

***Vibrio cholerae* Phage K139:
Charakterisierung des Phagengenoms
und vergleichende Genomanalyse
mit verwandten Phagen**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dagmar M. Kapfhammer

aus Hammelburg

Würzburg, 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren. Allen voran meinem Betreuer Achim Reidl, der mich mit besten Kräften unterstützt und mir immer ein selbständiges Arbeiten ermöglicht hat, auch wenn er sich wohl manchmal so vorkam wie unten auf dem Bild, wenn er abends die Labortüre öffnete und die drei Fifis in unserer Box rumbasteln sah.... Mein Dank geht natürlich auch an die anderen



„... und hier unten ist das Reich von Fifi. Manchmal glaube ich, daß etwas nicht in Ordnung ist mit ihm....“

beiden Fifis, Jutta und Anita. Der Oberfifi Jutta hatte trotz der Berge von Arbeit irgendwie immer Zeit und vor allem immer einen Rat für alle Probleme parat ("Des hab´ i´ au´ scho´ gmacht!") und die Wortgefechte mit ihr haben mich auf so manche Idee gebracht ("No risk, no fun!"). Anita war nicht nur arbeitsmäßig immer dazu bereit mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, auch hat sie - zumindest unbeabsichtigt - hilfreich und zuvorkommend zur Hebung der allgemeinen Stimmung beigetragen. Ich weiß, Anita, man hat´s nicht leicht, wenn man das Fettnäpfchen sozusagen schon unterm Schuh festmontiert hat! Es hat zumindest so manchen langen Abend in unserer Box erträglicher gemacht, und wie ich hoffe nicht nur für mich.

Apropos Fettnäpfchen, da muß ich doch gleich meinen Dank an Frau R. aus U. für die ebenso vielfältige kollegiale Hilfsbereitschaft und für ihr ausgesprochenes Pflichtbewußtsein dazwischen schieben. Auch hat sie genau wie Sibylle O. immer gerne ihr Ohr zur Verfügung gestellt, wenn ich mich mal ausjammern mußte. Dann sind da natürlich noch unsere beiden Stefans, die auch immer ein offenes Ohr für mich hatten oder einfach nur zu einem Spaß aufgelegt waren. Unseren Nachwuchstalenten Elli und Melisa gebührt der Dank für das musikalische Rahmenprogramm, das mir so manche Stunde vergrault, halt nein, versüßt hat. Karina Hilpert hat dankenswerterweise die Konstruktion des Promotor-Probe Vektors übernommen und die phänotypischen Tests damit durchgeführt. Daß das alles keine so ganz einfache Sache war zeigt ja allein schon der Name, den sie für dieses Biest gewählt hat: pLM.... Stefan Evers aus Basel hat die MALDI-TOF Analysen für mich gemacht, was ja auch erst nach mehrmaligem Anlauf geklappt hat. Salam hatte auch immer einen Tip parat, wenn es um Proteine ging und Julia hat mich anfangs bei den Sequenzierarbeiten unterstützt. Tja, dann sind da noch die unzähligen, die einem mit ihrer Hilfsbereitschaft die Arbeit erleichtern oder einfach mit ihrer guten Laune über den vielen Frust hinwegtrösten.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung mein Studium und damit diesen Berufsweg ermöglicht haben.

A. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
A. SUMMARY.....	4
B. EINLEITUNG.....	6
B.1. BIOLOGIE DER BAKTERIOPHAGEN	6
B.1.1. <i>Vibriophagen</i>	6
B.1.1.1. <i>Vibriophagen der Familie Inoviridae</i>	7
B.1.1.2. <i>Vibriophagen der Familie Caudovirales</i>	9
B.1.2. <i>Molekulare Aspekte zur Phagenbiologie</i>	10
B.1.2.1. <i>Rezeptorbindung</i>	10
B.1.2.2. <i>Kontrolle des Lebenszyklus</i>	11
B.1.2.3. <i>Schutz vor Superinfektionen</i>	13
B.1.2.4. <i>Replikation</i>	13
B.1.2.5. <i>Verpackung</i>	14
B.1.2.6. <i>Lyse</i>	15
B.1.3. <i>Phagenevolution</i>	16
B.2. <i>VIBRIO CHOLERAE</i> UND <i>CHOLERA</i>	17
B.2.1. <i>Eigenschaften und Klassifikation von V. cholerae</i>	17
B.2.2. <i>Die Krankheit Cholera</i>	17
B.2.3. <i>Pathogenitätsfaktoren und mobile genetische Elemente</i>	19
B.2.3.1. <i>Toxine</i>	19
B.2.3.2. <i>Kolonisierungsfaktoren</i>	20
B.2.3.3. <i>Mobile genetische Elemente</i>	21
B.2.3.4. <i>Evolution pathogener V. cholerae Stämme</i>	23
B.3. <i>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</i>	24
C. MATERIAL UND METHODEN.....	25
C.1. <i>BAKTERIOPHAGEN UND BAKTERIENSTÄMME</i>	25
C.1.1. <i>Bakteriophagen</i>	25
C.1.2. <i>E. coli Stämme</i>	25
C.1.3. <i>V. cholerae Stämme</i>	25
C.2. <i>GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN</i>	26
C.3. <i>NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE</i>	28
C.4. <i>OLIGONUKLEOTIDE UND PLASMIDE</i>	28
C.4.1. <i>Markierte Primer</i>	28
C.4.2. <i>Unmarkierte Primer</i>	30
C.4.3. <i>Plasmide</i>	32
C.5. <i>MIKROBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODEN</i>	33
C.5.1. <i>Arbeiten mit Bakterien</i>	33
C.5.1.1. <i>Herstellung kompetenter Zellen</i>	33
C.5.1.2. <i>Transformation</i>	34
C.5.1.3. <i>Konjugation</i>	34
C.5.1.4. <i>Konstruktion von Mutanten</i>	35
C.5.2. <i>Arbeiten mit Bakteriophagen</i>	35
C.5.2.1. <i>Herstellung von Phagenlysaten</i>	35
C.5.2.2. <i>Plaque-Assay</i>	36
C.5.2.3. <i>Plaque-Inhibitions-Assay</i>	36
C.6. <i>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</i>	37
C.6.1. <i>Präparation von Plasmid DNA</i>	37
C.6.2. <i>Präparation chromosomaler DNA</i>	37
C.6.3. <i>Präparation von Phagen DNA</i>	38
C.6.4. <i>PCR</i>	38
C.6.5. <i>Enzymverdau, Reinigung von DNA-Fragmenten und Ligation</i>	38
C.6.6. <i>Konstruktion rekombinanter Plasmide</i>	38
C.6.6.1. <i>Subklonierung von DNA-Fragmenten</i>	38
C.6.6.2. <i>Konstruktion des Promotor-Test Vektors pLM</i>	39
C.6.6.3. <i>Expressionsplasmide</i>	40
C.6.6.4. <i>Plasmide zur Konstruktion von chromosomalen Deletionsmutanten</i>	42
C.6.7. <i>Southern Blot</i>	43
C.6.8. <i>DNA-Sequenzierung</i>	44
C.6.8.1. <i>Sequenzierung mit dem LiCor System</i>	44
C.6.8.2. <i>Sequenzierung mit dem ABI Sequenzer</i>	45

C.6.9.	<i>Aufreinigung von Phagenpartikeln</i>	45
C.6.10.	<i>Elektronenmikroskopische Aufnahmen</i>	46
C.7.	BIOCHEMISCHE METHODEN	46
C.7.1.	<i>Identifizierung von Proteinen des K139 Phagenpartikels</i>	46
C.7.2.	<i>Präparation von LPS</i>	47
C.7.2.1.	Modifizierte Methode	47
C.7.2.2.	Heiße Phenol/Wasser Methode.....	47
C.7.3.	<i>Herstellung von Periplasma-Extrakten</i>	48
C.7.4.	<i>Aufreinigung des Orf2 Proteins</i>	48
C.7.4.1.	Überexpression des Proteins.....	48
C.7.4.2.	Aufschließen der Zellen mittels "French-Press"	48
C.7.4.3.	Ammoniumsulfat-Fällung.....	48
C.7.4.4.	Dialyse.....	49
C.7.4.5.	Aufreinigung des Proteins mittels Chromatographie	49
C.7.5.	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	50
C.7.6.	<i>Färbung von Proteinen in PAA-Gelen</i>	50
C.7.7.	<i>Färbung von LPS in PAA-Gelen</i>	50
C.7.8.	<i>Western Blot</i>	51
C.7.9.	<i>Gelshift-Assay</i>	52
C.7.10.	<i>Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität</i>	52
C.7.11.	<i>Bestimmung der Phosphatase-Aktivität</i>	53
C.8.	BIOINFORMATIK	53
C.8.1.	<i>Auswertung der DNA-Sequenz</i>	53
C.8.2.	<i>Internet-Programme</i>	53
D.	ERGEBNISSE	55
D.1.	BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG DES K139 GENOMS	55
D.1.1.	<i>Eigenschaften des Genoms</i>	55
D.1.2.	<i>Ergebnis der Datenbankvergleiche</i>	57
D.1.2.1.	Homologie zu V86	57
D.1.2.2.	Funktionelle Organisation des Genoms	57
D.1.3.	<i>Funktionelle Gengruppen</i>	59
D.1.3.1.	Genregulatoren und putative DNA-bindende Proteine	59
D.1.3.2.	Replikation	60
D.1.3.3.	Methylierung	62
D.1.3.4.	Kapsid und Verpackung	63
D.1.3.5.	Phagenschwanz.....	64
D.1.3.6.	Wirtszell-Lyse	65
D.2.	VERGLEICHENDE PHAGENGENOMIK.....	65
D.2.1.	<i>Southern-"Screening" verschiedener V. cholerae Isolate</i>	65
D.2.2.	<i>Überblick über die Organisation der K139-verwandten Phagensequenzen</i>	67
D.2.2.1.	Southern Blot mit K139-Gencluster Sonden	67
D.2.2.2.	Analyse der Phagen-Sequenzen mittels PCR.....	68
D.2.3.	<i>Sequenzierung ausgewählter Genombereiche</i>	69
D.2.3.1.	Genomregion <i>rep</i> bis <i>orf15</i>	69
D.2.3.2.	Schwanzfasergene	71
D.3.	EXPERIMENTELLE ÜBERPRÜFUNG VON GENFUNKTIONEN	73
D.3.1.	<i>MALDI-TOF Analyse mit gereinigten Phagenpartikeln</i>	73
D.3.2.	<i>Methylase</i>	74
D.3.3.	<i>Orf2</i>	75
D.3.3.1.	Phänotyp Orf2-überexprimierender Zellen.....	75
D.3.3.2.	Phänotyp der <i>orf2</i> -Deletionsmutante	77
D.3.3.3.	Aufreinigung von Orf2	77
D.3.3.4.	Lokalisation von Orf2.....	78
D.3.3.5.	Gelshift-Assays.....	79
D.3.4.	<i>Lytischer Repressor CI</i>	79
D.3.4.1.	Phänotyp CI-überexprimierender Zellen	79
D.3.4.2.	Phänotyp der <i>cI</i> -Deletionsmutante.....	81
D.3.5.	<i>Analyse putativer Regulatoren im Promotor-Test System</i>	81
E.	DISKUSSION	83
E.1.	AT-SCAN UND PHAGENEVOLUTION	83
E.2.	VERGLEICHENDE PHAGENGENOMIK.....	84
E.2.1.1.	Sequenzvergleich der Genomregion <i>rep</i> bis <i>orf15</i>	85

E.2.1.2. Sequenzvergleich der putativen Schwanzfaser-Gene.....	86
E.3. EINZELNE FUNKTIONELLE GENGROUEN	88
E.3.1. <i>Replikation</i>	88
E.3.2. <i>Methylierung</i>	89
E.3.3. <i>Morphogenesis-Gene</i>	90
E.3.4. <i>Zell-Lyse</i>	92
E.3.5. <i>Orf2</i>	94
E.3.6. <i>CI</i>	96
E.3.7. <i>Identifizierung von Regulatoren mit dem Promotor-Test System</i>	97
F. LITERATURVERZEICHNIS	99
G. ANHANG	108
G.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	108
G.2. ERGEBNISSE DER DATENBANKVERGLEICHE	109
G.3. GENOMORGANISATION DER P2-PHAGEN	111
G.4. ERKLÄRUNGEN	113
G.5. PUBLIKATIONEN	114
G.6. LEBENSLAUF	115

A. Zusammenfassung

Bisher sind ca. 190 verschiedene Vibriophagen beschrieben, nur 10 davon stellen filamentöse Phagen dar, der Rest gehört zu den sogenannten *Caudovirales*, d.h. sie weisen ein kubisches Nukleokapsid mit einem mehr oder weniger langen Schwanz auf. Der letzteren Gruppe ist auch der Phage K139 zuzurechnen. K139 ist ein temperenter Phage, dessen Wirtsspektrum sich nach bisherigen Erkenntnissen auf *V. cholerae* Stämme der Serogruppen O1 und O139 beschränkt. Als Rezeptor dient ihm dabei das O1 Lipopolysaccharid (LPS), O139 LPS kann dagegen nicht gebunden werden. Morphologisch ist er der Familie der *Myoviridae* zuzurechnen, innerhalb des Klassifikations-Schemas der Vibriophagen den Kappa-Phagen. Diese Phagengruppe weist eine hohe Assoziation mit epidemischen O1 El Tor Stämmen auf, es gibt aber keine Hinweise auf eine Beteiligung an der Virulenz von *V. cholerae*. Auch in O1 klassischen Stämmen liegen Phagen des Kappa-Typs als defekte Prophagen vor, die eine hohe Verwandtschaft mit K139 zeigen. Aus Sequenzanalysen war weiterhin bereits eine Verwandtschaft zu P2-ähnlichen Phagen (P2 und 186 von *Escherichia coli*, Φ CTX von *Pseudomonas aeruginosa* und HP1 von *Haemophilus influenzae*) bekannt. Untersuchungen zur Funktion von K139 Genen haben bisher zur Identifizierung von *glo* geführt, das ins Periplasma exportiert wird und an der Exklusion superinfizierender Phagen beteiligt ist. Auch gab es bereits Hinweise auf eine terminale Redundanz des Phagengenoms.

In dieser Arbeit wurde die gesamte K139 Genomsequenz ermittelt. Diese besteht aus 33.1 kb ds DNA, die Sequenzierung deutet ebenfalls auf eine terminale Redundanz hin. Zusammen mit dem bereits bekannten Sequenzabschnitt ergab sich eine Zahl von insgesamt 44 offenen Leserastern (ORFs). Sowohl auf Sequenzebene als auch hinsichtlich der Organisation des Genoms konnte eine Verwandtschaft von K139 zu den P2-Phagen bestätigt werden. Insgesamt weisen 26 ORFs Homologie zu P2 Genprodukten auf. Für 14 ORFs war eine Funktionszuordnung basierend auf der Homologie zu bereits bekannten Proteinen möglich. Auch über die Analyse der Sequenzmotive wurde versucht, Hinweise auf eine mögliche Funktion der putativen Proteine zu erhalten.

