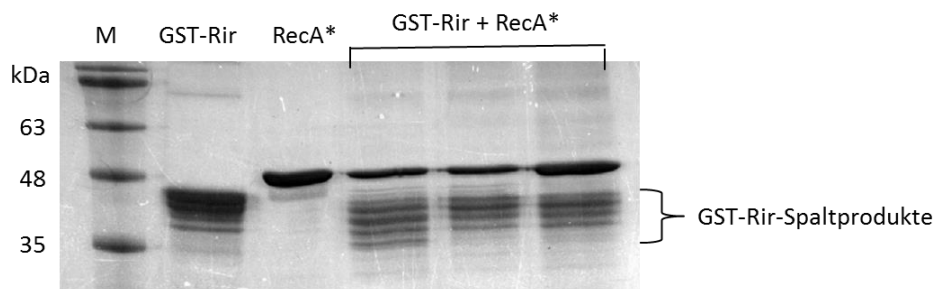
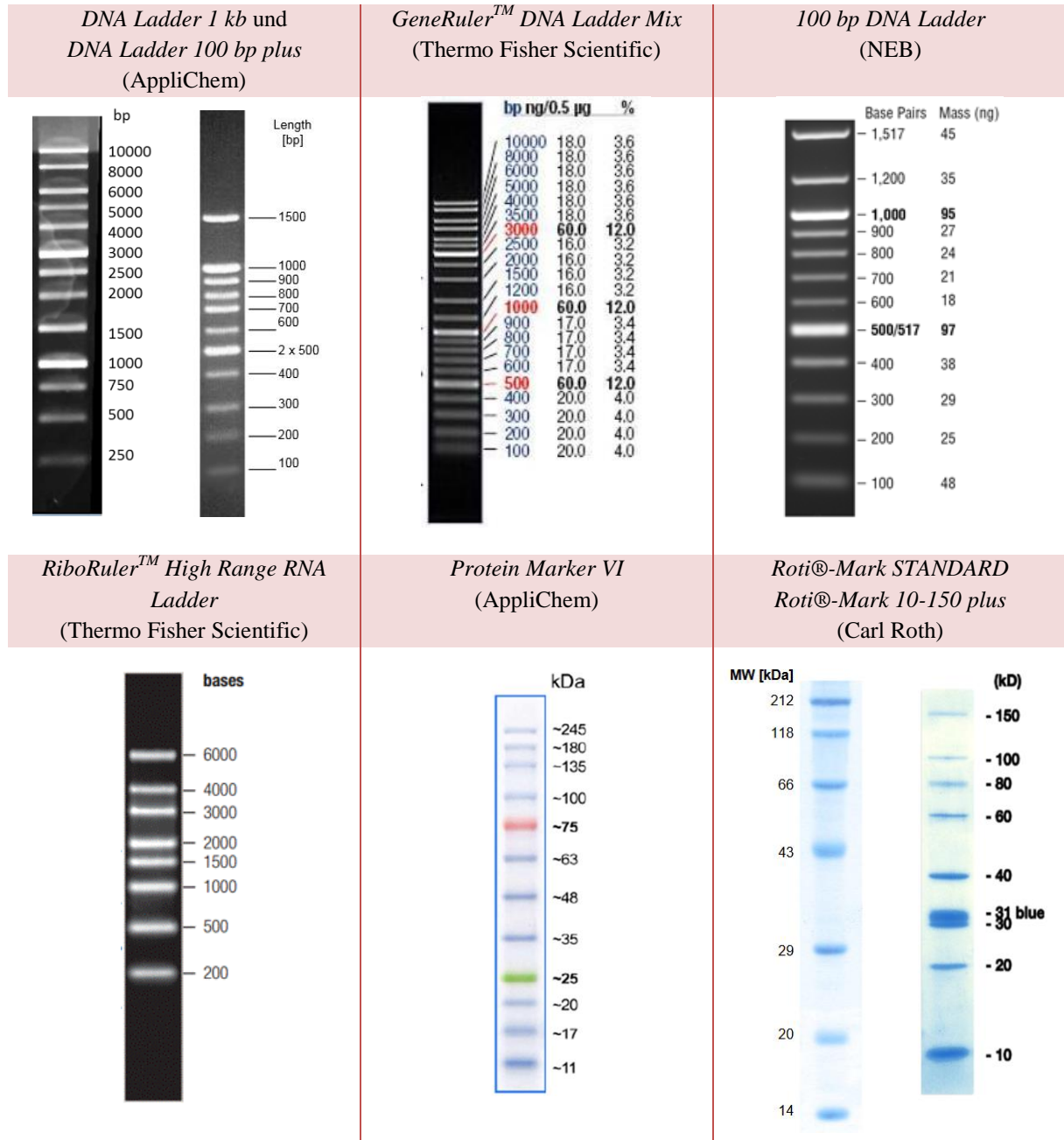


Abb. 67. Spaltung von GST-Rir (42 kDa) in Ansätzen mit aktiviertem RecA* (ohne GST-tag, 42 kDa) aus *S. thermophilus* J34f-2 gezeigt auf einer 12%igen SDS-PAGE. M: *Protein Marker VI* (AppliChem).

Größenstandards

Tab. 36. Verwendete DNA-, RNA- und Protein-Größenstandards.



10 Literaturverzeichnis

- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G. und Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **1** (2), S. 66–85.
- Ackermann, H. W. (1998). Tailed bacteriophages: The order *Caudovirales*. *Adv Virus Res* **51**, S. 135–201.
- Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol* **146** (5), S. 843–857.
- Ackermann, H. W. (2011). Bacteriophage taxonomy. *Microbiol Aust* **32** (2), S. 90–94.
- Ackermann, H. W. und Eisenstark, A. (1974). The present state of phage taxonomy. *Intervirology* **3** (4), S. 201–219.
- Ackermann, H.-W. (2007). 5500 phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* **152** (2), S. 227–243.
- Adams, M. H. (Hg.) (1959). Bacteriophages. New York, N.Y. Interscience Publishers, Inc.
- Aksyuk, A. A., Leiman, P. G., Kurochkina, L. P., Shneider, M. M., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V. und Rossmann, M. G. (2009). The tail sheath structure of bacteriophage T4: a molecular machine for infecting bacteria. *The EMBO Journal* **28** (7), S. 821–829.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th edition. DNA-binding motifs in gene regulatory proteins. New York. Garland Science.
- Ali, Y., Koberg, S., Heßner, S., Sun, X., Rabe, B., Back, A., Neve, H. und Heller, K. J. (2014). Temperate *Streptococcus thermophilus* phages expressing superinfection exclusion proteins of the Ltp type. *Front Microbiol* **5**, S. 98.
- Alsing, A., Pedersen, M., Sneppen, K. und Hammer, K. (2011). Key players in the genetic switch of bacteriophage TP901-1. *Biophys J* **100** (2), S. 313–321.
- Anderson, D. G. und McKay, L. L. (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA. *Appl Environ Microbiol* **46** (3), S. 549–552.
- Atamer, Z., Dietrich, J., Müller-Merbach, M., Neve, H., Heller, K. J. und Hinrichs, J. (2009). Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int Dairy J* **19** (4), S. 228–235.
- Atamer, Z. und Hinrichs, J. (2010). Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. *Int Dairy J* **20** (3), S. 163–168.
- Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K. J. und Hinrichs, J. (2013). Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Front Microbiol* **4**, S. 191.
- Auchtung, J. M., Lee, C. A., Garrison, K. L. und Grossman, A. D. (2007). Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **64** (6), S. 1515–1528.
- Autenrieth, I. B.; Bergheim, I.; Blank, R.; Blaut, M.; Bischoff, S. C. (2009). Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. Thieme.
- Babic, A. C. und Little, J. W. (2007). Cooperative DNA binding by CI repressor is dispensable in a phage lambda variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (45), S. 17741–17746.
- Baker, J., Limberger, R., Schneider, S. J. und Campbell, A. (1991). Recombination and modular exchange in the genesis of new lambdoid phages. *New Biol* **3** (3), S. 297–308.

- Banks, D. J., Lei, B. und Musser, J. M. (2003). Prophage induction and expression of prophage-encoded virulence factors in group A *Streptococcus* serotype M3 strain MGAS315. *Infect Immun* **71** (12), S. 7079–7086.
- Barondess, J. J. und Beckwith, J. (1990). A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature* **346** (6287), S. 871–874.
- Barrangou, R. und Horvath, P. (2012). CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annu Rev Food Sci Technol* **3**, S. 143–162.
- Bebeacua, C., Lorenzo Fajardo, J. C., Blangy, S., Spinelli, S., Bollmann, S., Neve, H., Cambillau, C. und Heller, K. J. (2013). X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J34 and identification of the tape measure protein as its target. *Mol Microbiol* **89** (1), S. 152–165.
- Bednarz, M., Halliday, J. A., Herman, C. und Golding, I. (2014). Revisiting bistability in the lysis/lysogeny circuit of bacteriophage lambda. *PloS one* **9** (6), e100876.
- Benedik, M., Mascarenhas, D. und Campbell, A. (1983). The integrase promoter and T'I terminator in bacteriophages lambda and 434. *Virology* **126** (2), S. 658–668.
- Berzigotti, S., Benlafya, K., Sepulchre, J., Amoroso, A. und Joris, B. (2012). *Bacillus licheniformis* BlaR1 L3 loop is a zinc metalloprotease activated by self-proteolysis. *PloS one* **7** (5), e36400.
- Bokelmann, I. (2003). Analyse der Wechselwirkungen zwischen dem Prophagen TP-J34 und dem Wirtsbakterium *Streptococcus thermophilus*. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut.
- Bondy-Denomy, J., Garcia, B., Strum, S., Du, M., Rollins, M. F., Hidalgo-Reyes, Y., Wiedenheft, B., Maxwell, K. L. und Davidson, A. R. (2015). Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature* **526** (7571), S. 136–139.
- Bose, B., Auchtung, J. M., Lee, C. A. und Grossman, A. D. (2008). A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis. *Mol Microbiol* **70** (3), S. 570–582.
- Bose, B. und Grossman, A. D. (2011). Regulation of horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis* by activation of a conserved site-specific protease. *J Bacteriol* **193** (1), S. 22–29.
- Botstein, D. (1980). A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann N Y Acad Sci* **354**, S. 484–490.
- Boyce, J. D., Davidson, B. E. und Hillier, A. J. (1995). Identification of prophage genes expressed in lysogens of the *Lactococcus lactis* bacteriophage BK5-T. *Appl Environ Microbiol* **61** (11), S. 4099–4104.
- Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol Rev* **31** (4), S. 230–314.
- Brüssow, H. (2001). Phages of dairy bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, S. 283–303.
- Brüssow, H., Bruttin, A., Desiere, F., Lucchini, S. und Foley, S. (1998). Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages--a review. *Virus Genes* **16** (1), S. 95–109.
- Bruttin, A. und Brüssow, H. (1996). Site-specific spontaneous deletions in three genome regions of a temperate *Streptococcus thermophilus* phage. *Virology* **219** (1), S. 96–104.

- Bruttin, A., Desiere, F., d'Amico, N., Guérin, J. P., Sidoti, J., Huni, B., Lucchini, S. und Brüssow, H. (1997a). Molecular ecology of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage infections in a cheese factory. *Appl Environ Microbiol* **63** (8), S. 3144–3150.
- Bruttin, A., Desiere, F., Lucchini, S., Foley, S. und Brüssow, H. (1997b). Characterization of the lysogeny DNA module from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage phi Sfi21. *Virology* **233** (1), S. 136–148.
- Bruttin, A., Foley, S. und Brüssow, H. (2002). DNA-Binding Activity of the *Streptococcus thermophilus* Phage Sfi21 Repressor. *Virology* **303** (1), S. 100–109.
- Bullwinkle, T. J., Samorodnitsky, D., Rosati, R. C. und Koudelka, G. B. (2012). Determinants of bacteriophage 933W repressor DNA binding specificity. *PLoS ONE* **7** (4), e34563.
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hg.) (2010). Milch – Das vielseitigste Nahrungsmittel der Welt, zuletzt aktualisiert am 04.06.2010.
- Callanan, M. J. und Klaenhammer, T. R. (2001). Bacteriophages in industry. In: Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A. und Brüssow, H. (2003). Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **67** (2), S. 238.
- Chen, Z. (1998). Amplification of closed circular DNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res* **26** (4), S. 1126–1127.
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L. und Brüssow, H. (2004). Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol* **186** (12), S. 3677–3686.
- Clokic, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V. und Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage* **1** (1), S. 31–45.
- Coffey, B., Mills, S., Coffey, A., McAuliffe, O. und Ross, R. P. (2010). Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications. *Annu Rev Food Sci Technol* **1** (1), S. 449–468.
- Cooper, G. M. (2000). The cell. A molecular approach. 2nd ed. Washington, D.C., Sunderland, Mass. ASM Press; Sinauer Associates.
- Cornejo, O. E., Lefebure, T., Bitar, P. D., Lang, P., Richards, V. P., Eilertson, K., Do, T., Beighton, D., Zeng, L. *et al.* (2013). Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol* **30** (4), S. 881–893.
- Cuesta, P., Suarez, J. E. und Rodriguez, A. (1995). Incidence of lysogeny in wild lactococcal strains. *J Dairy Sci* **78** (5), S. 998–1003.
- Cumby, N., Edwards, A. M., Davidson, A. R. und Maxwell, K. L. (2012). The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein. *J Bacteriol* **194** (18), S. 5012–5019.
- d'Hérelle, F. (1917). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. *C R Acad Sci* (165), S. 373–375.
- Das, M., Ganguly, T., Chattoraj, P., Chanda, P. K., Bandhu, A., Lee, C. Y. und Sau, S. (2007). Purification and characterization of repressor of temperate *S. aureus* phage ϕ 11. *J Biochem Mol Biol* **40** (5), S. 740–748.
- del Río, B., Cruz Martín, M., Ladero, V., Martínez, N., M. Linares, D., Fernández, M. und Alvarez, M. (2012). Bacteriophages in dairy industry: PCR Methods as Valuable Tools. In: Ipek Kurtbke (Hg.): Bacteriophages: InTech.

- Delcour, J., Ferain, T. und Hols, P. (2000). Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **11** (5), S. 497–504.
- 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** (2), S. 345–356.
- Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M. und Brüßow, H. (2002). Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82** (1/4), S. 73–91.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.-E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P. und Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190** (4), S. 1390–1400.
- Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M.-C. und Moineau, S. (2006). Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl Environ Microbiol* **72** (6), S. 4338–4346.
- Devigne, A., Ithurbide, S., Bouthier de la Tour, Claire, Passot, F., Mathieu, M., Sommer, S. und Servant, P. (2015). DdrO is an essential protein that regulates the radiation desiccation response and the apoptotic-like cell death in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium. *Mol Microbiol* **96** (5), S. 1069–1084.
- Donnelly-Wu, M. K., Jacobs, W. R., JR und Hatfull, G. F. (1993). Superinfection immunity of mycobacteriophage L5: Applications for genetic transformation of mycobacteria. *Mol Microbiol* **7** (3), S. 407–417.
- Donner, A. L., Carlson, P. A. und Koudelka, G. B. (1997). Dimerization specificity of P22 and 434 repressors is determined by multiple polypeptide segments. *J Bacteriol* **179** (4), S. 1253–1261.
- Du Toit, M., Huch, M., Cho, G.-S. und Franz, C. M. (2014). The Genus *Streptococcus*. In: Holzapel, Wood (Hg.) 2014 – Lactic Acid Bacteria, S. 457–505.
- Duplessis, M. und Moineau, S. (2001). Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol Microbiol* **41** (2), S. 325–336.
- Dupont, K., Vogensen, F. K., Neve, H., Bresciani, J. und Josephsen, J. (2004). Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **70** (10), S. 5818–5824.
- Dupuis, M.-E., Villion, M., Magadan, A. H. und Moineau, S. (2013). CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nat Commun* **4**, S. 2087.
- Dyson, Z. A., Tucci, J., Seviour, R. J. und Petrovski, S. (2016). Isolation and characterization of bacteriophage SPI1, which infects the activated-sludge-foaming bacterium *Skermania pini-formis*. *Arch Virol* (161 (1)), S. 149–158.
- Earl, A. M., Mohundro, M. M., Mian, I. S. und Battista, JR (2002). The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression. *J Bacteriol* **184** (22), S. 6216–6224.
- Eberwine, J. (Hg.) (1999). Regulation of transcription by transcription factors in basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. Unter Mitarbeit von G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers und et al. 6. Aufl. Philadelphia [u.a.]. Lippincott - Raven.