Zur Unterstützung der bioinformatischen Auswertung wurden weiterführende Untersuchungen angestellt. So wurden die Phagenpartikel isoliert und aufgereinigt, um mittels 2D SDS-PAGE die an der Morphogenese des Phagenpartikels beteiligten Proteine identifizieren zu können. Auf diese Weise konnten vier putative Kapsid- und drei putative Schwanz-Proteine als Bestandteil der Phagenpartikel ermittelt werden. Weiterhin wurde durch Überexpression und Restriktionsanalysen die Funktion von Orf8 als Adenin-spezifische Methyltransferase bestätigt. Als spezifische Methylierungssequenz wurde die Basenabfolge 5'-GATC-3' identifiziert. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Funktionszuordnung putativer Genregulatoren. Dies wurde einmal durch Überexpression und Konstruktion von

Deletionsmutanten und deren phänotypischer Bestimmung in Plaque-Assays für die Proteine Orf2 und CI untersucht. Dabei konnte Orf2 eine mögliche Schutzfunktion vor superinfizierenden Phagen zugeschrieben werden, wobei Orf2 in frühen Phasen der Infektion oder bei der Etablierung des lysogenen Zustandes eingreift. Eine DNA-Bindung von Orf2 an die putativen K139 Promotoren konnte bisher nicht nachgewiesen werden, so daß ein direktes Eingreifen in die Regulation dieser Promotor-Bereiche eher nicht in Betracht gezogen wird. Widersprüchlich sind dagegen die Ergebnisse für die Funktion von CI. Eine durch die Homologie bereits angedeutete Funktion als lytischer Repressor konnte durch einen Teil der Ergebnisse bestätigt werden, doch deutet ein anderer Teil der phänotypischen Tests auf das genaue Gegenteil hin. Zum zweiten wurde in einem Promotor-Test System der Einfluß der Proteine Orf2, CI, Orf8, 11, 12 und 13 auf vier verschiedene putative Promotor-Bereiche von K139 untersucht. Die vorläufigen Ergebnisse zeigen eine aktivierende Funktion einmal von Orf11 auf seinen eigenen Promotor P₁₁, zum anderen von Orf13 auf einen der späten Promotoren des Morphogenesis-Genclusters, P₁₇. Eine Funktion als Aktivator der späten Gene war schon aufgrund der Homologie von Orf13 vermutet worden.

Weiterhin wurde durch Southern Blot Analysen die Verbreitung von K139 innerhalb verschiedener *V. cholerae* Isolate untersucht. Dabei wurden nicht nur O1 und O139 Stämme, sondern auch andere Serogruppen in die Untersuchung mit einbezogen. Dabei konnte K139 in ca. 50% der O1 und O139 Stämme nachgewiesen werden, überraschenderweise zeigten aber auch zwei der Nicht-O1/O139 Stämme die Präsenz homologer Sequenzen. Diese wiesen auch einen Restriktions-Polymorphismus auf, so daß zusammen mit den bereits bekannten Restriktionsmustern der O1 und O139 Stämme insgesamt vier verschiedene K139-Typen identifiziert werden konnten. Nähere Untersuchungen mittels Southern-Blot und PCR zeigten die hohe Verwandtschaft zwischen diesen K139-Typen. Eine in der PCR-Analyse auffallend differierende Region, die der K139 Genomregion zwischen dem *rep* und dem *orf15* Gen entspricht, wurde subkloniert und sequenziert. Dabei zeigte sich, daß alle vier K139-Typen einen unterschiedlichen Gengehalt in dieser Region aufweisen. Neben einigen hoch homologen Sequenzen konnten für die Gene *orf12* und *orf13* zwei verschiedene Allele identifiziert werden. Zudem gibt es auch Insertionen völlig verschiedener Gene.

Schließlich wurde noch eine weitere Genregion sequenziert, *orf35* bis *orf36*, die zwar in der PCR-Analyse nicht auffiel, in der aber wirtsspezifische Sequenzunterschiede vermutet wurden. Für die Sequenz von *orf35*, das für das putative Schwanzfaser Protein kodiert, konnte eine mosaikartige Struktur ermittelt werden, die durch die Anwesenheit von zwei konservierten (C1 und C2) und zwei variablen (V1 und V2) Regionen zustande kommt. Insgesamt wurden drei verschiedene V1-Regionen und zwei verschiedene V2 Regionen identifiziert. Die Kombination dieser variablen Bereiche ergab schließlich drei verschiedene Schwanzfaser-Protein Typen. Überraschenderweise korrelieren diese Typen nicht mit der

Serogruppe des Wirtes. So konnte der gleiche Schwanzfaser-Typ in drei verschiedenen Serogruppen gefunden werden, während in drei Stämmen einer Serogruppe drei verschiedene Schwanzfaser-Typen identifiziert wurden. Aufgrund der Beobachtung, daß der in einem O141 Stamm präsente Schwanzfaser-Typ völlig identisch mit dem K139 Schwanzfaser-Typ ist, wurde K139 als Testphage für LPS-Bindungstudien an O141 LPS benutzt. Dabei zeigte sich, daß K139 nicht an das O141 LPS binden kann, was im Rückschluß dann auch auf den im O141 lysogenen Phagen zutreffen müßte. Als Grund hierfür wird die Fähigkeit von *V. cholerae* diskutiert, durch horizontalen Gentransfer ein neues LPS Biosynthese-Cluster zu erwerben und damit die Serogruppe zu wechseln.

A. Summary

So far 183 different tailed and ten filamentous *Vibrio* phages were described. Phage K139 belongs to the *Myoviridae* family of tailed phages. It can be isolated from *V. cholerae* strains of the O1 and O139 serogroups. The receptor is known to be the O1 LPS, therefore K139 is unable to bind to O139 LPS. In the classification scheme of Vibriophages K139 can be assigned as a Kappa-phage based on its morphology. The Kappa group was shown to be widely distributed among epidemic *V. cholerae* strains, but no evidence could be provided so far showing whether or not it is contributing to *V. cholerae* pathogenicity. In O1 classic strains K139 was found to be present as a defective prophage, whereas functional phage particles can be isolated from O1 El Tor and O139 strains. Sequence analysis in the past already suggested a relationship of K139 to P2-like phages. Members of this group are the phages P2 and 186 of *E. coli*, Φ CTX of *P. aeruginosa* and HP1 of *H. influenzae*. Only the function of one K139 ORF, Glo, is already known. It is encoded in the lysogenic operon and it was shown to be located in the periplasm where it serves as an exclusion protein factor against superinfecting K139 phages.

In this study the complete genome sequence of K139 was characterized. It consists of 33.1 kb linear ds DNA with terminal redundant ends of unknown length. Along with the already known sequence of the lysogenic/lytic control region the genome harbours 44 ORFs. Database analysis revealed that 26 of them are homolog to P2-like phages. The relationship to the P2-like phage group is also reflected by the genomic organization of K139, which resembles that of phage HP1. A possible function could be assigned to 14 ORFs based on homology to proteins of already known function. Determination of sequence motifs of the deduced gene products further helped to identify possible functions.

In addition, the putative function of several ORFs assigned by bioinformatic analysis was supported by experimental data. For example, the phage particles were isolated and purified and subsequently subjected to 2D SDS-PAGE and MALDI-TOF analysis. Four putative capsid and three putative tail proteins could be identified as part of the phage particle by this method. Moreover, Orf8 could be assigned a function as adenine-specific methyltransferase by overexpression and restriction analysis. The specific methylation sequence could be identified as 5'-GATC-3'. A further focus of this study was based on the identification of potential K139 gene regulators. Overexpression vectors and knock-out mutants of *orf2* and *cI* were tested for their phenotype in plaque assays. Thereby Orf2 was found to be involved in protection against superinfecting K139 phages. The data suggests a function in early stages of infection or in establishment of the lysogenic state. DNA-binding of Orf2 to presumed K139 promoters could not be shown so far, therefore it doesn't act directly in regulation of the promoter sequences tested. The phenotypical data about the CI

function is contradictory. Homology analysis suggested a function as lytic repressor, which was confirmed by some of the plaque assays, another part of the data shows an activation of lytic development by CI. A different approach of elucidating the function of putative repressors was done by the construction of a promoter-probe system, which allowed to test a possible influence of the proteins Orf2, CI, Orf8, 11, 12 and 13 on the putative K139 promoter sequences. Thereby Orf11 could be shown to activate transcription of its own promoter P₁₁, whereas Orf13 activates the late promoter P₁₇ of the morphogenesis cluster, which confirmed the function of Orf13 assigned by homology analysis.

Furthermore the occurrence of K139 related phage sequences was investigated by Southern Blot screening of *V. cholerae* isolates belonging to different serogroups. K139 could be detected in 50% of the O1 and O139 strains, but related sequences were also found in two non-O1/O139 strains. These phage sequences showed a different restriction pattern, therefore together with the already known polymorphism of O1 classic strains four different types of K139 phages exist to date. Further characterization by Southern Blot and PCR analysis showed an almost identical overall genome organization of all four K139 types. One genomic region which produced strikingly differing PCR products was subcloned and sequenced. The sequence corresponds to the K139 *rep* to *orf15* region. While parts of the sequences are highly conserved between some of the phages, we could define two different alleles of *orf12* and presumably also of *orf13*. Additionally, totally unrelated ORFs were inserted within this region.

Finally the *orf35* and *orf36* regions of the phages were also sequenced, although they appeared to be identical by PCR analysis. But the function as putative receptor recognizing protein assigned by homology analysis suggested host-specific differences within the sequence of the tail fiber protein Orf35. Indeed, two conserved (C1 and C2) and two variable (V1 and V2) regions were identified. Three different V1 and two different V2 regions could be detected within the K139 related phages. The combination of these variable regions defines three types of tail fiber proteins. Interestingly, the tail fiber types don't correspond to the serogroup of the host in some of the cases. A same tail fiber gene product could be detected in three different serogroups, whereas strains of the same serogroup contain three different tail fiber gene products. Because of the total identity of the K139 Orf35 with the Orf35 of serogroup O141, K139 was used as a test phage to determine the binding ability of this tail fiber type to O141 LPS. It could be shown that K139 is not able to bind to O141 LPS, therefore the same could be the case for the phage present in the O141 strain. As a reason for this observation the possibility of serogroup conversion of the host strain by acquisition of a new LPS biosynthesis gene cluster via horizontal gene transfer is discussed.

B. Einleitung

B.1. Biologie der Bakteriophagen

Die ersten Bakteriophagen wurden im Jahre 1915 bzw. 1917 von Frederick Twort und Felix d'Herelle beschrieben (23). Seitdem ist die Zahl der bekannten Phagen auf über 5100 angestiegen (im Jahr 2000) (1). Aufgrund der in Umweltproben ermittelten Häufigkeitsverhältnisse vermutet man, daß die Zahl der Bakteriophagen die der Prokaryoten um das zehnfache übersteigt. Demnach wären Bakteriophagen die abundanteste "Lebensform" auf der Erde (20). Im Prinzip sind Bakteriophagen nicht viel mehr als ein Nukleinsäuremolekül, das von einer Hülle umgeben ist. Entsprechend erfolgt eine Untergliederung einmal nach der Art des genetischen Materials, zum anderen nach der Morphologie der Hülle. So unterscheidet man zwischen doppel- (ds) oder einzelsträngigen (ss) DNA oder RNA Phagen. Hinsichtlich ihrer Morphologie unterscheidet man Phagen mit einem Schwanz, solche mit kubischer oder helikaler Symmetrie oder von pleomorpher Gestalt (1). Die größte Phagengruppe bildet die Ordnung der *Caudovirales*, die ein kubisches Nukleokapsid mit einem mehr oder weniger langen Schwanz besitzen. Sie stellen 96% der bisher bekannten Phagen. Nach den Eigenschaften ihres Schwanzes werden sie in drei Familien eingeteilt, einmal die *Podoviridae* mit kurzem, nicht-kontraktilen Schwanz, die *Siphoviridae* mit langem, nicht-kontraktilen Schwanz und schließlich die *Myoviridae* mit langem, kontraktilen Schwanz. Sie alle weisen ein ds DNA Genom auf. Eine weitere wichtige Gruppe stellen die *Inoviridae* dar, die eine filamentöse Morphologie und ein ss DNA Genom besitzen (94).

B.1.1. Vibriophagen

Der erste Bakteriophage von *V. cholerae* wurde bereits 1926 von Felix d'Herelle entdeckt (126). Bis heute wurden ca. 190 verschiedene Vibriophagen beschrieben, 10 davon zählen zu den filamentösen Phagen, die übrigen gehören den *Caudovirales* an (1). Einige Beispiele für Bakteriophagen der letzteren Gruppe sind in Abb. B.1 zu sehen.

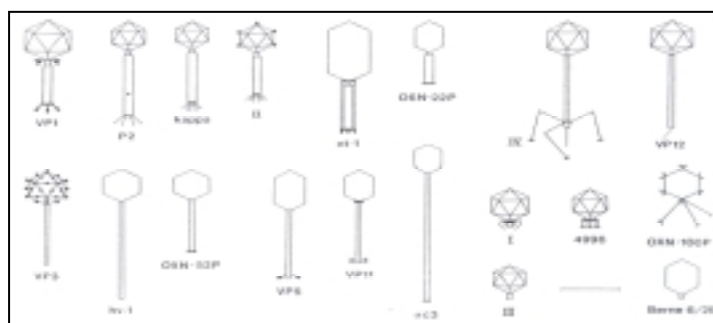


Abb. B.1: Beispiele für Vibriophagen der Ordnung *Caudovirales*. Die Abbildung ist entnommen aus Ackermann et al. (2).

Eine große Bedeutung hatten Vibriophagen in der Vergangenheit vor allem bei der Einordnung unbekannter *V. cholerae* Stämme durch Phagentypisierung. Das ursprüngliche Typisierungs-Schema von Mukerjee für klassische Stämme stammte aus dem Jahre 1955 und umfaßte vier Phagen, die aus über 600 Vibriophagen als geeignet für die Unterscheidung verschiedener *V. cholerae* Isolate ausgewählt wurden. Da in den 60er Jahren der klassische Biotyp von *V. cholerae* durch den neuen El Tor Biotyp verdrängt wurde, entwickelten Gallut und Nicolle ein neues Schema, das die Einteilung sowohl der klassischen als auch der neuen El Tor Stämme in insgesamt acht Phagentypen ermöglichte. Weitere Typisierungs-Schemen folgten, die während epidemischer Ausbrüche gut für eine schnelle Differenzierung der *Vibrio* Stämme geeignet waren. Neben der Typisierung durch Sensitivitäts-Bestimmung gegenüber einer Reihe von Testphagen nutzte man auch die in den epidemischen Stämmen selber vorhandenen lysogenen Phagen zur Einteilung der *Vibrio* Isolate. Auf diese Weise wurde ein Phagentyp entdeckt, der eine weite Verbreitung innerhalb epidemischer O1 El Tor Stämme aufweist. Dieser Phagentyp wurde "Kappa" genannt und kann aufgrund seiner Morphologie den *Myoviridae* zugerechnet werden. Doch beruht die Klassifizierung als Kappa-Phage vor allem auf Morphologie und Wirtsspektrum, so daß es sich hinsichtlich der Genomsequenzen durchaus um eine uneinheitliche Gruppe handeln kann. Trotz seiner hohen Assoziation mit epidemischen *Vibrio* Stämmen konnte diesem Phagentyp keine Rolle in der Pathogenese des Bakteriums zugesprochen werden (126). Das Auftauchen der neuen Serogruppe O139 im Jahre 1992 hat dann noch einmal zur Entwicklung neuer Typisierungs-Schemen geführt, so daß diese Methode der schnellen Zuordnung von *V. cholerae* Isolaten bis heute in der epidemiologischen Überwachung von Bedeutung ist (24).