- Eguchi, Y., Ogawa, T. und Ogawa, H. (1988). Cleavage of bacteriophage phi 80 CI repressor by RecA protein. *J Mol Biol* **202** (3), S. 565–573.
- Engel, G., Altermann, E., Klein, J. R. und Henrich, B. (1998). Structure of a genome region of the *Lactobacillus gasseri* temperate phage ϕ adh covering a repressor gene and cognate promoters. *Gene* **210** (1), S. 61–70.
- Engelberg-Kulka, H. und Kumar, S. (2015). Yet another way that phage lambda manipulates its *Escherichia coli* host: λ rexB is involved in the lysogenic-lytic switch. *Mol Microbiol* **96** (4), S. 689–693.
- Erill, I., Campoy, S. und Barbé, J. (2007). Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* **31** (6), S. 637–656.
- Farley, M. M., Tu, J., Kearns, D. B., Molineux, I. J. und Liu, J. (2016). Ultrastructural analysis of bacteriophage Phi29 during infection of *Bacillus subtilis*. *J Struct Biol* (16), S. 1047–8477.
- Faulhaber, K. (2012). Charakterisierung des *orf3*-Genproduktes des temperenten *Streptococcus thermophilus* Phagen TP-J34. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut.
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I. und Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat Rev Microbiol* **13** (10), S. 641–650.
- Fischetti, V. A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* **11** (5), S. 393–400.
- Fogg, P., Colloms, S., Rosser, S., Stark, M. und Smith, Margaret C M (2014). New applications for phage integrases. *J Mol Biol* **426** (15), S. 2703–2716.
- Folimonova, S. Y. (2012). Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein. *J Virol* **86** (10), S. 5554–5561.
- Forde, A. und Fitzgerald, G. (1999). Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. In: W. N. Konings, O. P. Kuipers und J. H. J. Huis In't Veld (Hg.): Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications: Springer Dordrecht Netherlands, S. 89–113.
- Fornelos, N., Bamford, J. K. und Mahillon, J. (2011). Phage-borne factors and host LexA regulate the lytic switch in phage GIL01. *J Bacteriol* **193** (21), S. 6008–6019.
- Fox, Patrick F. (Hg.) (2004). Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. 3. ed. Amsterdam [u.a.]. Elsevier Academic.
- Fuchs, G.; Schlegel, H. G.; Eitinger, T. (2007). Allgemeine Mikrobiologie. 53 Tabellen. 8., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]. Thieme.
- Galkin, V. E., Yu, X., Bielnicki, J., Ndjonka, D., Bell, C. E. und Egelman, E. H. (2009). Cleavage of bacteriophage lambda cI repressor involves the RecA C-terminal domain. *J Mol Biol* **385** (3), S. 779–787.
- Gann, A. (2010). Jacob and Monod: From operons to EvoDevo. *Curr Biol* **20** (17), R718-23.
- García, P., Ladero, V., Alonso, J. C. und Suárez, J. E. (1999). Cooperative interaction of CI protein regulates lysogeny of *Lactobacillus casei* by bacteriophage A2. *J Virol* **73** (5), S. 3920–3929.
- Garneau, J. E. und Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb Cell Fact* **10**, S. S20.

- Ghosh, D., Roy, K., Williamson, K. E., Srinivasiah, S., Wommack, K. E. und Radosevich, M. (2009). Acyl-homoserine lactones can induce virus production in lysogenic bacteria: an alternative paradigm for prophage induction. *Appl Environ Microbiol* **75** (22), S. 7142–7152.
- Giese, K. C., Michalowski, C. B. und Little, J. W. (2008). RecA-dependent cleavage of LexA dimers. *J Mol Biol* **377** (1), S. 148–161.
- Giliberti, G., Baccigalupi, L., Cordone, A., Ricca, E. und Felice, M. de (2006). Transcriptional analysis of the recA gene of *Streptococcus thermophilus*. *Microb Cell Fact* **5**, S. 29.
- González-Huici, V., Salas, M. und Hermoso, J. M. (2004). The push-pull mechanism of bacteriophage Ø29 DNA injection. *Mol Microbiol* **52** (2), S. 529–540.
- Griffith, J., Hochschild, A. und Ptashne, M. (1986). DNA loops induced by cooperative binding of lambda repressor. *Nature* **322** (6081), S. 750–752.
- Griffiths, A. J. F. (2000). An introduction to genetic analysis. Lambda phage: a complex of operons. 7th ed. New York. W.H. Freeman.
- Guglielmotti, D. M., Deveau, H., Binetti, A. G., Reinheimer, J. A., Moineau, S. und Quiberoni, A. (2009). Genome analysis of two virulent *Streptococcus thermophilus* phages isolated in Argentina. *Int J Food Microbiol* **136** (1), S. 101–109.
- Guglielmotti, D. M., Mercanti, D. J., Reinheimer, J. A. und Quiberoni, A. (2011). Review: Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front Microbiol* **2**.
- Guigas, C., Faulhaber, K., Duerbeck, D., Neve, H. und Heller, K. J. (2015). Prophage-mediated modulation of interaction of *Streptococcus thermophilus* J34 with human intestinal epithelial cells and its competition against human pathogens. *Benef Microbes*, S. 1–10.
- Guo, T., Xin, Y., Zhang, C., Ouyang, X. und Kong, J. (2016). The potential of the endolysin Lysdb from *Lactobacillus delbrueckii* phage for combating *Staphylococcus aureus* during cheese manufacture from raw milk. *Appl Microbiol Biotechnol* **100** (8), S. 3545–3554.
- Hackbarth, C. J. und Chambers, H. F. (1993). blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **37** (5), S. 1144–1149.
- Hammerl, J. A., Jackel, C., Lanka, E., Roschanski, N. und Hertwig, S. (2016). Binding specificities of the telomere phage ΦKO2 prophage repressor CB and lytic repressor Cro. *Viruses* **8** (8).
- Hammerl, J. A., Roschanski, N., Lurz, R., Johne, R., Lanka, E. und Hertwig, S. (2015). The molecular switch of telomere phages: High binding specificity of the PY54 Cro lytic repressor to a single operator site. *Viruses* **7** (6), S. 2771–2793.
- Häuser, R., Blasche, S., Dokland, T., Haggård-Ljungquist, E., Brunn, A. von, Salas, M., Casjens, S., Molineux, I. und Uetz, P. (2012). Bacteriophage protein–protein interactions. *Adv Virus Res* **83**, S. 219–298.
- Helfrich, S., Pfeifer, E., Kramer, C., Sachs, C. C., Wiechert, W., Kohlheyer, D., Noh, K. und Frunzke, J. (2015). Live cell imaging of SOS and prophage dynamics in isogenic bacterial populations. *Mol Microbiol* **98** (4), S. 636–650.
- Heller, K. J. (1992). Molecular interaction between bacteriophage and the gram-negative cell envelope. *Arch Microbiol* **158** (4), S. 235–248.
- Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr* **73** (2), S. 374–379.

- Heller, K. J. (2005). Mikrobiologie der Lebensmittelfermentationen. In: G. Antranikian (Hg.): *Angewandte Mikrobiologie. Mikrobiologie der Lebensmittelfermentationen*: Springer Berlin Heidelberg, S. 511–528.
- Heller, K. J.; Loessner, M. J.; Fieseler, L. (2011). Bakteriophagen. Grundlagen, Rolle in Lebensmitteln und Anwendungen zum Nachweis sowie der Kontrolle von Krankheitserregern. 1. Aufl. Behr's Hamburg (*Pathogene Mikroorganismen*).
- Heller, K. J. und Neve, H. (2014). *Superinfection exclusion* und DNA-Injektion bei *Siphoviridae*-Phagen. *BIOSpektrum, Springer-Verlag* **20** (01.14).
- Hellman, L. M. und Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* **2** (8), S. 1849–1861.
- Hirayama, K. und Rafter, J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* **2** (6), S. 681–686.
- Holo, H. und Nes, I. F. (1995). Transformation of *Lactococcus* by electroporation. *Methods Mol Biol* **47**, S. 195–199.
- Holzappel, W. und Wood, B. (2012). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer US.
- Hu, L., Yang, L., Lipchik, A. M., Geahlen, R. L., Parker, L. L. und Tao, W. A. (2013). A quantitative proteomics-based competition binding assay to characterize pITAM-protein interactions. *Anal Chem* **85** (10), S. 5071–5077.
- Husson-Kao, C., Mengaud, J., Cesselin, B., van Sinderen, D., Benbadis, L. und Chapot-Chartier, M.-P. (2000). The *Streptococcus thermophilus* autolytic phenotype results from a leaky prophage. *Appl Environ Microbiol* **66** (2), S. 558–565.
- Jansen, R., Embden, Jan. D. A. van, Gaastra, W. und Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* **43** (6), S. 1565–1575.
- Jongeneel, C., Bouvier, J. und Bairoch, A. (1989). A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Letters* **242** (2), S. 211–214.
- Josephsen, J. und Neve, H. (1998). Bacteriophages and lactic acid bacteria. In: Salminen, S, Wright, S eds. *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker Inc., New York, US., S. 385–436.
- Kabuki, T., Uenishi, H., Watanabe, M., Seto, Y. und Nakajima, H. (2007). Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *J Appl Microbiol* **102** (4), S. 971–980.
- Kakikawa, M., Ohkubo, S., Syama, M., Taketo, A. und Kodaira, K. I. (2000). The genetic switch for the regulatory pathway of *Lactobacillus plantarum* phage (phi)g1e: characterization of the promoter P(L), the repressor gene *cpg*, and the *cpg*-encoded protein Cpg in *Escherichia coli*. *Gene* **242** (1-2), S. 155–166.
- Karlin, S. und Brocchieri, L. (1996). Evolutionary conservation of RecA genes in relation to protein structure and function. *J Bacteriol* **178** (7), S. 1881–1894.
- Kenny, J. G., Leach, S., de la Hoz, Ana B, Venema, G., Kok, J., Fitzgerald, G. F., Nauta, A., Alonso, J. C. und van Sinderen, D. (2006). Characterization of the lytic-lysogenic switch of the lactococcal bacteriophage Tuc2009. *Virology* **347** (2), S. 434–446.
- Khan Mirzaei, M. und Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS ONE* **10** (3), S. e0118557.

- Kim, M. und Ryu, S. (2013). Antirepression system associated with the life cycle switch in the temperate *Podoviridae* phage SPC32H. *J Virol* **87** (21), S. 11775–11786.
- Koberg, S. (2012). Charakterisierung des Repressor Proteins Crh des temperenten *Streptococcus thermophilus* Phagen TP-J34. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut.
- König, Helmut; Unden, Gottfried; Fröhlich, Jürgen (Hg.) (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer Berlin Heidelberg.
- Koudelka, A. P., Hufnagel, L. A. und Koudelka, G. B. (2004). Purification and Characterization of the Repressor of the Shiga Toxin-Encoding Bacteriophage 933W: DNA Binding, Gene Regulation, and Autocleavage. *J Bacteriol* **186** (22), S. 7659–7669.
- Krusch, U., Neve, H., Luschei, B. und Teuber, M. (1987). Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy. Kiel. *Milchwirtsch. Forschungsber.* **39**, S. 155–167.
- Labrie, S. J. und Moineau, S. (2007). Abortive infection mechanisms and prophage sequences significantly influence the genetic makeup of emerging lytic lactococcal phages. *J Bacteriol* **189** (4), S. 1482–1487.
- Labrie, S. J., Samson, J. E. und Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* **8** (5), S. 317–327.
- Ladero, V., García, P., Bascarán, V., Herrero, M., Alvarez, M. A. und Suárez, J. E. (1998). Identification of the repressor-encoding gene of the *Lactobacillus* bacteriophage A2. *J Bacteriol* **180** (13), S. 3474–3476.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), S. 680–685.
- Lahtinen, S. (2012). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 4th ed. Boca Raton, FL. CRC Press.
- Le Marrec, C., van Sinderen, D., Walsh, L., Stanley, E., Vlegels, E., Moineau, S., Heinze, P., Fitzgerald, G. und Fayard, B. (1997). Two groups of bacteriophages infecting *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. *Appl Environ Microbiol* **63** (8), S. 3246–3253.
- Lecomte, X., Gagnaire, V., Lortal, S., Dary, A. und Genay, M. (2016). *Streptococcus thermophilus*, an emerging and promising tool for heterologous expression: Advantages and future trends. *Food Microbiol* **53** (Pt A), S. 2–9.
- Lemire, S., Figueroa-Bossi, N. und Bossi, L. (2011). Bacteriophage crosstalk: coordination of prophage induction by trans-acting antirepressors. *PLoS Genet* **7** (6), S. e1002149.
- Levesque, C., Duplessis, M., Labonte, J., Labrie, S., Fremaux, C., Tremblay, D. und Moineau, S. (2005). Genomic organization and molecular analysis of virulent bacteriophage 2972 infecting an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain. *Appl Environ Microbiol* **71** (7), S. 4057–4068.
- Li, M., McClure, W. R. und Susskind, M. M. (1997). Changing the mechanism of transcriptional activation by phage repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (8), S. 3691–3696.
- Little, J. W. (1984). Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** (5), S. 1375–1379.
- Little, J. W., Mount, D. W. und Yanisch-Perron, C. R. (1981). Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78** (7), S. 4199–4203.

- Little, J. W., Shepley, D. P. und Wert, D. W. (1999). Robustness of a gene regulatory circuit. *The EMBO Journal* **18** (15), S. 4299–4307.
- Liu, M., Bischoff, K. M., Gill, J. J., Mire-Criscione, M. D., Berry, J. D., Young, R. und Summer, E. J. (2015). Bacteriophage application restores ethanol fermentation characteristics disrupted by *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnol Biofuels* **8**, S. 132.
- Lobocka, M. B., Svarchevsky, A. N., Rybchin, V. N. und Yarmolinsky, M. B. (1996). Characterization of the primary immunity region of the *Escherichia coli* linear plasmid prophage N15. *J Bacteriol* **178** (10), S. 2902–2910.
- Lopez-Gallego, F., Guisan, J. M. und Betancor, L. (2013). Glutaraldehyde-mediated protein immobilization. *Methods Mol Biol* **1051**, S. 33–41.
- Los, M. und Wegrzyn, G. (2012). Pseudolysogeny. *Adv Virus Res* **82**, S. 339–349.
- Lucchini, S., Desiere, F. und Brussow, H. (1999a). Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. *J Virol* **73** (10), S. 8647–8656.
- Lucchini, S., Desiere, F. und Brussow, H. (1999b). Similarly organized lysogeny modules in temperate Siphoviridae from low GC content gram-positive bacteria. *Virology* **263** (2), S. 427–435.
- Lucchini, S., Desiere, F. und Brussow, H. (1999c). The genetic relationship between virulent and temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages: whole genome comparison of cosite phages Sfi19 and Sfi21. *Virology* **260** (2), S. 232–243.
- Lucchini, S., Desiere, F. und Brüssow, H. (1998). The structural gene module in *Streptococcus thermophilus* bacteriophage phi Sfi11 shows a hierarchy of relatedness to *Siphoviridae* from a wide range of bacterial hosts. *Virology* **246** (1), S. 63–73.
- Ludanyi, M., Blanchard, L., Dulermo, R., Brandelet, G., Bellanger, L., Pignol, D., Lemaire, D. und Groot, A. de (2014). Radiation response in *Deinococcus deserti*: IrrE is a metalloprotease that cleaves repressor protein DdrO. *Mol Microbiol* **94** (2), S. 434–449.
- Madera, C., Monjardín, C. und Suárez, J. E. (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl Environ Microbiol* **70** (12), S. 7365–7371.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Brock, T. D. (2006). Brock Mikrobiologie. 11., überarb. Aufl. München [u.a.]. Pearson Studium (*Bc Biologie, Chemie*).
- Madsen, S. M., Mills, D., Djordjevic, G., Israelsen, H. und Klaenhammer, T. R. (2001). Analysis of the genetic switch and replication region of a P335-type bacteriophage with an obligate lytic lifestyle on *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **67** (3), S. 1128–1139.
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S. D. und Gruss, A. (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **178** (3), S. 931–935.
- Mahony, J., Ainsworth, S., Stockdale, S. und van Sinderen, D. (2012). Phages of lactic acid bacteria: the role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. *Virology* **434** (2), S. 143–150.
- Mahony, J., McDonnell, B., Casey, E. und van Sinderen, D. (2016). Phage-Host Interactions of Cheese-Making Lactic Acid Bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol* **7**, S. 267–285.
- Mahony, J., McGrath, S., Fitzgerald, G. F. und van Sinderen, D. (2008). Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. *Appl Environ Microbiol* **74** (20), S. 6206–6215.

- Mahony, J. und van Sinderen, D. (2014). Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Front Microbiol* **5**.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M. *et al.* (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* **43** (Database issue), S. 6.
- Marcó, M. B., Moineau, S. und Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* **2** (3), S. 149–158.
- Mardanov, A. V. und Ravin, N. V. (2007). The antirepressor needed for induction of linear plasmid-prophage N15 belongs to the SOS regulon. *J Bacteriol* **189** (17), S. 6333–6338.
- Martín, M. C., Ladero, V. und Alvarez, M. A. (2006). PCR identification of lysogenic *Lactococcus lactis* strains. *J Verbr Lebensm* **1** (2), S. 121–124.
- Martinez, E., Campos-Gomez, J. und Barre, F.-X. (2016). CTXvarphi: Exploring new alternatives in host factor-mediated filamentous phage replications. *Bacteriophage* **6** (2), e1128512.
- McCabe, B. C., Pawlowski, D. R. und Koudelka, G. B. (2005). The bacteriophage 434 repressor dimer preferentially undergoes autoproteolysis by an intramolecular mechanism. *J Bacteriol* **187** (16), S. 5624–5630.
- McDonnell, B., Mahony, J., Neve, H., Hanemaaijer, L., Noben, J.-P., Kouwen, T. und van Sinderen, D. (2016). Identification and analysis of a novel group of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **82** (17), S. 5153–5165.
- McGrath, S. und van Sinderen, D. (2007). Bacteriophage. Genetics and molecular biology. Norfolk. Caister Academic Press.
- McLaughlin, R. E. und Ferretti, J. J. (1995). Electrotransformation of streptococci. *Methods Mol Biol* **47**, S. 185–193.
- McNair, K., Bailey, B. A. und Edwards, R. A. (2012). PHACTS, a computational approach to classifying the lifestyle of phages. *Bioinformatics* **28** (5), S. 614–618.
- Mercanti, D. J., Ackermann, H.-W. und Quiberoni, A. (2015). Characterization of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages: morphology, kinetics and adsorption. *Intervirology* **58** (1), S. 49–56.
- Mercanti, D. J., Carminati, D., Reinheimer, J.-A. und Quiberoni, A. (2011). Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *Int J Food Microbiol* **144** (3), S. 503–510.
- Mercenier, A., Pouwels, P. H. und Chassy, B. M. (1994). Genetic engineering of lactobacilli, leuconostocs and *Streptococcus thermophilus*. In: M. J. Gasson und W. M. de Vos (Hg.): Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria: Springer Netherlands, S. 252–293.
- Michalowski, C. B. und Little, J. W. (2005). Positive autoregulation of cI is a dispensable feature of the phage lambda gene regulatory circuitry. *J Bacteriol* **187** (18), S. 6430–6442.
- Michel, B. (2005). After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol* **3** (7).
- Milchindustrie-Verband e.V. (Hg.) (2015). Deutschland: Pro-Kopf-Verbrauch von Milchprodukten, zuletzt aktualisiert am Juli 2016.
- Mills, S., Griffin, C., O'Sullivan, O., Coffey, A., McAuliffe, O. E., Meijer, W. C., Serrano, L. M. und Ross, R. P. (2011). A new phage on the 'Mozzarella' block: Bacteriophage 5093