B.1.1.1. Vibriophagen der Familie *Inoviridae*

CTXΦ

Die größte Bedeutung für die Biologie von pathogenen *V. cholerae* hat vermutlich der CTXΦ Phage (152). Er zählt zu den filamentösen (+) ss DNA Phagen und besteht aus einem 6,9 kb großen Genom. Der Phagenrezeptor ist der TCP-Pilus (siehe Kap. B.2.3.2.), die Aufnahme durch die Membran erfolgt mit Hilfe der TolQRA Proteine über einen noch unbekanntem Mechanismus (102). Als Besonderheit unter den ss DNA Phagen kann CTXΦ integriert in eine chromosomale "Attachment-Site" vorliegen, typischerweise ist er dann tandemartig in mehreren Kopien zu finden. El Tor Stämme besitzen dabei eine Integrationsstelle, klassische Stämme dagegen eine auf jedem der beiden Chromosomen (32). Fehlt die "Attachment-Site", dann persistiert der Phage in der Wirtszelle als ds Plasmid (pCTX). Die Plasmid-Form wird auch als replikative Form (RF) bezeichnet, weil sie ein Intermediat bei der Produktion von CTXΦ aus dem lysogenen Zustand darstellt. In der RF Form wird auch ein hoher Phagentiter aus den Zellen freigesetzt (102). Zudem ist die

Choleratoxin-Expression in diesem Zustand unabhängig von der Regulationskaskade für Virulenzfaktoren (82).

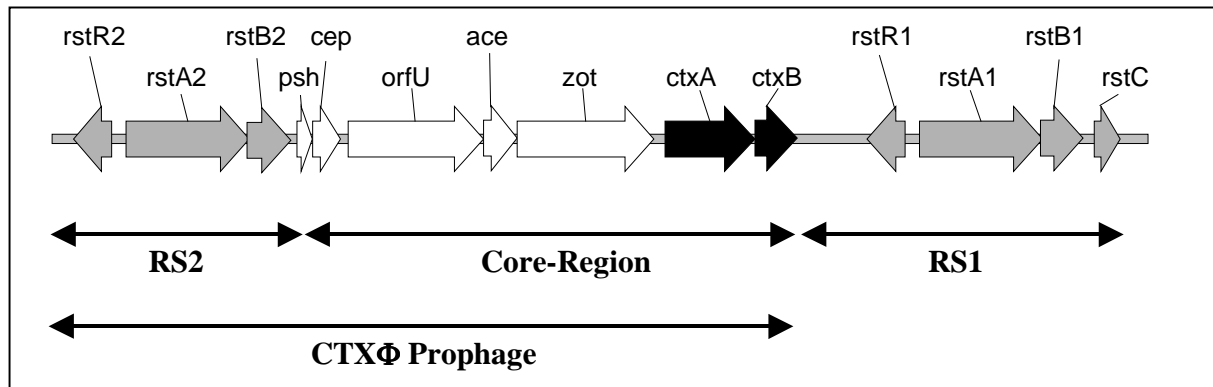


Abb. B.2: Integriertes CTX Φ Prophagenom. Neben dem Prophagen ist typischerweise immer das RS1-Element zu finden, das aus den im Phagenom vorhandenen Genen *rstR*, *rstA* und *rstB* und dem zusätzlich vorhandenen *rstC* besteht.

Das integrierte Phagenom ist in Abb. B.2 zu sehen. Neben den beiden Choleratoxin-Untereinheiten CtxA und CtxB sind Psh, Ace, Zot und Cep im "Core" des CTX Φ Genoms kodiert. Die zuletzt genannten Genprodukte zählte man früher zu den Virulenzfaktoren, was sich noch in der Namensgebung widerspiegelt, mittlerweile konnte man ihnen jedoch eine Funktion in der Morphogenese des CTX Φ Phagen zuweisen. Zot (Zonula occcludens toxin) wird dabei für den Phagen-Zusammenbau benötigt, OrfU ist vermutlich eine Neben-Untereinheit und Cep (Core-encoded pilus) die Haupt-Untereinheit der Phagenhülle. Neben seiner Funktion in der Morphogenese gibt es zumindest für Ace (Accessory cholera enterotoxin) auch Hinweise darauf, daß es zusätzlich als Toxin fungiert (Übersicht: (75)). In einer vergleichenden Studie verschiedener *V. cholerae* Stämme wurden auch schon CTX Φ Phagen ohne Choleratoxin-Gene gefunden, die Choleratoxin-Gene könnten also auch erst später in das Genom aufgenommen worden sein (17). Das RS2-Element des Prophagen enthält Gene, die für Phagen Repression (*rstR*), Replikation (*rstA*) und Integration (*rstB*) kodieren. Zudem wird der Prophage an einer Seite von der Region RS1 flankiert, die alle Gene der RS2 Region und das zusätzliche *rstC* Gen trägt. In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, daß das RS1 Element unter Ausnutzung der Morphogenesis-Gene des CTX Φ Prophagen als eigenständige Einheit replizieren und sich als RS1 Φ Phage horizontal verbreiten kann (46).

Weitere filamentöse Phagen

Neben dem CTX Φ Phagen sind noch drei weitere filamentöse Phagen bisher sequenziert. Auch der VSK Phage, der aus O139 Stämmen isoliert wurde, weist ein Genom von 6.9 kb auf. Im Gegensatz zu anderen ss DNA Phagen besitzt auch VSK wie CTX Φ die Fähigkeit, in das Genom des Wirtes zu integrieren (71). Zur Biologie dieses Phagen ist aber

bisher noch nicht viel mehr bekannt. Ein weiterer filamentöser ss DNA Phage ist fs-2. Er besitzt ein 8.7 kb Genom, das eine ds RF in der Wirtszelle bildet und nicht ins Chromosom integriert. Wegen des breiten Wirtsspektrums dieses Phagen, das O139, O1 El Tor, einige O1 klassische und Nicht-O1/O139 Stämme umfaßt, wird er als möglicher Vektor für einen Gentransfer in verschiedenste *V. cholerae* Stämme angesehen (66). Schließlich wurde als weiterer ss DNA Phage fs1 sequenziert, dessen Genom 6.3 kb lang ist und ebenfalls nicht in das Chromosom integriert, sondern als ds RF in der Wirtszelle verbleibt (64). Bei keinem dieser Phagen ist bisher ein Zusammenhang zur Virulenz von *V. cholerae* bekannt.

B.1.1.2. Vibriophagen der Familie *Caudovirales*

K139

Der temperente Vibriophage K139 wurde ursprünglich aus einem klinischen O139 Stamm isoliert, doch ist er auch in O1 El Tor Stämmen und als defekter Prophage in O1 klassischen Stämmen zu finden. Morphologisch wird er der Gruppe der bereits erwähnten Kappa-Phagen und damit der Familie der *Myoviridae* zugerechnet (123). Die Integrationsstelle von K139 liegt auf dem Chromosom 1 von *V. cholerae* zwischen den Flagellen-Genen *flaA* und *flaC* (107). Die Flagellenexpression wird durch die Integration des Phagen nicht beeinträchtigt. Obwohl K139 aus O139 Stämmen isoliert wurde, kann er nicht-lysogene O139 Stämme nicht infizieren (123). Grund hierfür ist, daß der Rezeptor des Phagen das O1 LPS darstellt, und zwar unabhängig von Serotyp oder Biotyp des Stammes (108). Der Phage zählt zu den ds DNA Phagen und weist ein Genom von 33.1 kb auf, das möglicherweise terminal redundant ist (123). Untersuchungen der Lysis/Lysogenie-Kontroll Region haben eine Verwandtschaft zu den P2-Phagen vorgeschlagen. Durch Transposon-Mutagenese konnte im lysogenen Operon ein Genprodukt identifiziert werden, Glo, das in das Periplasma transportiert wird und die Infektion superinfizierender Phagen verhindert (Exklusion) (107).

Weitere *Caudovirales*

Als generell transduzierender Phage mit einer Frequenz von 10^{-5} - 10^{-7} Transduktanten pro "plaque-forming unit" (pfu) wurde CP-T1 identifiziert (59). Er ist ein temperenter Phage der *Myoviridae* Familie mit einem Genom von ca. 44 kb (56). Als Rezeptor dient diesem Phagen das O-Antigen der Serogruppen O1 und O37. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Phage in der Lage ist, den CTX Φ Prophagen in Stämme zu transduzieren, denen sowohl der Rezeptor als auch die chromosomale Integrationsstelle von CTX Φ fehlt (18).

Die temperenten Phagen VcA1-3 wurden aufgrund ihrer Eigenschaft, zufällig in das Genom des Wirtes zu integrieren, zur Herstellung von Insertions- und Deletionsmutanten verwendet (51).

Eine Reihe weiterer Phagen der *Myoviridae* Familie wurde bereits beschrieben, wie etwa D10 (25), Φ O139 (116), Φ 149 (132), e5 (7) u.a., doch beschränkt sich die Information über diese Phagen vor allem auf die Charakterisierung des Wirtsspektrums sowie Restriktions- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Phagen-genoms und ähnliches. Sequenzinformationen zu Vibriophagen der Familie *Caudovirales* liegen bisher noch nicht vor.

B.1.2. Molekulare Aspekte zur Phagenbiologie

In diesem Kapitel soll der Lebenszyklus der Bakteriophagen näher dargestellt werden. Da der in dieser Arbeit vorgestellte Vibriophage K139 mit den P2-Phagen verwandt ist, wird der Schwerpunkt der Darstellung auf dieser Phagengruppe liegen. Vier Vertreter dieser Gruppe sind bisher vollständig sequenziert, P2 und 186 von *E. coli* (Übersichtsartikel: (41) (119) (21)), Φ CTX von *Pseudomonas aeruginosa* (105) und HP1 von *Haemophilus influenzae* (42). Bei diesen Phagen handelt es sich jedoch nicht um eine einheitliche Phagengruppe. So besitzt HP1 ein anderes Schwanz-Gencluster als die übrigen Phagen, während Φ CTX sich in seinem Lysogenie- und frühen lytischen Operon von den übrigen unterscheidet. Zudem ist 186 mit Mitomycin oder UV-Licht induzierbar, die übrigen P2-Phagen jedoch nicht. Die größte Übereinstimmung auf Sequenzebene gibt es im Kapsid-Gencluster. Weiterhin weisen sie eine vergleichbare Genomgröße von 31-36 kb und den gleichen Verpackungsmechanismus für ihre DNA auf (*cos* Mechanismus, siehe Kap. B.1.2.5.). Alle P2-Phagen sind temperent und gehören morphologisch zu den *Myoviridae*, haben also ein hexagonales Nukleokapsid mit langem, kontraktilem Schwanz.

B.1.2.1. Rezeptorbindung

Der initiale Schritt im Infektionszyklus eines Bakteriophagen ist die Bindung an den Wirtsrezeptor. Bei den P2-Phagen ist dies in der Regel das Kernoligosaccharid des LPS (105) (57). Die für die Rezeptorbindung zuständige Struktur ist die Schwanzfaser, wobei der N-terminale Bereich an die Schwanzstruktur angeheftet ist, während der C-terminale Bereich an der Rezeptorbindung beteiligt ist. Für die Phagen T2, T4, λ und Mu konnte gezeigt werden, daß Antiseren, die an die Schwanzfaser binden, die Bakteriophagen inaktivieren können, was für eine Rolle bei der Bindung an den Wirtsrezeptor spricht. Da die Schwanzfaser über das Wirtsspektrum eines Bakteriophagen entscheidet, unterliegt sie einem hohen selektiven Druck. Um die Sequenz der Schwanzfaser und damit das Wirtsspektrum zu variieren, gibt es für den Bakteriophagen eine Reihe von Möglichkeiten. Schon einfache Punktmutationen

können zu einer Strukturveränderung der Schwanzfaser führen, auf diese Weise kann auf Rezeptormutationen von Wirtsseite schnell reagiert werden. Außerdem legen die mosaikartigen Homologien zwischen lediglich entfernt verwandten Phagen nahe, daß über horizontalen Gentransfer ein Sequenzaustausch erfolgt. Auf die gleiche Weise können Sequenzen von einem defekten Prophagen oder von im bakteriellen Chromosom verbliebenen Resten von Genen erworben werden. So konnten bei Hybridisierung des T2 Schwanzfasergenes homologe Genfragmente im *E. coli* Chromosom identifiziert werden. Manche Phagen, wie z.B. Mu oder P1, nutzen dagegen invertible DNA-Segmente, um zwischen zwei verschiedenen Schwanzfaser-Strukturen wechseln zu können. Die Phagen λ und T5 wiederum kodieren grundsätzlich für zwei verschiedene Schwanzfaser-Typen. Schließlich wurde noch gezeigt, daß mit einer einzigen Art von Schwanzfaser die Bindung an zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt werden kann. So kann der Phage T4 mit seiner Schwanzfaser sowohl an das LPS als auch an das Außenmembranprotein OmpC von *E. coli* binden (Übersichtsartikel: (57) (129)).

B.1.2.2. Kontrolle des Lebenszyklus

Nach Injektion der Phagen-DNA in die Wirtszelle gibt es für einen Bakteriophagen zwei prinzipielle Strategien: (1) die Lysogenie, die zur Integration des Phagen-Genoms in das Chromosom des Wirtes führt, oder (2) die Lyse. Von zentraler Bedeutung für die Kontrolle dieser Prozesse ist bei den P2-Phagen die Lysis/Lysogenie-"Switch" Region, die aus gegenüberstehenden, überlappend transkribierten Promotoren besteht, die sich gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen (Abb. B.3).

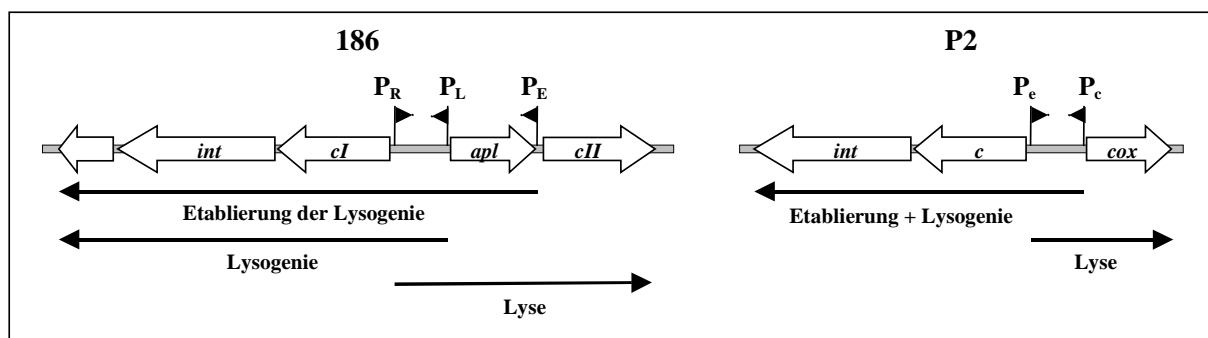


Abb. B.3: Lysis/Lysogenie-Kontroll Region der Bakteriophagen 186 und P2. Während im Phagen 186 drei Promotoren an der Regulation beteiligt sind, sind es im P2 Phagen nur zwei. Die Pfeile symbolisieren die Transkripte, die zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Lysogenie bzw. zum lytischen Lebenszyklus benötigt werden.

Der genaue Ablauf der Genregulation in dieser Region soll anhand des Phagen 186 erläutert werden. Im Grundzustand ist der P_R -Promotor wesentlich stärker als der P_L -Promotor und verhindert dessen Transkription (37). Zur Etablierung der Lysogenie wird deshalb die Aktivität der Gene *cI* und *cII* benötigt (81). *cII* kodiert für einen transkriptionellen Regulator, der zu einer Aktivierung des P_E Promotors führt (Abb. B.4).