- shares a low level of homology with other *Streptococcus thermophilus* phages. *Int Dairy J* **21** (12), S. 963–969.
- Mohamed, M. D. A. (2010). Genomic analysis of the lysogeny module of temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage TP-J34. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut.
- Moineau, S. (1999). Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76** (1-4), S. 377–382.
- Moineau, S. und Lévesque, C. (2004). Control of bacteriophages in industrial fermentations. In: *Bacteriophages*: CRC Press.
- Moineau, S., Walker, S. A., Holler, B. J., Vedamuthu, E. R. und Vandenberg, P. A. (1995). Expression of a *Lactococcus lactis* phage resistance mechanism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **61** (7), S. 2461–2466.
- Moldovan, R., Chapman-McQuiston, E. und Wu, X. L. (2007). On kinetics of phage adsorption. *Biophys J* **93** (1), S. 303–315.
- Mooney, D. T., Jann, M. und Geller, B. L. (2006). Subcellular location of phage infection protein (Pip) in *Lactococcus lactis*. *Can J Microbiol* **52** (7), S. 664–672.
- Morin, T., Martin, H., Soumet, C., Fresnel, R., Lamaudiere, S., Le Sauvage, A L, Deleurme, K. und Maris, P. (2015). Comparison of the virucidal efficacy of peracetic acid, potassium monopersulphate and sodium hypochlorite on bacteriophages P001 and MS2. *J Appl Microbiol* **119** (3), S. 655–665.
- Mozzi, F.; Raya, R. R.; Vignolo, G. M. (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria. Novel applications*. Ames, Iowa. Wiley-Blackwell.
- Munk, K. (2010). *Taschenlehrbuch Biologie: Genetik*. Thieme.
- Murphy, J., Royer, B., Mahony, J., Hoyles, L., Heller, K., Neve, H., Bonestroo, M., Nauta, A. und van Sinderen, D. (2013). Biodiversity of lactococcal bacteriophages isolated from 3 Gouda-type cheese-producing plants. *J Dairy Sci* **96** (8), S. 4945–4957.
- Nanda, A. M., Heyer, A., Krämer, C., Grünberger, A., Kohlheyer, D. und Frunzke, J. (2014). Analysis of SOS-induced spontaneous prophage induction in *Corynebacterium glutamicum* at the single-cell level. *J Bacteriol* **196** (1), S. 180–188.
- Nanda, A. M., Thormann, K. und Frunzke, J. (2015). Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *J Bacteriol* **197** (3), S. 410–419.
- Nauta, A., Sinderen, O., Karsens, H., Smit, E., Venema, G. und Kok, J. (1996). Inducible gene expression mediated by a repressor-operator system isolated from *Lactococcus lactis* bacteriophage r1t. *Mol Microbiol* **19** (6), S. 1331–1341.
- Neve, H., Freudenberg, W., Diestel-Feddersen, F., Ehlert, R. und Heller, K. J. (2003). Biology of the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage TP-J34 and physical characterization of the phage genome. *Virology* **315** (1), S. 184–194.
- Neve, H., Geis, A. und Teuber, M. (1984). Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. *J Bacteriol* **157** (3), S. 833–838.
- Neve, H., Kemper, U. und Geis, A. and Heller, K.J. (1994). Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophage in a dairy plant. *Milchwirtsch. Forschungsber.*, 1994 (46), S. 167–178.

- Neve, H., Krusch, U. und Teuber, M. (1989). Classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yoghurt and Swiss-type cheese. *Appl Microbiol Biotechnol* **30** (6).
- 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 Sfi21: implications for the modular theory of phage evolution. *Virology* **241** (1), S. 61–72.
- Obeng, N., Pratama, A. A. und Elsas, Jan Dirk van (2016). The significance of mutualistic phages for bacterial ecology and evolution. *Trends Microbiol.*
- Ofran, Y. und Rost, B. (2007). ISIS: interaction sites identified from sequence. *Bioinformatics* **23** (2), S. 6.
- Oram, M. und Black, L. W. (2011). Mechanisms of genome packaging (Chapter 11). In: *Structural Virology: The Royal Society of Chemistry*, S. 203–219.
- Paepe, M. de, Hutinet, G., Son, O., Amarir-Bouhram, J., Schbath, S. und Petit, M.-A. (2014). Temperate phages acquire DNA from defective prophages by relaxed homologous recombination: the role of Rad52-like recombinases. *PLoS Genet* **10** (3), S. e1004181.
- Pandey, A., Bringel, F. und Meyer, J.-M. (1994). Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **40** (5), S. 735–739.
- Papp, P. P., Nagy, T., Ferenczi, S., Elo, P., Csiszovszki, Z., Buzas, Z., Patthy, A. und Orosz, L. (2002). Binding sites of different geometries for the 16-3 phage repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (13), S. 8790–8795.
- Patel, M., Jiang, Q., Woodgate, R., Cox, M. M. und Goodman, M. F. (2010). A new model for SOS-induced mutagenesis: How recA protein activates DNA polymerase V. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45** (3), S. 171–184.
- Pedersen, M., Ligowska, M. und Hammer, K. (2010). Characterization of the CI repressor protein encoded by the temperate lactococcal phage TP901-1. *J Bacteriol* **192** (8), S. 2102–2110.
- Pitcher, R. S., Tonkin, L. M., Daley, J. M., Palmbo, P. L., Green, A. J., Velting, T. L., Brzostek, A., Korycka-Machala, M., Cresawn, S. *et al.* (2006). Mycobacteriophage exploit NHEJ to facilitate genome circularization. *Mol Cell* **23** (5), S. 743–748.
- Poeggel, G. (2013). *Kurzlehrbuch Biologie*. 3., überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]. Thieme.
- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Bjorkroth, J. und Ercolini, D. (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Sci* **109**, S. 66–74.
- Ptashne, M. (2004). *A genetic switch. Phage lambda revisited*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Quiberoni, A., Moineau, S., Rousseau, G. M., Reinheimer, J. und Ackermann, H.-W. (2010). *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Int Dairy J* **20** (10), S. 657–664.
- Quiberoni, A., Tremblay, D., Ackermann, H.-W., Moineau, S. und Reinheimer, J. A. (2006). Diversity of *Streptococcus thermophilus* phages in a large-production cheese factory in Argentina. *J Dairy Sci* **89** (10), S. 3791–3799.
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S. und Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol* **59** (3), S. 145–155.

- Ranade, K. und Poteete, A. R. (1993). Superinfection exclusion (sieB) genes of bacteriophages. *J Bacteriol* **175** (15), S. 4712–4718.
- Ratelade, J., Miot, M.-C., Johnson, E., Betton, J.-M., Mazodier, P. und Benaroudj, N. (2009). Production of recombinant proteins in the ion-deficient BL21(DE3) strain of *Escherichia coli* in the absence of the DnaK chaperone. *Appl Environ Microbiol* **75** (11), S. 3803–3807.
- Rawlings, N. D. und Barrett, A. J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol* **248**, S. 183–228.
- Riipinen, K.-A., Raisanen, L. und Alatossava, T. (2007). Integration of the group c phage JCL1032 of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and complex phage resistance of the host. *J Appl Microbiol* **103** (6), S. 2465–2475.
- Roberts, J. W. und Roberts, C. W. (1975). Proteolytic cleavage of bacteriophage lambda repressor in induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** (1), S. 147–151.
- Rohs, R., Jin, X., West, S. M., Joshi, R., Honig, B. und Mann, R. S. (2010). Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **79**, S. 233–269.
- Rufer, A. C., Thiebach, L., Baer, K., Klein, H. W. und Hennig, M. (2005). X-ray structure of glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum* in a new crystal form reveals flexibility of the substrate-binding site. *Acta Crystallogr F* **61** (Pt 3), S. 263–265.
- Salminen, S.; Wright, A. v.; Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 3rd ed., rev. and expanded. New York. Marcel Dekker (*Food science and technology*, 139).
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanozky-Dawes, R., Selle, K., O'Flaherty, S., Klaenhammer, T. und Barrangou, R. (2015). Occurrence and activity of a type II CRISPR-Cas system in *Lactobacillus gasseri*. *Microbiology* **161** (9), S. 1752–1761.
- Sauer, R. T., Ross, M. J. und Ptashne, M. (1982). Cleavage of the lambda and P22 repressors by *recA* protein. *J Biol Chem* **257** (8), S. 4458–4462.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Frees, D., Vogensen, F. K., Palva, A. und Varmanen, P. (2003). Heat and DNA damage induction of the LexA-like regulator HdiR from *Lactococcus lactis* is mediated by RecA and ClpP. *Mol Microbiol* **50** (2), S. 609–621.
- Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Krusch, U. und Neve, H. (1991). Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Syst Appl Microbiol* **14** (4), S. 386–388.
- Scott, J. R. (1975). Superinfection immunity and prophage repression in phage P1. *Virology* **65** (1), S. 173–178.
- Shearwin, K. E., Brumby, A. M. und Egan, J. B. (1998). The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. *J Biol Chem* **273** (10), S. 5708–5715.
- Shenker, J. Q. und Lin, M. M. (2015). Cooperativity leads to temporally-correlated fluctuations in the bacteriophage lambda genetic switch. *Front Plant Sci* **6**.
- Siezen, R. J., Bayjanov, J., Renckens, B., Wels, M., van Hijum, S. A., Molenaar, D. und van Hylckama Vlieg, J. E. (2010). Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. *J Bacteriol* **192** (10), S. 2649–2650.

- Silanikove, N., Leitner, G. und Merin, U. (2015). The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: Global perspectives in evolutionary and historical backgrounds. *Nutrients* **7** (9), S. 7312–7331.
- Slonczewski, J. L. und Foster, J. W. (2012). Mikrobiologie. Eine Wissenschaft mit Zukunft. 2., Aufl. Heidelberg, Neckar. Spektrum Akademischer Verlag.
- Spinelli, S., Veesler, D., Bebeacua, C. und Cambillau, C. (2014). Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal siphophages. *Front Microbiol* **5**.
- Stanley, E., Fitzgerald, G. F., Marrec, C. L., Fayard, B. und van Sinderen, D. (1997). Sequence analysis and characterization of oO1205, a temperate bacteriophage infecting *Streptococcus thermophilus* CNRZ1205. *Microbiology* **143** (11), S. 3417–3429.
- Stanley, E., Walsh, L., van der Zwet, A., Fitzgerald, G. F. und van Sinderen, D. (2000). Identification of four loci isolated from two *Streptococcus thermophilus* phage genomes responsible for mediating bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Lett* **182** (2), S. 271–277.
- Steinmetzer, K., Behlke, J., Brantl, S. und Lorenz, M. (2002). CopR binds and bends its target DNA: a footprinting and fluorescence resonance energy transfer study. *Nucleic Acids Res* **30** (9), S. 2052–2060.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. und Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45** (3), S. 649–659.
- Sun, X. (2001). Molecular and functional characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 gene (*ltp*) encoding a putative lipoprotein. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität, Kiel. Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut.
- Sun, X., Gohler, A., Heller, K. J. und Neve, H. (2006). The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Virology* **350** (1), S. 146–157.
- Sun, X., Neve, H. und Heller, K. J. (2009). Fighting fire with fire - Applying temperate phage for preventing phage infection in food fermentations. In: Horace T. Adams (Hg.): Contemporary trends in bacteriophage research. New York: Nova Science Publishers, S. 3–8.
- Tagami, S., Sekine, S.-i., Minakhin, L., Esyunina, D., Akasaka, R., Shirouzu, M., Kulbachinskiy, A., Severinov, K. und Yokoyama, S. (2014). Structural basis for promoter specificity switching of RNA polymerase by a phage factor. *Genes Dev* **28** (5), S. 521–531.
- Tang, G.-Q., Bandwar, R. P. und Patel, S. S. (2005). Extended upstream A-T sequence increases T7 promoter strength. *J Biol Chem* **280** (49), S. 40707–40713.
- Terzaghi, B. E. und Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* **29** (6), S. 807–813.
- Teshome, G. (2015). Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr J Food Sci* **9** (4), S. 170–175.
- Tremblay, D. M. und Moineau, S. (1999). Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of *Streptococcus thermophilus*. *Virology* **255** (1), S. 63–76.
- Tremblay, D. M., Tegoni, M., Spinelli, S., Campanacci, V., Blangy, S., Huyghe, C., Desmyter, A., Labrie, S., Moineau, S. und Cambillau, C. (2006). Receptor-binding protein of *Lactococcus lactis* phages: Identification and characterization of the saccharide receptor-binding site. *J Bacteriol* **188** (7), S. 2400–2410.

- Tsakalidou, E. und Papadimitriou, K. (2011). *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Springer Science & Business Media.
- Tükel, C., Sanlibaba, P., Ozden, B. und Akçelik, M. (2006). Identification of adsorption inhibition, restriction/modification and abortive infection type phage resistance systems in *Lactococcus lactis* strains. *Acta Biol Hung* **57** (3), S. 377–385.
- Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet* **186** (4814), S. 1241–1243.
- Vainshtein, I., Silveria, S., Kaul, P., Rouhani, R., Eglen, R. M. und Wang, J. (2002). A high-throughput, nonisotopic, competitive binding assay for kinases using nonselective inhibitor probes (ED-NSIP). *J Biomol Screen* **7** (6), S. 507–514.
- Vale, P. F., Lafforgue, G., Gatchitch, F., Gardan, R., Moineau, S. und Gandon, S. (2015). Costs of CRISPR-Cas-mediated resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Proc Biol Sci* **282** (1812).
- van de Guchte, M., van der Vossen, J. M., Kok, J. und Venema, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* **55** (1), S. 224–228.
- van der Vossen, J. M., van der Lelie, D. und Venema, G. (1987). Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol* **53** (10), S. 2452–2457.
- Varhimo, E., Savijoki, K., Jalava, J., Kuipers, O. P. und Varmanen, P. (2007). Identification of a Novel Streptococcal Gene Cassette Mediating SOS Mutagenesis in *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol* **189** (14), S. 5210–5222.
- Vasu, K. und Nagaraja, V. (2013). Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev* **77** (1), S. 53–72.
- Ventura, M. und Brüßow, H. (2004). Temporal transcription map of the virulent *Streptococcus thermophilus* bacteriophage Sfi19. *Appl Environ Microbiol* **70** (8), S. 5041–5046.
- Ventura, M., Bruttin, A., Canchaya, C. und Brüßow, H. (2002). Transcription analysis of *Streptococcus thermophilus* phages in the lysogenic state. *Virology* **302** (1), S. 21–32.
- Villanueva, V. M., Oldfield, L. M. und Hatfull, G. F. (2015). An unusual phage repressor encoded by mycobacteriophage BPs. *PLoS ONE* **10** (9), S. e0137187.
- Vujčić-Zagar, A., Dulermo, R., Le Gorrec, M., Vannier, F., Servant, P., Sommer, S., Groot, A. de und Serre, L. (2009). Crystal structure of the IrrE protein, a central regulator of DNA damage repair in deinococcaceae. *J Mol Biol* **386** (3), S. 704–716.
- Waldor, M. K. und Friedman, D. I. (2005). Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* **8** (4), S. 459–465.
- Walstra, P.; Geurts, T. J.; Wouters, J. T. M. (2006). *Dairy science and technology*. 2nd ed. Boca Raton. CRC/Taylor & Francis (*Food science and technology*, 146).
- Walter, M., Fiedler, C., Grassl, R., Biebl, M., Rachel, R., Hermo-Parrado, X. L., Llamas-Saiz, A. L., Seckler, R., Miller, S. und van Raaij, M. J. (2008). Structure of the receptor-binding protein of bacteriophage det7: a podoviral tail spike in a myovirus. *J Virol* **82** (5), S. 2265–2273.
- Wang, I. N., Smith, D. L. und Young, R. (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol* **54**, S. 799–825.