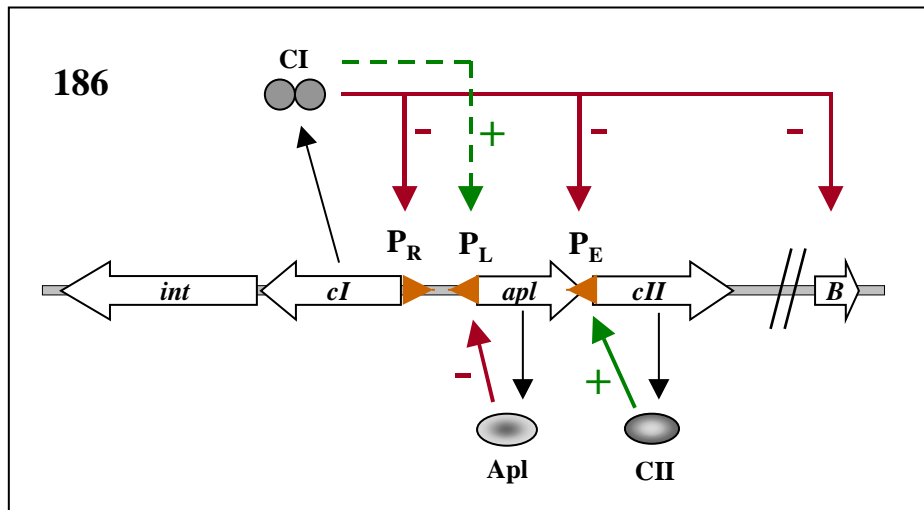


Abb. B.4: Regulationsschema für die Etablierung des lysogenen Zustandes am Beispiel des Phagen 186. Die drei Promotoren der Kontroll-Region (P_R , P_L , P_E) sind durch die orangenen Pfeilspitzen dargestellt. Rote Pfeile (-) symbolisieren Repression, grüne Pfeile (+) Aktivierung und der unterbrochene grüne Pfeil schwache Aktivierung des entsprechenden Promotors.

Während der lytische P_R -Promotor unter normalen Umständen stärker als die lysogenen Promotoren P_E und P_L ist, wird durch die Bindung von CII an P_E die Aktivität dieses Promotors deutlich erhöht, so daß es nun zu einer effektiven Expression von CI kommen kann. Das anfänglich vom starken P_R -Promotor transkribierte Apl kann zwar die Aktivität des P_L -Promotors reprimieren, nicht aber die des P_E -Promotors, so daß durch die CII-Aktivität am P_E -Promotor die CI und die Int Konzentration in der Zelle erhöht wird. Das Int Protein führt zu einer Integration der Phagen-DNA in das Chromosom des Wirtes, CI dagegen bewirkt die Repression sowohl des P_R -Promotors als auch des P_E -Promotors, so daß nur noch der P_L -Promotor eine schwache Aktivität zeigt, die aber für die Aufrechterhaltung des lysogenen Zustandes ausreichend ist (37) (111) (134). Nimmt die Konzentration an CI Repressor in der Zelle ab, was beim Phagen 186 nach Induktion der Lyse durch UV-Licht oder Mitomycin C geschieht, kann die Repression des lytischen Promotors nicht länger aufrecht erhalten werden und der Phage geht in den lytischen Lebenszyklus über. Die Hauptrolle spielt dabei das Tum Protein, dessen Transkription durch die Aktivierung des SOS-Systems ermöglicht wird. Das Tum Protein verhindert die Bindung des CI-Repressors an seine Bindungsstellen und hebt damit die Repression des lytischen Promotors P_R auf (133). Die nun einsetzende Transkription von diesem Promotor erhöht die Apl Konzentration in der Zelle. Apl bindet einmal an P_L und verhindert dessen weitere Transkription, zum anderen bindet es an die "Attachment-Sites" und führt zu einer Excision der Phagen-DNA (121). Die DNA zirkularisiert nun, was den Beginn der replikativen Phase einleitet. Im P2-Phagen ist der Mechanismus der Regulation etwas einfacher als bei 186. Zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Lyse wird nur das C Protein benötigt. Das Cox Protein funktioniert analog zum Apl Protein von 186 als Repressor des lysogenen Promotors und unterstützt die Excision des Phagengenoms (Übersichtsartikel: (41)). Die Regulations-Proteine von HP1 weisen Homologie zu der des 186 Phagen auf und scheinen über einen ähnlichen Mechanismus zu funktionieren (43).

Die Regulation der späten Gene des Morphogenesis Clusters erfolgt über den Aktivator B in 186 bzw. Ogr in P2 (35). Dieses Protein weist ein Zink-Finger Motiv auf, daß auch in späten Regulatoren anderer Bakteriophagen zu finden ist (120) (28). Es wurde gezeigt, daß dieses Protein mit der RNA Polymerase des Wirtes interagiert und diese somit zu den späten Phagen-Promotoren dirigiert (156). Im Phagen 186 konnte gezeigt werden, daß die Transkription des *B* Gens vom lytischen Repressor CI reprimiert wird (36).

B.1.2.3. Schutz vor Superinfektionen

Bakteriophagen haben eine Reihe von Strategien entwickelt, um eine Superinfektion von Phagen derselben oder einer anderen Phagengruppe zu verhindern. Diese greifen in die verschiedenen Stadien des Infektionszyklus eines superinfizierenden Phagen ein. Lysogene Konversion verhindert durch Veränderung des Rezeptors die Bindung eines superinfizierenden Phagen, wie z.B. bei den Phagen P22 (146), N15 oder Φ 80 (151). Exklusion dagegen verhindert die DNA-Injektion in die lysogene Zelle, wie für das Sim Protein von P1 (77), das Imm Protein von T4 (91) oder für Orf97 von 186 beschrieben (19). Schließlich können Immunitäts-Systeme die weitere Entwicklung eines Phagen in der Zelle unterbinden, indem sie essentielle Funktionen reprimieren. Der P2 Phage kodiert mindestens für zwei solcher Immunitätsproteine. Das Old Protein konnte als eine Exonuklease identifiziert werden, die sowohl DNA als auch RNA degradieren kann. Es wurde gezeigt, daß dieses Protein bei Superinfektion einer lysogenen P2-Zelle mit λ die freien Enden vor dem Ringschluß degradiert und dadurch die weitere Etablierung der Infektion verhindert (104). Das Tin Protein dagegen interferiert mit den virulenten "T-even" Phagen, indem es ein ss DNA-bindendes Protein blockiert, das für die Replikation der T-Phagen benötigt wird (21).

B.1.2.4. Replikation

Die Phagen P2 und 186 replizieren mit Hilfe eines modifizierten "rolling circle" (RC) Mechanismus, wie schon in den 70er Jahren durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden konnte (131) (27). Der RC Mechanismus allgemein wird sowohl zum konjugativen Transfer von Plasmiden als auch für die Replikation von verschiedenen kleinen Plasmiden, Viren und Bakteriophagen benutzt. Die Replikation der P2-Phagen ist dabei scheinbar näher mit der Replikation von Plasmiden als mit der von anderen Bakteriophagen, wie z.B. von λ verwandt. Anhaltspunkt dafür ist einmal, daß die P2-Phagen als bisher einzige bekannte temperente Phagengruppe ausschließlich über diesen Mechanismus replizieren. λ nutzt diese Form der Replikation nur für die späte Phase, in der nicht mehr die Produktion von Matrizen für die Proteinsynthese, sondern die Herstellung von DNA Molekülen für die Verpackung in die Kapside im Vordergrund steht. Zudem sind die als Substrat für diese Verpackung dienenden Endprodukte der P2 Replikation nicht, wie

beispielsweise bei λ , lange Konkamere, sondern kovalent geschlossene, monomere Ringe (114).

Initiation und Termination erfolgt bei P2 und 186 durch das Protein A. Zum einen ist es an der Assoziation der DNA mit der bakteriellen Membran beteiligt, zum anderen katalysiert es einen einzelsträngigen "Nick" an der *ori* Sequenz, der ein freies 3'OH-Ende als Primer für die DNA Polymerase bildet (26). In einer vergleichenden Studie einer großen Anzahl von RC Replikationsproteinen konnten drei konservierte Motive identifiziert werden, deren Anwesenheit und Orientierung eine Einteilung in zwei verschiedene Gruppen ermöglicht, die Rep (Replikations-) und die Mob (Mobilisations-) Gruppe. Die Replikationsproteine der P2-Phagen gehören dabei der Superfamilie I der Rep-Klasse an (78). Im Gegensatz zu 186 benötigt P2 die Aktivität eines weiteren Phagenproteins, B, das die Wirts-Helikase DnaB zum Replikationsursprung von P2 leitet (137) (49) (115). Daneben sind beide auf verschiedene zusätzliche Wirtsproteine für die Replikation angewiesen (89).

B.1.2.5. Verpackung

Ist der Zusammenbau des Nukleokapsids abgeschlossen, erfolgt die Verpackung der DNA durch das Terminase-Enzym. Dieses Verpackungsenzym besteht aus zwei Untereinheiten. Die kleine Untereinheit erkennt die Phagen-DNA und dirigiert sie zu den Prokapsiden. Die große Untereinheit bindet an die Prokapside, schneidet und translokalisiert die DNA unter ATP-Verbrauch durch die Portal-Struktur in die Prokapside. Während der grundlegende Mechanismus der Verpackung bei allen Phagen ähnlich abläuft, gibt es zum Teil große Unterschiede hinsichtlich der Art des Verpackungssubstrates und der Prozessierung der DNA. Die Prozessierung der DNA wiederum beeinflusst das Aussehen der reifen DNA in den Phagenpartikeln (48). Als Substrat für die Verpackung dienen in vielen Fällen Konkamere, also Moleküle, die aus mehreren hintereinander geschalteten Phagengenomen bestehen. Diese können entweder direkt bei der Replikation entstehen (λ) oder sie werden vor der Verpackung aus einzelnen Genomeinheiten durch homologe Rekombination oder Ligation von kohäsiven Enden hergestellt (T7, T3). Die Länge der Konkamere schwankt zwischen 2-3 Genomeinheiten bei λ und 3-5 bei P22. P2 dagegen verpackt monomere, zirkuläre Genome.

Die Verpackung beginnt mit dem initialen Schnitt der DNA, das geschnittene DNA-Ende wird in das Kapsid translokalisiert und nach dem Füllen des Kapsids durch den terminalen Schnitt beendet. Dann wird das durch diesen terminalen Schnitt entstandene Ende in das nächste Kapsid verpackt usw. Pro Konkamer gibt es also nur einen initialen Schnitt, aber mehrere terminale Schnitte. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Prozessierungsformen der DNA liegen in der Spezifität der durchgeführten Schnitte.

Bei *cos*-*"Site"* Phagen erfolgt sowohl der initiale als auch der terminale Schnitt an einer spezifischen Sequenz, der sogenannten *cos*-*"Site"*. Die entstehende reife DNA hat deswegen immer die gleichen Enden, die der *cos*-*"Site"* entsprechen. Es gibt also keine Unterschiede in der Lage des Schnittes zwischen den verschiedenen Genomeinheiten eines Konkatomers, die aus verschiedenen Phagenköpfen isolierte DNA ist entsprechend nicht permutiert. Es wird genau eine Genomlänge in den Phagenkopf verpackt, da nach einer Genomlänge ja wieder die nächste *cos*-*"Site"* zu finden ist, an der der terminale Schnitt durchgeführt wird. Die DNA weist also keine terminale Redundanz auf. Der Schnitt wird versetzt durchgeführt, so daß die reife DNA kohäsive Enden besitzt (14). Die P2-Phagen nutzen bisher alle diesen Mechanismus der Verpackung.

Bei *pac*-*"Site"* Phagen dagegen erfolgt nur der initiale Schnitt innerhalb einer spezifischen Sequenz, der *pac*-*"Site"*. Die DNA wird solange in die Kapside translokalisiert, bis diese voll sind. Erst dann erfolgt der terminale Schnitt an einer beliebigen Stelle. Die Länge der DNA, die in das Kapsid paßt, ist von Phagenart zu Phagenart verschieden, entspricht aber immer mehr als einer Genomlänge, die DNA ist also terminal redundant. P22 verpackt z.B. 104% des Genoms, P1 dagegen sogar 112%. Das nachfolgende Genom innerhalb eines Konkatomers beginnt also nicht an der gleichen Sequenz wie das vorhergehende, sondern um eine bestimmte Länge im Vergleich zur vorher prozessierten DNA versetzt (4% bei P22, 12% bei P1). Vergleicht man die reife DNA aus verschiedenen Kapsiden, findet man Phagen-Genome mit unterschiedlich versetzten Enden, das Genom ist also permutiert. Genome, die innerhalb eines Konkatomers an einer äquivalenten Position waren, gleichen sich jedoch in ihren Enden, da der terminale Schnitt immer nach einer genau definierten Länge erfolgt, die dem Fassungsvermögen des Kapsides entspricht. Die Permutation ist demnach nicht zufällig, sondern zirkulär (14).

Schließlich gibt es auch Phagen, die sowohl den initialen als auch den terminalen Schnitt völlig unspezifisch durchführen. Der terminale Schnitt ist ebenfalls nur abhängig vom Fassungsvermögen des Kapsids. Auch hier wird mehr als eine Genomlänge verpackt, die DNA ist also wie bei den *pac*-*"Site"* Phagen terminal redundant und permutiert. Da aber selbst der initiale Schnitt an einer zufälligen Stelle erfolgt, besitzen alle Genome, die aus verschiedenen Partikeln isoliert werden, ein anderes Ende. Die DNA ist demnach völlig zufällig permutiert. Dieser Mechanismus wird als "headful cutting" bezeichnet, ein Beispiel hierfür ist der T4 Phage (14).

B.1.2.6. Lyse

Die P2-Phagen nutzen eine ähnliche Strategie zur Lyse der Wirtszelle wie der Phage λ . Durch die Aktivität eines membranständigen Holins werden Läsionen in der Cytoplasmamembran erzeugt, durch die dem Endolysin, das die Mureinschicht der Zellwand degradiert,

der Zugang zu seinem Substrat ermöglicht wird. Es gibt verschiedene Typen von Endolysinen, je nachdem welche der kovalenten Bindungen des Peptidoglykans von ihnen attackiert werden. Glykosidasen, auch Muramidasen oder Lysozyme genannt, ebenso wie Transglykosylasen spalten die glykosidischen Bindungen, Amidasen und Endopeptidasen dagegen die Peptidvernetzungen (155). Während der Synthese der späten Proteine akkumulieren die Holine in der Membran, um dann zu einem genau abgestimmten Zeitpunkt die Lyse der Zelle herbeizuführen. Das genaue "Timing" dieses Prozesses ist dabei von enormer Wichtigkeit. Wird die Lyse zu früh induziert, bricht der Energiestatus der Zelle zusammen und ein Zusammenbau unfertiger Phagenpartikel ist nicht mehr weiter möglich, somit sinkt die Zahl der infektiösen Phagenpartikel. Wird die Lyse dagegen zu spät induziert, verzögert sich die Zeit bis zur Infektion eines neuen Wirtes und damit die Produktion neuer Phagenpartikel. Somit unterliegt die Abstimmung des Lyseprozesses einem enormen evolutiven Druck (53).

Entsprechend wurden verschiedene Möglichkeiten zur Feinabstimmung dieses Prozesses herausgebildet. Zum einen erfolgt dies über die Synthese eines Holin-Antagonisten, zum anderen gibt es in manchen Systemen zusätzliche Hilfsproteine, die vermutlich die Verankerung der äußeren Membran mit der Zellwand oder die äußere Membran selbst attackieren (158). Die Lysecluster unterliegen allgemein einer großen Variabilität, auch innerhalb der P2-Phagen gibt es einige Unterschiede. Konserviert ist nur die Abfolge von Holin und anschließendem Endolysin, Sequenzhomologien gibt es nur zwischen den entsprechenden P2 und 186 Proteinen. Im Gegensatz zu den anderen P2-Phagen besitzt P2 einen Holin-Inhibitor, *lysA*. Mutationen in diesem Gen führen zu einer beschleunigten Lyse. Als weiteren Bestandteil dieses Clusters konnte in P2 das putative Hilfsprotein LysB identifiziert werden. *lysB* Mutanten zeigen eine leicht verzögerte Lyse. Ein ähnliches Protein ist auch in den anderen P2-Phagen zu finden (119).