- Wang, I.-N. (2006). Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics* **172** (1), S. 17–26.
- Whitehead, H. R. und Cox, G. A. (1935). The occurrence of bacteriophage in cultures of lactic streptococci: A preliminary note. Government Printer.
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Williams, K. L., Appel, R. D. und Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. In: Andrew J. Link (Hg.): 2-D proteome analysis protocols, Bd. 112. Totowa, N.J.: Humana Press (Methods Mol Biol, v. 112), S. 531–552.
- Wood, B. J. B. und Warner, P. J. (2003). Genetics of lactic acid bacteria. New York. Kluwer Academic/Plenum Publishers (*The Lactic Acid Bacteria*, v. 3).
- Zhang, T., Zhang, C., Li, S., Zhang, Y. und Yang, Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Braz J Microbiol* **42** (4), S. 1470–1478.

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Einteilung der Phagen in die Morphotypen A bis G nach Ackermann (2001).	3
Abb. 2. Schematischer Aufbau des <i>Myoviridae</i> Phagen T4 und des <i>Siphoviridae</i> Phagen λ	4
Abb. 3. Lytische und lysogene Vermehrung der Bakteriophagen.	5
Abb. 4. Induktion eines Prophagen durch aktiviertes RecA aus der SOS-Antwort des Wirtsbakteriums.	8
Abb. 5. Wachstumskinetik einer bakteriellen Starterkultur mit und ohne Phagen-Infektion. .	11
Abb. 6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des lysogenen Milchsäurebakteriums <i>S. thermophilus</i> J34 und freier TP-J34-Virionen.	14
Abb. 7. Ausschnitt des Lysogeniemoduls im Genom des temperenten Phagen TP-J34.....	16
Abb. 8. Mechanismen des TP-J34-Prophagen zur Superinfektionshemmung.....	17
Abb. 9. Genetische Organisation der Lysogeniemodule temperenter <i>Siphoviridae</i> Phagen im Vergleich	19
Abb. 10. Erzeugung von drei Punktmutationen im <i>crh</i> -Gen des Plasmids pSK6.....	31
Abb. 11. Schematische Darstellung eines prokaryotischen Gens	39
Abb. 12. Prinzip der 5` <i>RACE-PCR</i> (Übersicht nach Roche).	41
Abb. 13. Polypropylensäule zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von Fusionsproteinen	44
Abb. 14. Lokalisierung der EMSA-DNA-Abschnitte im Lysogeniemodul von TP-J34	50
Abb. 15. Aktivierung von RecA in Gegenwart beschädigter DNA	54
Abb. 16. Intakte Gesamt-RNA aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2	56
Abb. 17. Produkte der 5` <i>RACE-PCR</i> aufgetrennt durch 2%ige Agarosegele.	57
Abb. 18. Sequenzierungschromatogramme der 5` <i>RACE-PCR</i> -Produkte.	58
Abb. 19. Gewinnung von pSK6LDA	59
Abb. 20. Klonierungsstrategie zur Konstruktion von pBSK <i>cro</i>	60
Abb. 21. Konstruktion von pGEX <i>recA</i>	60
Abb. 22. Konstruktion von pGEX <i>lexA</i>	61
Abb. 23. Konstruktion von pGEX <i>hdiR</i>	61
Abb. 24. Überproduzierte Fusionsproteine GST-Crh, GST-Rir, GST-Coh, GST-RecA, GST-LexA und GST-HdiR in <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Zellextrakten.	62
Abb. 25. Aufreinigungsschritte des Crh*-Proteins analysiert über eine 15%ige SDS-PAGE.	63

Abb. 26. Eluate 1 bis 4 der rekombinanten Proteine GST-Crh, GST-Rir, GST-RecA, GST-LexA, GST-HdiR und GST-Crh _{Mut}	64
Abb. 27. Eluate 1 und 2 der Proteine Crh*, Rir* und Coh* nach Entfernung des GST-tags durch die PreScission TM Protease.....	65
Abb. 28. Aminosäuresequenzen-Alignment und postulierte Sekundärstrukturen der Proteine Crh und Crh _{Mut}	66
Abb. 29. EMSA zur Ermittlung der DNA-Bindeaktivität von Crh*, Coh* und Rir*.....	68
Abb. 30. EMSA zur Ermittlung der DNA-Bindeaktivität von GST-HdiR und GST-Crh _{Mut}	69
Abb. 31. Kompetitionsassays zur Ermittlung und Lokalisierung der Repressor-Bindestellen im Lysogeniemodul des TP-J34-Phagen.	70
Abb. 32. Kooperative Bindung des Crh*-Proteins an die Operatoren O1A und O2.....	71
Abb. 33. Interaktion von Crh* und Rir* nachgewiesen durch einen Kompetitionsassay.....	72
Abb. 34. Quervernetzung von GST-Rir mit Coh* und Crh* durch Glutaraldehyd analysiert über einen Western Blot.....	73
Abb. 35. Quervernetzung der Proteine Rir* (Biotin-markiert), Coh* und Crh* mittels Glutaraldehyd.	74
Abb. 36. Interaktionsanalyse der Proteine Crh* und GST-Rir sowie Crh* (Biotin-markiert) und Rir* analysiert.	74
Abb. 37. Konstruktion von pSK10 zur konstitutiven Expression von <i>rir</i> in <i>S. thermophilus</i> J34f-2 und 12f.....	75
Abb. 38. Induktion der lytischen Entwicklung des Phagen TP-J34 durch eine <i>rir</i> -Überexpression mit pSK10 in <i>S. thermophilus</i> J34f-2[pSK10]	76
Abb. 39. Konstruktion von pSK20 zur konstitutiven Expression von <i>gst-crh</i> in <i>S. thermophilus</i> J34f-2 und 12f.....	77
Abb. 40. Induzierbarkeit des Prophagen aus <i>gst-crh</i> -exprimierenden <i>S. thermophilus</i> J34f-2[pSK20]	78
Abb. 41. <i>In-vivo</i> -Analyse des Repressorproteins GST-Crh aus nicht-induzierten und induzierten <i>S. thermophilus</i> J34f-2[pSK20], J34cu50[pSK20] und J34-12f[pSK20].....	79
Abb. 42. <i>In vitro</i> -Nachweis einer proteolytischen Aktivität des <i>E. coli</i> RecA und des <i>S. thermophilus</i> J34f-2 GST-RecA durch LexA- und HdiR-Abbau	80
Abb. 43. <i>In vitro</i> -Analyse einer Proteolyse des Repressors Crh durch RecA aus <i>E. coli</i> und aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2.	81
Abb. 44. Analyse einer pH-abhängigen Autoproteolyse des Repressor-Proteins GST-Crh....	82
Abb. 45. Konstruktion von pGhrecA zum <i>Knockout</i> von <i>recA</i>	83

Abb. 46. Plasmidpräparationen aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2 nach Integration von pGhrecA...	83
Abb. 47. PCR zum Integrationsnachweis des pGhrecA-Vektors in das <i>recA</i> -Gen von <i>S. thermophilus</i> J34f-2.	83
Abb. 48. Induzierbarkeit von <i>S. thermophilus</i> J34f-2 <i>recA</i> -Knockout-Mutanten	84
Abb. 49. Genetische Schalterregion in der intergenen Region von <i>crh</i> und <i>coh</i> mit den divergent orientierten Promotoren P1 und P2	84
Abb. 50. Sequenzenvergleich der Operatoren O1A, O1B, O2, O3 und des nicht-gebundenen Operators O4 im Lysogeniemodul von TP-J34.....	89
Abb. 51. Bildung einer DNA-Schleife durch kooperative Bindung der Operatoren O _R , O _L und O _D durch ein CI-Repressor-Hexamere in TP901-1.	90
Abb. 52. Schematischer Aufbau des LexA-Repressors aus <i>E. coli</i>	94
Abb. 53. Konservierte Domäne der Proteine Rir und ImmA mit dem Zink-Bindemotiv `HELGH`	97
Abb. 54. Organisation und Regulation des ICEBsI-Transposons von <i>Bacillus subtilis</i> im Vergleich zur Organisation des TP-J34-Lysogeniemoduls	98
Abb. 55. Vergleich der Aminosäuresequenzen von Repressor-Proteinen aus <i>Streptococcus</i> Phagen mit <i>downstream</i> , Rir-homologer Protease in einem multiplen <i>Alignment</i>	99
Abb. 56. Postulierte Sekundärstruktur des Repressors Crh und ImmR aus <i>B. subtilis</i>	100
Abb. 57. Postuliertes Modell zur Erhaltung des lysogenen Zustands und zur Induktion des Prophagen TP-J34 während der SOS-Antwort.....	102
Abb. 58. Plasmidkarte von pGEX-6P-1 (4.984 bp).	110
Abb. 59. Plasmidkarte von pGEX-6P-1orf3 (5.330 bp).	110
Abb. 60. Plasmidkarte von pSK6 (5.327 bp).	110
Abb. 61. Plasmidkarte von pMG36e (3.611 bp).	110
Abb. 62. Plasmidkarte von pG ⁺ host9 (3.749 bp).	111
Abb. 63. Nukleotidsequenz des <i>hdiR</i> - und <i>recA</i> -Gens aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2.	112
Abb. 64. Aminosäuresequenzen der aufgereinigten Proteine mit und ohne GST-tag und des RecA-Proteins aus <i>E. coli</i> ER2502 (NEB).	113
Abb. 65. Aufgereinigte Proteine GST-RecA und GST-LexA mit zusätzlichen, durch Anti-GST auf einem <i>Western Blot</i> detektierten Proteinfragmenten.	114
Abb. 66. Spaltung von GST-RecA aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2 in ΔGST-RecA und GST-ΔRecA im Zuge der Aktivierung.....	114
Abb. 67. Spaltung von GST-Rir in Ansätzen mit aktiviertem RecA* aus <i>S. thermophilus</i> J34f-2.....	114