B.1.3. Phagenevolution

Genomanalysen von ds DNA Phagen der Gruppe *Caudovirales* haben gezeigt, daß die Genome dieser Phagengruppe eine mosaikartige Struktur aufweisen. Dabei sind homologe Sequenzen immer wieder von nicht-homologen Bereichen unterbrochen. Eine Erklärung dieser Beobachtung liefert die Modultheorie. Demnach werden ganze funktionelle Module, die unabhängig voneinander in verschiedenen Wirtsgenomen evolviert sind, über Rekombination zwischen verschiedenen ds DNA Phagen ausgetauscht. Ursprünglich wurde vermutet, daß der Austausch über homologe Rekombination zwischen speziellen Linker-Sequenzen abläuft (146). Doch haben sich die Hinweise darauf vermehrt, daß illegitime an Stelle von homologer Rekombination für viele der Mosaikstrukturen verantwortlich sein könnte. Zudem erfolgt oft auch eine Integration von Morons, d.h. kleinen, eigenständigen

transkriptionellen Einheiten, die aus einem einzelnen Gen mit eigenem Promotor und Terminator bestehen (61). Auch die Integration dieser Elemente erfolgt durch illegitime Rekombination. Da einzelne homologe Gene oft in verwandtschaftlich weit entfernten Phagengruppen auftreten, wird vermutet, daß alle ds DNA Phagen einen gemeinsamen Genpool bilden, der Zugang zu diesem Genpool ist allerdings nicht für alle Bakteriophagen gleich (62).

B.2. *Vibrio cholerae* und Cholera

B.2.1. Eigenschaften und Klassifikation von *V. cholerae*

V. cholerae, der Erreger der Cholera, ist ein Gram-negatives, kommaförmig gebogenes Stäbchenbakterium mit einer polaren, monotrichen Begeißelung. Entdeckt wurde das Bakterium 1883 durch Robert Koch. Es gehört zur Familie der *Vibrionaceae*, Kennzeichen der Gattung *Vibrio* ist ein fakultativ anaerobes Wachstum und eine Oxidase-positive Reaktion, die sie von den *Enterobacteriaceae* unterscheidet ((70), Übersichtsartikel).

V. cholerae kann aufgrund der Agglutinationseigenschaften seiner somatischen Antigene (O-Antigene) in verschiedene Serogruppen eingeteilt werden, das flagelläre H-Antigen ist bei allen bisher bekannten Choleravibrionen gleich (76). Bis heute sind bereits über 200 Serogruppen bekannt ((122), Übersichtsartikel). Als Erreger der epidemischen Cholera sind bisher allerdings nur Vibrionen der Serogruppen O1 und O139 aufgetreten. Die Serogruppe O1 kann noch weiter unterteilt werden, einmal aufgrund somatischer Varianten in die drei Serotypen Inaba, Ogawa und Hikojima, zum anderen aufgrund physiologischer Eigenschaften in die Biotypen klassisch und El Tor. So sind El Tor Vibrionen beispielsweise resistent gegenüber Polymyxin B, agglutinieren Hühner-Erythrozyten und zeigen ein anderes Phagenresistenz-Muster als klassische Stämme (95). Die Serotypen dagegen werden bestimmt durch eine unterschiedliche Ausprägung der antigenen Determinanten A, B und C, wobei eine Konversion von einem Serotyp zum anderen auftreten kann (145). Vertreter anderer Serogruppen, zusammengefaßt als Nicht-O1/O139 Stämme, sind bisher allenfalls als Verursacher sporadischer Diarrhoe-Fälle und extraintestinaler Infektionen aufgetreten (45).

B.2.2. Die Krankheit Cholera

Seit dem Beginn der regelmäßigen Aufzeichnungen im Jahre 1817 wurden sieben Cholera-Pandemien gezählt, wobei die letzte zur Zeit noch anhält. Während die Ausbrüche der Krankheit vor 1817 mehr oder weniger auf den indischen Subkontinent beschränkt waren, hat sie seit dieser Zeit eine immer größere weltweite Verbreitung erfahren. Als natürliches Habitat von *V. cholerae* dienen aquatische Ökosysteme, das Bakterium persistiert meist in

einem "Viable but non-culturable" (VBNC)-Stadium. Auch konnte eine Assoziation mit Copepoden gezeigt werden, ein einziger Copepod kann dabei bis zu 10^4 *V. cholerae* Zellen tragen. Daneben können auch die Oberflächen von anderen Crustaceen und Insekten, aber auch von Wasserpflanzen und Grünalgen besiedelt werden. Ein Grund für die Besiedlung von Oberflächen könnte der Schutz vor den ansonsten harten Umweltbedingungen im freien Wasser sein. ((30), Übersichtsartikel).

Die Infektion mit *V. cholerae* erfolgt oral durch Aufnahme des Erregers in kontaminiertem Wasser oder Lebensmitteln. Bei erfolgreicher Passage durch den Magen beginnen die Bakterien die Kolonisation im Dünndarm, bevorzugt im Bereich des Jejunums. Bei Untersuchungen im Mausmodell wurden stabile Populationen auch im Bereich des Cäcums und sogar im Dickdarm gefunden (4). Sie penetrieren rasch durch die Schleimschicht und dringen so bis in den Kryptenbereich der Epithelzellen vor (siehe Übersichtsartikel (70)). Dort adhären sie, beginnen sich zu teilen und bilden so Mikrokolonien, eine Invasion der Darmepithelzellen findet nicht statt. Zu diesem Zeitpunkt setzt die Sekretion des Cholera-toxins ein, was zu den beobachteten massiven Wasser- und Elektrolytverlusten führt. Die Konzentration an Cholera-vibriosen kann bis zu 10^7 bis 10^8 Bakterien pro ml Stuhl betragen. Bei Stuhlvolumina zwischen 500 und 1000 ml pro Stunde in schweren Cholerafällen wird die hohe Vermehrungsrate der Bakterien im Darm deutlich. Auf diese Weise werden große Mengen an Krankheitserregern in die Umwelt freigesetzt, was zu einer raschen Verbreitung der Krankheit und damit zu den gefürchteten Cholera-Epidemien führt.

Die Inkubationsdauer schwankt zwischen 12 Stunden bis zu 5 Tagen, je nach Infektionsdosis und Disposition des Patienten. Die Symptome können plötzlich eintreten, manchmal kündigt sich die Erkrankung aber auch durch Appetitlosigkeit, abdominale Beschwerden und leichte Diarrhoe an. Die Diarrhoe nimmt dann aber rasch zu und der Stuhl zeigt das typisch reiswasserartige Aussehen, das durch die Ausscheidung von Mukus zustande kommt. Nach einigen Stunden tritt zudem noch Erbrechen ein. Als Folge der Austrocknung ist die Urinausscheidung vermindert oder fehlt ganz. Die Körpertemperatur ist meist normal oder erniedrigt. Bei starkem Kaliumverlust kommt es zu schmerzhaften Muskelkrämpfen. Ohne Behandlung kann schon nach 12 Stunden der Tod des Patienten eintreten. Die Mortalität schwankt je nach Alter zwischen 20-70% in unbehandelten Fällen. Die Therapie zielt einmal auf die orale oder intravenöse Rehydrierung des Patienten ab, zum anderen kann die Gabe von Antibiotika (v.a. Tetrazyklin) den Krankheitsverlauf mildern und abkürzen (Übersichtsartikel: (70)).

B.2.3. Pathogenitätsfaktoren und mobile genetische Elemente

Seit August 2000 steht die vollständige Sequenz des *V. cholerae* O1 Genoms zur Verfügung, was die genetischen Untersuchungen des Bakteriums erheblich erleichtert. Eine Besonderheit von *Vibrio* ist, daß es zwei zirkuläre Chromosomen trägt, eines mit 2.9 Mbp, das andere mit 1.1 Mbp, die zusammen für etwa 3900 ORFs kodieren. Viele Gene, die für zentrale Bestandteile sowohl des Zellhaushalts als auch der Pathogenität kodieren, sind auf dem Chromosom 1 lokalisiert. Chromosom 2 dagegen trägt viele hypothetische Gene und solche unbekannter Funktion. Es gibt einige Hinweise darauf, daß das Chromosom 2 möglicherweise ursprünglich ein Megaplasmid war, daß von möglichen *Vibrio* Vorläufer-Bakterien erworben wurde (60).

B.2.3.1. Toxine

Schon Robert Koch hatte im Jahre 1884 die Symptome der Cholera auf die Einwirkung eines Giftes auf die Darmepithelzellen zurückgeführt. Die Aufreinigung dieses Toxins gelang im Jahre 1969. Dadurch war es möglich, durch Gabe verschiedener Dosen von Cholera-toxin an Freiwillige zu zeigen, daß die massiven Symptome allein durch dieses Toxin ausgelöst werden können. Die Strukturaufklärung führte zur Identifizierung von zwei verschiedenen Untereinheiten, wobei das Toxin aus fünf B-Untereinheiten und einer einzelnen A-Untereinheit aufgebaut ist. Die B-Untereinheiten dienen der Bindung des Toxins an den zellulären Rezeptor, während die A-Untereinheit die eigentliche enzymatische Aktivität entfaltet. Als Rezeptor fungiert das Gangliosid GM₁, das auf den Epithelzellen der Darmmukosa lokalisiert ist. Das Cholera-toxin wird in die Zelle aufgenommen und bewirkt eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels der Zelle, der letztlich zu einer vermehrten Cl⁻-Sekretion und zu einem passiven Ausstrom von Wasser in das Darmlumen führt ((69), Übersichtsartikel).

Ebenfalls auf dem CTX Φ Phagen kodiert ist das *ace* Gen, dem auch eine toxische Wirkung zugesprochen wird. Es wird vermutet, daß es in die eukaryotische Membran inseriert und dort einen Ionenkanal bildet. Stämme, die das klonierte *ace* Gen tragen, verursachen eine Flüssigkeits-Akkumulation im Tiermodell. In Zellkulturen mit HeLa Zellen konnte ein Shiga-ähnliches Cytotoxin identifiziert werden, daß ebenso wie das auch in Nicht-O1 Stämmen zu findende ST-Toxin Diarrhoe verursachen kann (Übersichtsartikel: (70)). Aus einem O1 Stamm konnte außerdem das Toxin WO7 isoliert werden, daß wie das Cholera-toxin an das GM₁ Gangliosid zu binden scheint, aber immunologisch nicht mit diesem kreuzhybridisiert (154).

Ein ursprüngliches Unterscheidungsmerkmal für El Tor im Gegensatz zu klassischen Stämmen ist die Fähigkeit zur Hämolyse von Schaferythrozyten. Das Hämolysin HlyA, das

jedoch nicht von allen El Tor Stämmen gleich stark exprimiert wird, zeigt auch cytolytische Aktivität gegenüber Säugerzellen in Zellkultur. Auch Nicht-O1/O139 Stämme produzieren ein identisches Hämolysin. Bei klassischen Stämmen konnte das *hlyA* Gen ebenfalls nachgewiesen werden, doch sind 11 bp des Gens deletiert ((70), Übersichtsartikel). In Zellkulturen mit HEp-2 Zellen konnte ein weiteres Cytotoxin nachgewiesen werden, das zur Gruppe der RTX (repeats in toxin) Toxinfamilie gehört. Es ist mit einem ABC Transportersystem assoziiert und benötigt den Aktivator RtxC. Dieser ist in klassischen Stämmen deletiert, deshalb fehlt ihnen die cytotoxische Aktivität (85).

B.2.3.2. Kolonisierungsfaktoren

Welche Rezeptoren auf der Wirtsseite für die Adhäsion von *V. cholerae* verantwortlich sind, ist noch nicht bekannt. Im Tiermodell konnten einige bakterielle Faktoren identifiziert werden, die eine Rolle bei der Kolonisierung des Dünndarmes spielen. Über *TnphoA* Mutationen wurde TCP (Toxin coregulierter Pilus) als ein wichtiger Faktor in der Kolonisierung identifiziert, dessen Bedeutung auch durch die Applikation an freiwillige Testpersonen bestätigt werden konnte. Dieser bildet lange, bündelförmige Pili, die zu den Typ IV Pili gehören (Übersicht in (70)). Sie bestehen aus polymerisierten Untereinheiten, die von einem einzigen Gen, *tcpA*, kodiert werden. Der TCP wurde außerdem als der Rezeptor für den Cholera-toxin-Phagen identifiziert (152). Ihre Bedeutung in der Kolonisierung könnte weniger in der Adhäsion an die Wirtszellen als vielmehr in der Wechselwirkung der Bakterien untereinander liegen, die für die Bildung der Mikrokolonien wichtig ist ((122), in Übersicht). Im Mausmodell wurden weiterhin Mutanten mit reduzierter Kolonisierungsfähigkeit gefunden, die im *acf* Locus (accessory colonization factor) beeinträchtigt waren. Dieser Locus ist direkt neben dem *tcp* Locus gelegen. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt. Über seine hämagglutinierenden Eigenschaften wurde das MSHA (Mannose sensitives Hämagglutinin) entdeckt. Es wurde als ein dünner, flexibler Pilus identifiziert, der wie der TCP zu den Typ IV Pili zählt. Als weiteres Hämagglutinin wurde das MFRHA (Mannose-Fucose resistentes Hämagglutinin) entdeckt, das wahrscheinlich ein Protein in der äußeren Membran darstellt. Auch anderen Membranproteinen wird eine Rolle in der Kolonisierung zugesprochen, so z.B. *TcpC*, das an der Bildung des TCP-Pilus und an der Serumresistenz beteiligt ist ((70), Übersichtsartikel).

Die Motilität der Vibriolen ist ebenfalls notwendig für die Etablierung der Infektion im Tiermodell. Dabei wurde der Chemotaxis eine zentrale Rolle zugeschrieben, zum einen weil die Expression bestimmter Chemotaxis-Gene notwendig für die zeitliche Abstimmung der Cholera-toxin-Expression ist (83). Zum anderen ermöglicht sie das gezielte Aufsuchen der Mukus-Schicht und damit die schnelle Durchdringung hin zum darunterliegenden Epithel, bevor die Peristaltik die Bakterien in den Dickdarm trägt ((70), Übersichtsartikel). Doch konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, daß frisch aus dem Stuhl der

Cholera-Patienten isolierte, hyperinfektiöse Vibrionen gerade in vielen Chemotaxis-Genen reprimiert waren. Trotzdem waren sie hoch motil, so daß vermutet wird, daß die fehlende Fähigkeit zur Chemotaxis eine Disseminierung der Infektion auch in andere Darmabschnitte ermöglicht (99).

B.2.3.3. Mobile genetische Elemente

Bakteriophagen

Die Bakteriophagen von *V. cholerae* wurden schon in Kap. B.1.1. vorgestellt.

Pathogenitätsinsel

Der wichtigste Kolonisierungsfaktor von *V. cholerae*, TCP, ist auf der VPI (*V. cholerae* pathogenicity island) kodiert. Die Charakteristika für eine Pathogenitätsinsel (PAI) sind allgemein die Abwesenheit in nicht-pathogenen Stämmen, ein vom Rest des Genoms differierender GC-Gehalt, die Anwesenheit virulenz-assoziiierter Gene, von Regulatoren für Virulenz und Mobilität der PAI und Integration neben einem tRNA-Gen. Die Größe der VPI beträgt 40 kb. Virulenzassoziierte Gencluster sind das *tcp*- und das *acf*-Cluster. Außerdem kodiert die VPI auch für den Regulator ToxT sowie für die Regulatoren TcpPH. Bei manchen Genen kann eine Funktion vermutet werden. So weist TagA Homologie zu einer Pilus-Biosynthese-Determinante auf, TagD könnte aufgrund der Homologie an der Fimbrien-Synthese beteiligt sein und TagE hat Ähnlichkeit mit Lysostaphin aus *Staphylococcus*. Vielen Genen konnte bisher noch keine Funktion zugeschrieben werden. Da das in der VPI kodierte TcpA den CTX Φ Rezeptor darstellt, kann der Erwerb dieser PAI als ein entscheidender Schritt innerhalb der Evolution epidemischer *Vibrio* Stämme angesehen werden (Übersicht: (75)).

Plasmide

Plasmide, die für eine Reihe von Antibiotika (AB)-Resistenzen kodieren, konnten aus einer Vielzahl von *V. cholerae* Stämmen isoliert werden. Diese Plasmide, auch R-Faktoren genannt, sind mit meist 110-170 kb ziemlich groß. Es wurden schon Plasmide gefunden, die bis zu sieben verschiedene Resistenzen kodierten. Ein etwas kleineres Plasmid, der 68 kb große P-Faktor, ist dagegen in der Lage, chromosomale Gene zu mobilisieren. Dieses Plasmid kann allerdings nur selten aus Wildtyp-Stämmen isoliert werden. Stämme mit diesem P-Faktor sind in ihrer Virulenz in starkem Maße attenuiert, der Grund hierfür ist allerdings noch nicht bekannt. Mit CT-positiven Stämmen hoch assoziiert ist das 4.7 kb große kryptische Plasmid pTLC (toxin-linked cryptic), das sowohl als extrachromosomale Form als auch chromosomal integriert gefunden werden kann. Die Insertionsstelle ist dabei unmittelbar

stromaufwärts von CTX Φ gelegen. In der chromosomalen Form ist es tandemartig dupliziert, so daß eine homologe Rekombination zwischen den direkt wiederholten Sequenzen zur Entstehung der extrachromosomalen Form führen könnte. Mittlerweile wurde ein Gen auf diesem Plasmid gefunden, das Homologie zu Replikationsproteinen filamentöser Phagen aufweist. Da ein vergleichbares Gen in CTX Φ fehlt wird vermutet, daß dieses Gen auch für dessen Replikation benötigt wird ((75), Übersichtsartikel).

Konjugatives Transposon

Eine weitere Übertragung von AB-Resistenzen kann bei *V. cholerae* über das SXT-Element erfolgen, das zur Gruppe der konjugativen Transposons gehört. Diese genetischen Elemente werden über Konjugation verbreitet, verbleiben aber nicht als Plasmid in der Zelle, sondern integrieren sequenzspezifisch in das Genom ihres Wirtes. Das SXT-Element hat eine Größe von ca. 100 kb und vermittelt die Resistenz gegenüber den Antibiotika Sulfamethoxazol, Trimethoprim, Chloramphenikol und Streptomycin. Es wurde mittlerweile in fast allen klinischen Isolaten des indischen Subkontinents gefunden. *In vitro* ist eine Übertragung in eine Reihe anderer Gram-negativer Bakterien gezeigt worden, außerdem kann das SXT-Element den Transfer einiger mobilisierbarer Plasmide sowie von chromosomaler DNA nach einem Hfr-ähnlichen Mechanismus aktivieren (8).

Integron

Die ca. 120 bp lange Sequenz des VCR (*V. cholerae* repetitive DNA sequence) wurde in einer Kopienzahl von 60-100 Stück im *V. cholerae* Genom gefunden. Diese Sequenzen liegen jedoch nicht verteilt über das *Vibrio* Genom vor, sondern konzentrieren sich in einem engen Bereich. Es wird vermutet, daß die VCRs ein Mega-Integron darstellen. Diese genetischen Elemente können heterologe Gene (Genkassetten) "einfangen" und zu ihrer Verteilung beitragen. Die Insertion dieser Genkassetten erfolgt in einer sequenzspezifischen Weise. Zentraler Bestandteil des Integrons ist entsprechend eine Integrase, die mit einer spezifischen "Attachment-Site" gekoppelt ist. VCR Sequenzen wurden beispielsweise neben dem MFRH Gen oder in Nicht-O1 Stämmen neben einem Gen, das für ein hitzestabiles Enterotoxin kodiert, gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, daß das VCR-System zum Erwerb dieser Gene beigetragen hat ((75), Übersichtsartikel).

LPS-Biosynthesecluster

Das Auftauchen einer neuen Serogruppe als Verursacher pandemischer Ausbrüche im Jahre 1992 führte zur Vermutung, daß ein horizontaler Gentransfer des LPS-Clusters zur Evolution der neuen Stämme beigetragen haben könnte. Tatsächlich konnte nachgewiesen

werden, daß die 22 kb DNA Region, die für das O1-Antigen kodiert, durch eine 35 kb Sequenz ersetzt worden war. Diese neue Region kodiert sowohl für das O139-Antigen als auch für eine Kapsel, O1 Stämme dagegen sind unkapselt. Obwohl der horizontale Transfer der LPS Gene als Ursache für die Entstehung der O139 Stämme als gesichert gilt, konnte bisher weder die Quelle der transferierten Region noch der genaue Mechanismus identifiziert werden. Das sowohl im O1 als auch im O139 Gencluster zu findende IS-Element *IS1358* könnte eine Rolle bei der Insertion der Sequenzen gespielt haben. Hybridisierungen von verschiedenen Nicht-O1 Stämmen mit O139 DNA konnten zeigen, daß nur einzelne Gene dieses LPS-Biosynthesecusters verstreut in verschiedenen Serogruppen zu finden sind, doch keiner dieser Stämme gilt als tatsächlicher Donor für eine DNA Übertragung ((75), Übersichtsartikel).

B.2.3.4. Evolution pathogener *V. cholerae* Stämme

Seit Robert Koch im Jahre 1883 die mikrobiologische Ära der Choleraforschung eingeleitet hat, können die *V. cholerae* Stämme, die die Epidemien verursachen, näher charakterisiert werden. So konnten die in der 5. und 6. Pandemie aufgetretenen Stämme der Serogruppe O1 und dem klassischen Biotypen zugerechnet werden. Die 7. Pandemie dagegen wurde von einem neuen Biotypen verursacht, der nach seinem Isolierungsort El Tor benannt wurde. Dieser Biotyp ruft weniger schwere Krankheitssymptome hervor als der vorangegangene klassische Typ. Beide Stämme können auch physiologisch voneinander unterschieden werden, z.B. durch ihre Agglutinationseigenschaften oder die Resistenz gegenüber Polymyxin B. Doch sind die physiologischen Unterschiede nicht bei allen klassischen und El Tor Stämmen in gleichem Maße ausgeprägt, so daß diese Einteilung von manchen angezweifelt wird. Auch die genetischen Untersuchungen sind widersprüchlich, einige deuten auf einen gemeinsamen Ursprung hin, andere legen eher die Vermutung nahe, daß es sich bei klassischen und El Tor Stämmen um verschiedene Klone handeln könnte ((75), Übersichtsartikel).

Bis zum Jahre 1992 ging man davon aus, daß nur Vibrionen der Serogruppe O1 epidemische Cholera hervorrufen können. Doch seitdem konnte, ausgehend von der Stadt Madras in Südindien, die neue Serogruppe O139 als Verursacher epidemischer Ausbrüche identifiziert werden ((30), Übersichtsartikel). Deshalb wird das Jahr 1992 von manchen als der Beginn der 8. Pandemie angesehen ((122), Übersichtsartikel). Doch konnte die Serogruppe O139 die O1 El Tor Stämme bisher nicht verdrängen. Seit 1994 können sogar wieder vermehrt O1 El Tor Stämme als Verursacher für Cholera-Epidemien beobachtet werden (44). In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß O139 Stämme durch horizontalen Gentransfer eines LPS-Biosynthesecusters aus O1 El Tor Stämmen hervorgegangen sind ((75), Übersichtsartikel). Der genaue Transfermechanismus ist noch unbekannt. Im Gegensatz zu O1 El Tor Stämmen können in der überwiegenden Zahl der

O139 Stämme große Plasmid gefunden werden, die theoretisch in einen horizontalen Gentransfer eingebunden sein könnten. Auch eine Phagentransduktion kommt als möglicher Mechanismus in Frage. So konnte in einem Fall nachgewiesen werden, daß der Verlust eines temperenten Bakteriophagen vom Verlust der O139 Kapselgene begleitet war, so daß wahrscheinlich die chromosomale Insertionsstelle dieses Phagen mit dem Kapsel-Locus verknüpft sein könnte (101).

B.3. Zielsetzung der Arbeit

Trotz der hohen Anzahl an *Caudovirales*, die in *V. cholerae* Stämmen gefunden wurde, liegen bisher keine Sequenzinformationen zu dieser Phagentruppe vor. In dieser Arbeit sollte erstmals die Genomsequenz eines solchen Phagentyps, des Bakteriophagen K139, ermittelt werden. Dieser Phage erscheint auch deshalb interessant, da eine hohe Assoziation mit pathogenen *V. cholerae* Stämmen vorliegt. Ein Hauptziel der Arbeit sollte die Ermittlung und Auswertung der Genomsequenz darstellen, wobei über Sequenzvergleiche mit verwandten Bakteriophagen eine nähere Beschreibung der biologischen Funktionen von K139 abgeleitet werden sollte. Diese Sequenzanalysen sollen in erster Linie als Grundlage für weitere molekularbiologische Fragestellungen dienen. Dabei wird der Schwerpunkt weiterer Arbeiten auf die Aufdeckung der Wirtsspezifität und der Charakterisierung von Phagenregulation und Immunität abzielen.

Darüberhinaus sollte die Verteilung des Phagentyps K139 in unterschiedlichen *V. cholerae* Isolaten charakterisiert werden. Ein Hauptaugenmerk richtet sich dabei auf die Charakterisierung von Unterschieden zwischen diesen Phagentypen. Da die Phagen zum Teil aus unterschiedlichen Serogruppen stammen, das O-Antigen aber als Rezeptor für den Phagen K139 dient, sollten eventuelle wirtsspezifische Unterschiede in den rezeptorbindenden Proteinen ermittelt werden.

C. Material und Methoden

C.1. Bakteriophagen und Bakterienstämme

C.1.1. Bakteriophagen

Der Bakteriophage K139 wurde ursprünglich aus dem *V. cholerae* O139 Stamm MO10 isoliert (123). Eine hochlytische Mutante, K139.cm9, wurde von Nesper (107) durch Transposon-Mutagenese hergestellt. Die Deletions-Mutanten K139 Δ orf2 und K139 Δ cI wurden in dieser Arbeit konstruiert.

C.1.2. *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
CC118	<i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>)7697 Δ <i>lacX74phoA</i> Δ 20 <i>galE galK thi rpsE rpoB argE_{am} recA1</i>	(96)
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>argF lac</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁻) <i>supE44 thi-1 gyrA69 relA1</i> λ ⁻	(58)
GM2163	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>	NEB, Frankfurt
LE392	F ⁻ e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>hsdR514</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>glnV44 supF58 lacY1</i> / Δ (<i>lacIZY</i>)6 <i>galK2 galT22 metB1 trpR55</i>	(136)
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150</i> (Str ^r) <i>relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	NEB
Sm10 λ pir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu</i> λ pirRK6, Km ^r	(100)

Tab. C.1: Die für Klonierungen in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme.

C.1.3. *V. cholerae* Stämme

Stamm	Serogruppe	Herkunft	Referenz
Klinische Isolate:			
ATCC25872	Nicht-O1/O139	Tschechoslowakei 1965	(72)
CO966	O1 El Tor Ogawa	Indien 1994	J. J. Mekalanos
CO968	O1 El Tor Ogawa	Indien 1994	J. J. Mekalanos
CO970	O1 El Tor Ogawa	Indien 1994	(110)
F1873	O1 El Tor Inaba	Zaire 1993	J. J. Mekalanos
F1875	O1 El Tor Inaba	Zaire 1993	J. J. Mekalanos
M654	O1 El Tor	Indien 1991	(73)
M799	O1 El Tor	Hong Kong 1989	(74)
M804	O1 El Tor	Indien 1962	(73)
M807	O1 El Tor	Vietnam 1966	(74)
M817	O1 El Tor	Tschad 1974	(74)
MAK757	O1 El Tor Ogawa	Celebes 1937	(98)
MO3	O139	Indien 1993	(153)
O395	O1 klassisch Ogawa	Indien 1964	(98)
V52	O37	Sudan 1968	(11)
Klinische Manifestation unbekannt:			
10259	O53	1984	(106)
Ch154	Nicht-O1/O139	Togo 1971, Stuhl	J. Bockemühl
Ch187	Nicht-O1/O139	Togo 1971, Stuhl	J. Bockemühl
Ch309	Nicht-O1/O139	Togo 1972, Stuhl	J. Bockemühl
Ch359	Nicht-O1/O139	Togo 1972, Stuhl	(109)
Ch757	Nicht-O1/O139	Deutschland 1977, Gallenblase	J. Bockemühl
Ch762	Nicht-O1/O139	Malta 1983, Blut	(109)
Ch780	Nicht-O1/O139	Deutschland 1985, Blut	(109)

Ch821	Nicht-O1/O139	Kenia 1998, Stuhl	M. Kist
Umweltisolate:			
1528-89	Nicht-O1/O139	Louisiana 1979, Austern	(127)
170/998	O38	Spanien, Krabbe	K. Klose, C. Osorio
2559-78	O1	Louisiana, Krabbe	(127)
3223-74	O1	Guam 1974	(127)
A2-2	Nicht-O1/O139	Texas 2000, Rio Grande	K. Klose
B2-2	O41	Texas 2000, Rio Grande	K. Klose
B2-3	Nicht-O1/O139	Texas 2000, Rio Grande	K. Klose
Ch18001	Nicht-O1/O139	Deutschland 1981, Elbe	J. Bockemühl
Ch18022	Nicht-O1/O139	Deutschland 1981, Elbe	(109)
Ch18117/I	Nicht-O1/O139	Deutschland 1982, Elbe	J. Bockemühl
Ch18133	Nicht-O1/O139	Deutschland 1982, Elbe	(15)
Ch430	Nicht-O1/O139	Togo 1972, Wasser	(16)
Ch433	Nicht-O1/O139	Togo 1972, Fisch	(16)
Ch457	Nicht-O1/O139	Togo 1972, Wasser	(16)
CLP-1	O36	Spanien (2000), Fisch	K. Klose, C. Osorio
E8498	O141	Louisiana 1978, Wasser	(157)
O83	O6	Argentinien 1993, Wasser	K. Klose, M. Waldor
OA2-3	O5	Texas 2000, Rio Grande	K. Klose
Isolate unbekannter Herkunft:			
Ch83	Nicht-O1/O139	Japan, vor 1970	R. Sakazaki
Ch84	Nicht-O1/O139	Japan, vor 1970	R. Sakazaki
O103	O154		K. Klose

Tab. C.2: In dieser Arbeit verwendete *V. cholerae* Stämme. Als Nicht-O1/O139 Stämme werden unbekannte Serogruppen definiert, die nicht mit O1- und O139-Antiserum agglutinieren.

C.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle in den nachfolgenden Tabellen oder im Text nicht aufgeführten Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Eppendorf (Hamburg), Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), Gilson (Bad Camberg), Greiner (Frickenhausen), MWG Biotech (Ebersberg), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Steinheim) bezogen.