12 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Systematische Einteilung der Phagen (modifiziert aus Ackermann 2001; 2011 und ICTV, 2015).	4
Tab. 2. Übersicht temperenter und virulenter <i>S. thermophilus</i> Phagen mit bisher veröffentlichten Genomen.	13
Tab. 3. Allgemeine Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> , <i>L. lactis</i> und <i>S. thermophilus</i>	21
Tab. 4. Verwendete Antibiotika und Medienzusätze.	22
Tab. 5. Verwendete Bakterien und Bakteriophagen.	23
Tab. 6. Verwendete Plasmide und Plasmidkonstrukte.	23
Tab. 7. Lösungen und Puffer zur Durchführung eines Plaquetests.	26
Tab. 8. Komponenten für die Agarose-Gelelektrophorese.	28
Tab. 9. Verwendete Oligonukleotide (Primer) und ihre Schmelztemperaturen.	29
Tab. 10. Übersicht eines PCR-Programms.	30
Tab. 11. Angewendete PCR-Programme.	30
Tab. 12. PCR-Programm für die LDA.	32
Tab. 13. Medien und Puffer zur Erzeugung und Elektroporation kompetenter Laktokokken.	34
Tab. 14. Medien und Puffer zur Erzeugung und Transformation elektrokompeter <i>S. thermophilus</i>	35
Tab. 15. Lösungen und Puffer für das <i>Colony Cracking</i>	36
Tab. 16. Lösungen und Puffer zur Isolierung chromosomaler DNA aus Grampositiven.	37
Tab. 17. PCR-Produkte zur Inserierung in pG ⁺ host9 und für den Nachweis einer erfolgreichen Integration.	38
Tab. 18. Komponenten für die RNA-Isolierung und -Analyse.	40
Tab. 19. Für die 5' <i>RACE-PCR</i> verwendete Gen-spezifische Primer (GSP).	40
Tab. 20. PCR-generierte DNA-inserts für Klonierungen zur Protein-Überproduktion.	42
Tab. 21. Die einzelnen Schritte der affinitätschromatographischen Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.	45
Tab. 22. Puffer für die affinitätschromatographische Aufreinigung.	45
Tab. 23. Komponenten einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.	47
Tab. 24. Komponenten einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese.	48
Tab. 25. Für den <i>Western Blot</i> eingesetzte Puffer und Antikörper.	49
Tab. 26. Puffer und natives TBE-Polyacrylamidgel für den EMSA.	50

Tab. 27. Pipettierschema der EMSA-Reaktionsansätze mit einem Volumen von 10 µl.....	51
Tab. 28. Übersicht der doppelsträngigen (ds) Kompetitoren für den Kompetitionsassay.....	52
Tab. 29. Physikalische und chemische Parameter der aufgereinigten Proteine (ProtParam)..	65
Tab. 30. Vergleich der Promotor-Strukturen von P1, P2, P _{tip} und P _{int} mit <i>E. coli</i> -Konsensussequenzen.	86
Tab. 31. Repressoren mit und ohne Ala/Gly-Stelle.	92
Tab. 32. Bezugsquellen der verwendeten Geräte und Materialien.	106
Tab. 33. Verwendete Chemikalien mit ihren Bezugsquellen.	107
Tab. 34. Eingesetzte Software und ihre Anwendungsbereiche.....	108
Tab. 35. Verwendete Kits und ihre Anwendungsbereiche.	109
Tab. 36. Verwendete DNA-, RNA- und Protein-Größenstandards.	115

Curriculum Vitae

Zur Person

Name, Vorname	Koberg, Sabrina
Geburtsdatum	24.07.1985
Geburtsort	Eckernförde
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Bildung

1992 - 1996	Fritz-Reuter Grundschule, Eckernförde
1996 - 2005	Gymnasium Jungmannschule, Eckernförde
	Abitur Juni 2005 (Note 2,3)

Akademische Bildung und beruflicher Werdegang

10/2006 – 06/2012	Biologie-Studium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Hauptfach: Mikrobiologie; Nebenfach: Immunologie, Zoologie
06/2011 – 03/2012	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT), Max Rubner-Institut, Kiel Diplom-Hauptprüfung April 2011 (Abschluss mit Auszeichnung)
seit 06/2012	Promotion am MBT

Beruf

05/15 – 02/16	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Beauftragte im Projekt „Antibiotikaresistenzen“ für den Standort Kiel am MBT
seit 02/16	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich „Darmmikrobiota“

Referenzen

Koberg, S., Mohamed, M. D. A., Faulhaber, K., Neve, H., und Heller, K. J. (2015).

Identification and characterization of *cis*- and *trans*-acting elements in the lysogeny module of *Streptococcus thermophilus* J34. *Mol Microbiol* **98**(3), S. 535-52.

Ali, Y., Koberg, S., Heßner, S., Sun, X., Rabe, B., Back, A., Neve, H. und Heller, K. J. (2014). Temperate *Streptococcus thermophilus* phages expressing superinfection exclusion proteins of the Ltp type. *Front Microbiol* **5**, S. 98.

Oguntoyinbo, F. A., Cho, G. S., Brinks, E., Fiedler, G., Kabisch, J., Koberg, S., Bockelmann, W., Neve, H., Kang, Y. G., Yun, D., Kim, A. R., Narbad, A., Franz, C. M. (2016). Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* BFE 5092 isolated from Maasai fermented milk. *Genome Announc* **4**(3), e00481-16.

Koberg, S., Brinks, E., Fiedler, G., Hüsing, C., Cho, G. S., Heller, K. J., Hoepfner, M. P. Neve, H., Franz, C. M. A. P. (2017). Genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage PMBT1 isolated from raw sewage. *Genome Announc* **5**(8), e00914-16.

Konferenzbeiträge

Characterization of some key players in the genetic switch of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34.

Sabrina Koberg, Mazhar D. A. Mohamed, Katharina Faulhaber, Horst Neve, Knut J. Heller. VAAM-Jahrestagung 10.-13. März 2013, Bremen.

Functional characterization of some gene products of the genetic switch region of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34.

Sabrina Koberg, Mazhar D. A. Mohamed, Katharina Faulhaber, Horst Neve, Knut J. Heller. 14. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie 22.-24. April 2013, Tutzing.

Regulation of the genetic switch of *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34.

Sabrina Koberg, Mazhar D. A. Mohamed, Katharina Faulhaber, Horst Neve, Knut J. Heller. Milchkonferenz 16.-17. September 2013, Hohenheim, Stuttgart.

Regulatory elements in the genetic switch region of the genome of the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage TP-J34 from a yoghurt starter strain.

Sabrina Koberg, Mazhar D. A. Mohamed, Katharina Faulhaber, Horst Neve, Knut J. Heller
3rd Kiel Food Science Symposium 20.-21. Mai 2014, Kiel.

Analysis of regulatory elements in the genetic switch of temperate bacteriophage TP-J34 induced from a *Streptococcus thermophilus* yoghurt starter strain.

Sabrina Koberg, Mazhar D. A. Mohamed, Katharina Faulhaber, Horst Neve, Knut J. Heller.
11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, 1.-4. September 2014, Egmond aan Zee.

Modell des Genetischen Schalters des temperenten *Streptococcus thermophilus* Bakteriophagen TP-J34 aus einer Joghurt-Starterkultur.

Sabrina Koberg, Horst Neve, Knut J. Heller.

15. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene 15.-17. April 2015, Freising.

Charakterisierung von Bakteriophagen als Biokontrolle von antibiotikaresistenten Bakterien aus Lebensmitteln.

Sabrina Koberg, Christina Hüsing, Erik Brinks, Angela Back, Horst Neve, Charles M. A. P. Franz.

16. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene, 31. März bis 1. April 2016, Hohenheim Stuttgart. 2. Posterpreis.