Geräte:

Verwendung	Name	Hersteller/Vertrieb
Blotter für DNA	Vakuumblotter	Pharmacia Biotech
Blotter für Proteine	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
DNA-Sequenzierer	LiCor DNA Sequencer Modell 4000	MWG Biotech
	ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Elektrophoresekammer: für Agarosegele für PAA-Gele	Mini Protean 3 Cell	MWG-Biotech; BioRad
	Protean II Xi Cell	BioRad
Elektroporation	Easyject prima	EQUIBIO (Middlesex, UK)
Geldokumentation	Gel-Docu 2000	BioRad
Geltrockner	Drygel Sr Model SE1160	Hoefler Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Hybridisierungsöfen	Shake ´n´ Stack	Hybaid (Ulm)
Kühlzentrifuge: für JA20 und JA14 Rotor für JA10 Rotor	Sorvall RC5B/~Plus	DuPont/Kendro (Hanau)
	J2-HC	Beckman (München)
Photometer	UNICAM 8625 UV/VIS	UNICAM (Cambridge, UK)

Proteinaufreinigung Thermocycler	Gradi-Frac System Mastercycler gradient Omn-E	Pharmacia Biotech Eppendorf Hybaid
Tischzentrifuge Ultrazentrifuge	Biofuge pico/fresco Sorvall OTD-75 L-70 Optima	Heraeus/Kendro DuPont/Kendro Beckman
UV-Linker Zellaufschluß	UV Stratalinker 1800 French Pressure Cell Press	Stratagene (Amsterdam, NL) SLM Instruments/Thermo Spectronic (Madison, USA)

Tab. C.3: GeräteKits:

Verwendung	Name	Hersteller/Vertrieb
DNA-Aufreinigung	Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit	BioRad
	Qiagen Lambda Kit	Qiagen (Hilden)
	QIAquick	Qiagen
	PCR Purification Kit	Qiagen
	Qiagen Maxi Kit	Qiagen
	Nucleobond AX	Macherey-Nagel (Düren)
Gelshift	DIG Gelshift Kit	Roche (Mannheim)
	Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer	Amersham
Sequenzierung	Cycle Sequencing Kit	Amersham
	AmpliTaq FS BigDye Terminator	Applied Biosystems
Southern und Western Blot	ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Kit	Amersham
Subklonierung von PCR-Produkten	pGEM-T Easy	Promega (Mannheim)

Tab. C.4: KitsEnzyme:

Enzyme	Hersteller
DNaseI	Boehringer Mannheim
Lysozym	Roth
Mastermix	Eppendorf
Proteinase K	Roth
Restriktionsendonukleasen	Gibco; NEB (Frankfurt)
Ribonuklease A	Roche
T4 DNA-Ligase	Gibco
Thermoprime	ABgene (Hamburg)
Triple Master	Eppendorf

Tab. C.5: Enzyme

Als DNA-Marker wurde die 1 kb Leiter von Gibco benutzt. Für Coomassie-Färbungen von Proteinen wurde der ungefärbte 10 kDa Protein Marker von Gibco und für Protein-Blots der Kaleidoscope Prestained Standard (broad range) von BioRad verwendet.

Der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper wurde von DAKO (Hamburg) bezogen. Der polyklonale Kaninchen-Anti-Orf2-Antikörper wurde von BioTrend (Köln) hergestellt. Die *V. cholerae* Kaninchen-Antiseren (polyvalentes Anti-*V. cholerae*, Anti-Inaba, Anti-Ogawa) waren von der Firma Difco (Heidelberg).

C.3. Nährmedien und Zusätze

Als Standardmedium für die Anzucht sowohl von *E. coli* als auch von *V. cholerae* wurde LB (Luria-Bertani) -Medium bzw. -Agar verwendet (Gibco). Zum Überschichten der Agarplatten im Plaque-Assay wurde TB-Topagar benutzt (128). Für die *sacB*-Selektion bei der Herstellung chromosomaler Deletionsmutanten wurden Sucrose-Agarplatten (K. Klose) nach folgendem Rezept hergestellt:

5 g Hefe-Extrakt
 10 g Trypton
 100 g Sucrose
 16 g Agar
 auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen, autoklavieren

Antibiotika wurden von Sigma bezogen und laut Handbuch angesetzt (128). In den Nährmedien wurden sie in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

	<i>E. coli</i>	<i>V. cholerae</i>
Ampicillin	50/100 µg/ml	50/100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	50 µg/ml
Chloramphenikol	30 µg/ml	2 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml	100 µg/ml
Tetrazyklin	12 µg/ml	2 µg/ml

Sonstige Zusätze: Das Ansetzen der Lösungen erfolgte wie im Handbuch beschrieben (128).

	Endkonzentration	Hersteller
Anhydrotetrazyklin	200 ng/ml	Arcos (Geel, Belgien)
IPTG (Isopropyl-β-D-Thio- galaktopyranosid)	1 mM	AppliChem
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro- 3-Indolyl-β-D-Galaktose)	40 µg/ml	Roth
X-Phos (5-Bromo-4-Chloro-3- Indolyl-Phosphat-Dinatriumsalz)	40 µg/ml	AppliChem

C.4. Oligonukleotide und Plasmide

C.4.1. Markierte Primer

Name	Sequenz 5'→3'	Position	T _M (°C)
Für K139:			
flaC2	TGCAACCACTGATGTTTCAGC	32195-32176	57
flaC3	TTCACGTTTCTTGGCTGGCT	31500-31481	57
flaC4	CGCCAGCTCATATTCTTCGT	30843-30824	57
K139flaC1	GACAGAATCCGTCAACGCTT	32843-32824	57
K139seq1	TATCAAGAGCTGCCGTTTGC	9518-9537	57
K139seq2	GTTTAGTGTCGAGTTCTGGC	10200-10219	57
K139seq3	GGCAATATCCACCACTCGTT	10902-10921	57
K139seq4	TGATGCTTAAGCCGTTGCC	11560-11578	57

K30-2-1	CTTGAGAAACACACTTGGCG	13554-13535	57
K30-2-2	GTATCACGGTTCCTGCTGA	12911-12892	57
K30-2-3	CAAGAACATCACAGCGCAAG	12317-12298	57
K30HE1a	CGACTTTGTTTCAGCTCGTCA	14070-14089	57
K30HE1a*	TAAACGTGGCCGTGGTAACT	14120-14139	57
K30HE1b	AACCAAACCTTATCCGCCAG	14793-14812	57
K30HE1c	GACGGTCAAAAAGCTCTTCTC	15378-15397	57
K30HE1d	CTAGGAGCATCGCGTAATGT	16019-16038	57
K4-1-1	CGGAAGCGTGTAGGTAACA	20099-20118	57
K4-1-2	GACGGCAAGTGAGCTGTGAT	20723-20743	59
K4-1-3	GTTCCTCGGCTTACTCAGTA	21353-21372	57
K4-2-1	AGTTGTCTTCTTCGCTGAGG	19737-19718	57
K4-2-2	GCTCATTTTGCTGCTTGGCT	19188-19169	57
K4-2-3	CGAGATAACGTTGCTGGCAA	18509-18490	57
K4-2-4	GTTTAGGCCAGAATCCATCG	17948-17930	57
K4-2-5	TTTCCAGATCACCGATGTCG	17360-17341	57
K8-1-1	TTGAGTTGAGTGTGCGGTCA	20367-20348	57
K8HE2a	AACAACGGCCAAGACGAAGA	20849-20868	57
K9-1-1	GCCGCACAACCAATAACGTG	24776-24795	59
K9-1-10	TGGCCAGCGATTCAAGTCAT	30067-30086	57
K9-1-1a	GTTCCGTACTGCCAGATGT	24640-24659	57
K9-1-2	ACACCTGCTGTGTGGATGAT	25375-25394	57
K9-1-3	GGTAGCGGAATGCTTACAT	25957-25976	57
K9-1-4	TCGCCATGAAATTCACAGC	26264-26283	57
K9-1-5	CTCTATCACGCCAAATCGGA	26952-26971	57
K9-1-6	GTGCCGAGCTAAAAACGAG	27645-27664	57
K9-1-7	TTTTAGAGCGAGCAGGACA	28214-28233	57
K9-1-8	GCAGCTTCCGAATCTCAGAT	28838-28857	57
K9-1-9	CCATGTGGCAAAAACAACGCA	29440-29459	57
K9-2-1	ACCGCCTCATCAGAACCAAA	23930-23911	57
K9-2-2	TGTCGTAGCTGCTTTAGTGC	23321-23302	57
K9-2-3	TTGTTGTCACCGGATACTCC	22708-22689	57
K9HE2a	GGTCATGGCAATGGTGCTAA	24360-24341	57
mwg1	TTTAGGCAAGGGGAATCGTC	10279-10260	57
mwg2	GGTGAACGAGTGGTGGATAT	10925-10906	57
mwg3	AACTTCCGTGTGAATCAGCC	11460-11441	57
mwg4	GCTCAGCGTATGGCTATAAG	11643-11662	57
mwg5	CGAAGGTAAAGCCCGAATTC	11772-11753	57
mwg6	AAACGCTTGACACCCGGAAT	12165-12184	57
mwg7	CGCAGCAACTGAACAAAGTC	12681-12700	57
mwg8	GAGTGATCGAGGGGTTTATT	13145-13164	57
mwg9	AAGATGCACCCTGCTTACTC	14010-13991	57
mwg10	AAAGTGGTTCACCTAAGGCC	14576-14557	57
mwg11	GGCGACTATTACCAATCAC	15131-15112	57
mwg12	AAGAAGCTTCTGCACATGGC	15625-15606	57
mwg13	CCAAGTGCAGGTGATACATTG	16152-16133	57
mwg14	ATGATGTCTGATGTCATCGC	16657-16638	55
mwg15	CGACAAAGCGGACAAACCTA	16751-16770	57
mwg16	CTGGCTGAAAAATACCTCGC	17267-17286	57
mwg17	GCGATCAACGAAGGCAAGAA	17750-17769	57
mwg18	AACGAACTGATGGCCGAAAG	18267-18286	57
mwg19	AAACCTACTGGATGTGGTCG	18793-18812	57
mwg20	AGAAAACATGACAGTGGGCG	19306-19325	57
mwg21	CGAATTCGTTGTGCTTGGCT	19778-19797	57
mwg22	TCCACCTTGTCTTCGTCTTG	20877-20858	57
mwg23	CCGATAAATCTGCGTTGCTG	21933-21914	57
mwg24	GCATTGCTGATCACCATCCT	22082-22101	57
mwg25	ACTGATGGTGAAAAGGCAGC	22240-22259	57
mwg26	AAGAAGAAGTGGTGGAGCTG	22759-22778	57
mwg27	CGTGACCGATGAAGCACTAA	23289-23308	57
mwg28	CACAAAGATGTTGGCATGAC	25437-25417	55

mwg29	GTGTGATGTGGCCTGTGTTT	25954-25935	57
mwg30	CGCATGAATGCAAACACACC	26527-26508	57
mwg31	CAATCGGCTGAGGCTTGAAT	27009-26990	57
mwg32	GTGTGCCCGTAGTTATCCAA	27555-27536	57
mwg33	CACGACTCGTTTGGTGTGAA	28086-28067	57
mwg34	AAACTAGCTCTGGCGCACTA	28628-28609	57
mwg35	TCGCTCTTTGTCTGTCCAAC	29184-29165	57
mwg36	TCCCCCACTTGGAAGTGA	29701-29682	57
mwg37	GCTCAGTGATTTAAGCGCGT	30176-30157	57
mwg38	GTTGCAGTGCCGTGTTTTCT	30761-30742	57
mwg39	AGCTGGCGGATAACAAAGTC	30836-30855	57
mwg40	CTAAACTTGAGCTGTTCCGGC	31427-31446	57
mwg41	CGACACCAGTTACTGATCGA	31990-32009	57
rep	GCAAACGGCAGCTCTTGATA	9537-9518	57
seq11-as	CGGCCACGTCTATTCATACT	1385-1366	57
V86-1	TGCATTGCGGGTGATCTTGA	4547-4566	57
V86-2	CGCTCACGTTAACGCTTTTG	5114-5133	57
V86-3	GCACATCATTGGAGGCGTTT	5717-5736	57
V86-4	ATTTCTAGAGCCCTGCTACG	6317-6336	57
V86-5	GCTGGTGCTGAGGTCTTTTT	7045-7064	57
V86-6	ATTGCCGCTGGCCATAAAGT	7606-7625	57
V86-7	CCACTTCTGCACCCAAACTT	8195-8214	57
V86-8	CTGGCATTGCTGATTTGGG	8813-8832	57
Für O395 rep-orf15:			
O395 orf16up	GGTACGCATCGAGATACAAC	3042-3023	57
Für E8498 rep-orf15:			
V205 mwg6	CTTGCAAACACGGCTATCAG	1149-1130	57
V209 rep-up	GCTAGGAGATTGAGAAGTGC	776-795	57
Für Ch457 orf35-36:			
V205 orf36in	GCTACAGGCAATACTGGAGT	1798-1817	57
Für pGEM-T Easy:			
M13 forward	GTTTTCCCAGTCACGAC	2956-2972	54
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	192-176	56
Für pACYC184:			
HEDKseq1	GAGAACGGGTGCGCATAGAAAT	1769-1748	60
HEDKseq2	ACAATGCGCTCATCGTCATCCT	1591-1612	60
HEDKseq2a	GAAGTCAGCCCCATACGATA	1466-1485	57

Tab. C.6: 5 IRD-800 (MWG) markierte Primer für die Sequenzierung mit dem LiCor Sequencer.

C.4.2. Unmarkierte Primer

Primer ohne Markierung wurden von den Firmen MWG, Sigma und Roth bezogen.

Primer mit Schnittstellen für Subklonierungen:

Name	Sequenz 5'→3'	Position	T _M (°C)
Primer zur Herstellung der Deletionsmutante:			
orf2 <i>Sma</i> I	TCCCCCGGGCCGCGAGTTTCTGAACCTAA	3013-2994	60
orf2 <i>Sal</i> I5'	ACGCGTCCGACCCCTTGTAGTGACTTCAATGC	2489-2508	58
orf2 <i>Sal</i> I3'	CGCGTCCGACAGCCGTGATTGGATTCTACT	1806-1786	60
orf2 <i>Ap</i> aI	GAGGGCCCATCTTTAAGGTTACGGACGG	1246-1267	58
Primer zur Subklonierung von K139 Genen:			
cI 3' <i>Sal</i> I	TTTTGTCTGACTCAATCTTTTCTTAGAGTCAC	2615-2635	56
cI 5' <i>Afl</i> III	GGGACATGTCAGACGACAAGATAATG	3262-3242	58
orf2 <i>Afl</i> III	GGACATGTCAGATAGAATTGTTGA	2589-2570	52
orf2 <i>Pst</i> I	TTTCTGCAGTCAGCCACCAATCAGAGCAA	1684-1703	60
orf8 3' <i>Sal</i> I	TTTTGTCTGACTCATGCGGCCTCCCTTTG	6830-6812	60

orf8 5' <i>Bsp</i> HI	AAAATCATGAGCTCAACCAACGGCG	6213-6231	60
orf11 3' <i>Sal</i> I	TTTTGTGCGACCTATGCGCTGCGGCTTT	10720-10736	54
orf11 5' <i>Nco</i> I	TTTCCATGGCAAAGACGATTACAG	11058-11040	58
orf12 3' <i>Sal</i> I	AATTGTCGACTCAACTGCTGCAAAATCTTG	11543-11522	56
orf12 5' <i>Afl</i> III	AATACATGCTCTGAATTAACACTTAGG	11296-11318	60
orf13 3' <i>Sal</i> I	AAAAGTTCGACTCACAACATAGAAAGCTGATG	11542-11562	58
orf13 5' <i>Bsp</i> HI	TTTTTCATGAGAGTGTCTGCCCT	11793-11776	54
Primer zur Subklonierung von K139 Promotorbereichen:			
PromR <i>Bam</i> HI	ATAAGGATCCGTGAGTGTTC AAGTGCTGA	3112-3132	60
PromL <i>Bgl</i> II	TTTTAGATCTTCTGCGATGTACTGGCGAAT	3513-3492	60
Prom11 <i>Bgl</i> II	CCCCAGATCTATATCCACCACTCGTTCACC	10904-10923	60
Prom12 <i>Bam</i> HI	GTGTGGATCCA ACTTCCGTGTGAATCAGCC	11458-11439	60
Prom13 <i>Bgl</i> II	GGGGAGATCTCTCAGCGTATGGCTATAAG	11641-11660	60
Prom13 <i>Bam</i> HI	GGGGGATCCCTTACTGAGCAGCGGTGGC	12018-11999	60
Prom17 <i>Bam</i> HI	TTTTGGATCCAGTAGCGCGCAGCTTCTTAA	14638-14658	60
Prom18 <i>Bgl</i> II	TTTTAGATCTGAGAAGAGCTTTTGACCGTC	15396-15376	60
Primer für die Konstruktion des Promotor-Test Vektors:			
pACYC177 <i>Bst</i> EII	TTTTTGGTTACCTTCTTCACGAGGCAGACCT	1619-1598	58
pACYC177- <i>Sca</i> I	GCCGCATACACTATTCTCAG	29-48	60

Tab. C.7: Primer für die Subklonierung von PCR-Fragmenten

Primer ohne Schnittstellen:

Name	Sequenz 5'→3'	Position	T _M (°C)
Für K139:			
orf39	TGCCGTGATCGCTTATGTCA	32372-32353	60
orf37 5'out	TCCCCACTTGGA ACTGATA	29699-29680	57
orf37 5'out2	GTGACTGATTCCACCGTGTT	29510-29491	60
orf37	AACACGGTGG AATCAGTCAC	29491-29510	60
orf36	ATTTTCTCGCGAGCGGCAAT	29397-29378	60
orf36 5'rev	TTAACGTATCTTCAAAGGCG	28967-28948	56
fiber3'	TCTGAGATTCGGAAGCTG	28854-28837	54
fiber5'	TCACACCAAACGAGTCTG	28066-28083	54
P209 orf35rev	AGCCACTGCTAACAACTTCGT	27945-27925	63
orf35 middle	GCGAATGGGAGTATCACAG	27840-27858	58
K139 6kbas	TATTTGGCTGGGTCTGCTTG	27604-27585	57
K139 6kb	CAAGCAGACCCAGCCAAATA	27585-27604	57
orf35	CAAATCAGTGTGCGCAAAGC	27099-27118	60
orf34	CAATCGGCTGAGGCTTGAAT	27007-26988	60
orf34 3'out	CTCTATCACGCCAAATCGGA	26950-26969	65
orf32	AAAGTAATCGACGGCGGCT	24897-24915	58
orf31 3'	CCTTGTGGCGTGATGTA AAC	24828-24809	60
orf31 3'out	GTTTACATCACGCCACAAGG	24809-24828	60
mwg27as	TTAGTGCTTCATCGGTCACG	23306-23287	57
orf31 5'	CCCTAGCAGGAATCACCAAT	23115-23134	60
orf30	TGAGGCTTCATACACTTTGC	22833-22814	58
orf26	CAACAAATGGCGCTGGCTAA	21098-21117	60
orf25	TAATGCGAACAAACAGCGGG	20991-20972	60
rev20as	CGCCCACTGTCATGTTTTCT	19323-19304	57
rev20	AGAAAACATGACAGTGGGCG	19304-19323	60
rev19	AAACCTACTGGATGTGGTCG	18791-18810	60
orf21	GCACTGAAAGCACACATCGA	18369-18388	60
orf20	TTTCGGCCAGCAGTTCGTTT	18283-18264	60
rev18	AACGAACTGATGGCCGAAAG	18265-18284	60
rev16	CTGGCTGAAAATAACCTCGC	17265-17284	60
rev15	CGACAAAGCGGACAAACCTA	16749-16768	60
rev13	CCAAC TCGGTGATACATTG	16150-16131	60
rev12	AAGAAGCTTCTGCACATGGC	15623-15604	60
rev11	GGCGACTATTACCCAATCAC	15129-15110	60
PromLate	TTCAGATTCAATTCGTCGGC	14832-14851	58

rev10	AAAGTGGTTCACCTAAGGCC	14574-14555	60
rev9	AAGATGCACCCCTGCTTACTC	14008-13989	60
rev8	GAGTGATCGAGGGGTTTCATT	13143-13162	60
orf15	GTATCACGGTTCCTGCTGA	12909-12890	61
rev7	CGCAGCAACTGAACAAAGTC	12679-12698	60
orf15 3'out	ATTCCGGTGTGCAAGCGTTT	12182-12163	60
rev6	AAACGCTTGACACCCGGAAT	12163-12182	60
PromB	GGCAGCGCTGTATAAGATTG	12077-12058	57
rev5	CGAAGGTAAAGCCCGAATTC	11770-11751	60
rev4	GCTCAGCGTATGGCTATAAG	11641-11660	60
rev3	AACTTCCGTGTGAATCAGCC	11458-11439	60
PromN15	AACCTGCTGCTGAGTTAAGC	10972-10991	60
rev2	GGTGAACGAGTGGTGGATAT	10923-10904	60
rev1	TTTAGGCAAGGGGAATCGTC	10277-10258	60
rep3'	GGTCTGGTTGTGAATGTTCT	10056-10037	58
rep3'out	AGAACATTCACAACCAGACC	10037-10056	58
repAS	TATCAAGAGCTGCCGTTTGC	9516-9535	65
rep5'out	CGGATGTAGCGTTCAGCAA	7765-7746	60
rep5'	TTTGCTGAACGCTACATCCG	7746-7765	60
orf9	GCGGCGTAGTGCATCTATTT	7458-7439	60
orf3	GCAAGTGCAGCGCAATAAAC	4309-4328	60
cII	GCCATGAAATCCGAACCCAT	4239-4220	60
cII 3'out	ATGGGTTCCGATTTTCATGGC	4220-4239	60
PromL	TCTGCGATGTACTGGCGAAT	3511-3492	57
PromR	GTGAGTGTTCAGAGTGCTGA	3113-3132	57
GSP3cI	CCACCAGATAAAGAGCCTCA	2803-2822	57
GSP1glo	GGAGACAGCATAGATTCAGC	1596-1615	57
Glo <i>NcoI</i>	AACATGCCATGGTGCATTACTACCTCTA	1684-1664	60
Glo <i>PstI</i>	AACTGCAGATCTTTAAGGTTACGGACGG	1248-1267	58
int3'in	ACGGCTTGAATCAGGTGATC	259-278	64
attASneu	GGGTTTGTGCGCATAAATG	149-167	55
attS	ACCGCCAAAATCAGCAA	148-132	50
attAS	GCTGCGGTGTGATGAATGT	110-128	57
Für O395 orf35-orf36:			
O395orf35	CGGCATCAATCGGAGCTAAA		60
O395orf35-2	AACCATCAGCGACAAGCCTA		60
O395orf35rev	TTTAGCTCCGATTGATGCCG		60
O395orf35rev2	TAGGCTTGTCGCTGATGGTT		60
Für Ch457 orf35-orf36:			
P205orf35	GGTTCTGCACAGGTTATCGT		60
P205orf35-2	GTCATTCAAACCATCAGCGC		60
P205orf35rev	ACGATAACCTGTGCAGAACC		60
P205orf35rev2	GCGCTGATGGTTTGAATGAC		60
Für <i>V. cholerae</i> Genom:			
flaA	GCTCAGACGTGGGTATGTAAT		58
flaC	GTCTCGGAAAACCAAGCAGTT		58
flaCrev-as	ATACGCGAAACCACACCGAA		57
flaCrevPCR	TTCGGTGTGGTTTCGCGTAT		60

Tab. C.8: Unmarkierte PCR-Primer ohne Schnittstellen. Diese wurden z.T. auch für die Sequenzierung mit dem ABI Genetic Analyzer verwendet.

C.4.3. Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pTrc99Akan	Expressionsvektor, <i>trc</i> -Promotor, Km ^r	(107)
pASK75	Expressionsvektor, <i>tet</i> Promotor/Operator, <i>tetR</i> , Ap ^r	(138)
pACYC177	Klonierungsvektor, Km ^r , Ap ^r	(124)
pACYC184	Klonierungsvektor, Cm ^r , Tc ^r	(125)
pKEK229	pCVD442-Derivat mit Polylinker aus pWSK30, <i>sacB</i> , <i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , Ap ^r	(31)

pGEM-T Easy	Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> , Ap ^r	Promega
pTAC3575	Promotor-Test Vektor, <i>lacZ</i> , <i>phoA</i> , Ap ^r	(5)
Rekombinante Plasmide:		
pK139-4, pK139-8, pK139-9, pK139-30	pACYC-Vektor mit <i>EcoRV</i> -verdauten K139 DNA Fragmenten, Cm ^r , Tc ^s	diese Arbeit
pASK75 <i>orf2</i>	<i>HindIII/SacI</i> -Fragment mit 5'- <i>glo</i> , <i>orf2</i> und 3'- <i>cl</i> aus pJB <i>cII-int</i>	diese Arbeit
pGEMO395 <i>rep-15</i>	pGEM-T Easy mit <i>rep-orf15</i> Region von O395	diese Arbeit
pGEMV205 <i>rep-15</i>	pGEM-T Easy mit <i>rep-orf15</i> Region von Ch457	diese Arbeit
pGEMV209 <i>rep-15</i>	pGEM-T Easy mit <i>rep-orf15</i> Region von E8498	diese Arbeit
pJB <i>cII-int</i>	pBR322' <i>cII cox cl orf2 glo int'</i> , Tc ^r , Ap ^s	(107)
pKEK229Δ <i>cl</i>	pKEK229 mit ligiertem 5'- und 3'-Bereich von <i>cl</i>	diese Arbeit
pKEK229Δ <i>orf2</i>	pKEK229 mit ligiertem 5'- und 3'-Bereich von <i>orf2</i>	diese Arbeit
pTrc99Akan <i>cl</i>	<i>cl</i> in <i>AflIII/SalI</i> -Schnittstelle der MCS	diese Arbeit
pTrc99Akan <i>orf2</i>	<i>orf2</i> in <i>NcoI/PstI</i> -Schnittstelle der MCS, 4. Base A→T	diese Arbeit
pTrc99Akan <i>orf8</i>	<i>orf8</i> in <i>NcoI/SalI</i> -Schnittstelle der MCS	diese Arbeit
pTrc99Akan <i>orf11</i>	<i>orf11</i> in <i>NcoI/SalI</i> -Schnittstelle der MCS	diese Arbeit
pTrc99Akan <i>orf12</i>	<i>orf12</i> in <i>AflIII/SalI</i> -Schnittstelle der MCS	diese Arbeit
pTrc99Akan <i>orf13</i>	<i>orf13</i> in <i>BspHI/SalI</i> -Schnittstelle der MCS	diese Arbeit
pLM	<i>BstEII/ScaI</i> -Fragment aus pTAC3575 (<i>phoA-bla</i>) mit <i>ori-bla</i> Region aus pACYC177	K. Hilpert
pLM-P _R /P _L	pLM mit P _R /P _L -Promotor-Region	K. Hilpert
pLM-P ₁₁ /P ₁₂	pLM mit P ₁₁ /P ₁₂ -Promotor-Region	K. Hilpert
pLM-P ₁₃	pLM mit P ₁₃ -Promotor-Region	K. Hilpert
pLM-P ₁₆ /P ₁₇	pLM mit P ₁₆ /P ₁₇ -Promotor-Region	K. Hilpert

Tab. C.9: Die in dieser Arbeit verwendeten oder hergestellten Plasmide.

C.5. Mikrobiologische und genetische Methoden

C.5.1. Arbeiten mit Bakterien

C.5.1.1. Herstellung kompetenter Zellen

CaCl₂-kompetente *E. coli*:

Eine *E. coli* Übernacht-Kultur (ÜNK) wurde 1:50 in LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bis 0.8 geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend in ein JA20-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Min. bei 4°C und 6500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 12 ml eiskalter, steriler 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C für 10 Min. bei 6500 rpm wurde das Pellet in 1 ml 0.1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und für mindestens 1 Std. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl 70% Glycerin wurden die kompetenten Zellen in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Schnellmethode für *V. cholerae* (K. Klose, persönliche Mitteilung):

Ein frischer Übernacht (ÜN)-Ausstrich von *V. cholerae* wurde morgens dicht auf eine Agarplatte ausgestrichen. Nach ca. 4-5 Std. Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien von

der Agarplatte abgekratzt und in 200 µl eiskaltes, steriles 2 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 4°C für 3 Min. und 7500 rpm wurde das Pellet in 60 µl 2 mM eiskaltem CaCl₂ gelöst und sofort für die Elektroporation eingesetzt.

C.5.1.2. Transformation

Elektroporation von *E. coli*:

Die Elektroporation wurde nach der Methode von Calvin und Hanawalt (22) durchgeführt.

Hitzeschock-Transformation von *E. coli*:

200 µl CaCl₂-kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit 50-100 ng Plasmid-DNA bzw. bis zu 10 µl Ligationsansatz versetzt. Nach Inkubation von 30-45 Min. auf Eis wurden die Zellen für 2 Min. in einem 42°C heißen Wasserbad erhitzt. Danach wurden die Zellen für 2 Min. auf Eis abgekühlt und nach Zupipettieren von 1 ml LB-Medium für 30-60 Min. bei 37°C geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden je 200 µl und 800 µl auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektroporation von *V. cholerae*:

60 µl kompetente Zellen nach der Schnellmethode (Kap. C.5.1.1.) wurden in eine Küvette (2mm, EQUIBIO) überführt, mit 2-6 µg Plasmid-DNA versetzt und nach kurzer Inkubation bei 1.8 kV transformiert. Die Zellen wurden mit 1 ml LB-Medium versetzt und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 30 Min. Inkubation bei 37°C im Schüttler wurden 200 µl und 800 µl des Ansatzes auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

C.5.1.3. Konjugation

Für die Herstellung der chromosomalen Deletionsmutante wurde das Suizidplasmid (siehe Kap. C.6.6.4.) zuerst in den *E. coli* Stamm Sm10λpir transformiert. Da das Plasmid einen defekten *ori* trägt, kann es nur in Gegenwart des *pir* Genes replizieren, das in Sm10λpir auf einem Lambda-Derivat kodiert vorliegt. Außerdem enthält dieses Plasmid die *mobRP4*-Region, was einen Transfer des Plasmides vom Donorstamm Sm10λpir in den *V. cholerae* Rezipienten-Stamm ermöglicht. Für die Konjugation wurden die Kolonien des Donor- und Rezipienten-Stammes von frischen ÜN-Ausstrichen gepickt und flächig auf LB-Agarplatten im rechten Winkel zueinander ausgestrichen. Nach Inkubation von 3-4 Std. bei 37°C wurden jeweils von acht verschiedenen Stellen Zellen gepickt und einfach auf LB-Agarplatten (100 µg/ml Strep, 50 µg/ml Amp) ausgestrichen. Diese Selektion sollte gezielt solche Zellen des

Streptomycin-resistenten Rezipienten-Stammes hochwachsen lassen, die das Plasmid in ihr Genom integrieren konnten. Nach Inkubation ÜN wurden die Kolonien noch einmal durch Dreifach-Ausstrich auf LB-Agarplatten (100 µg/ml Strep, 50 µg/ml Amp) aufgereinigt und konnten danach für die Herstellung von Deletionsmutanten weiter verwendet werden.

C.5.1.4. Konstruktion von Mutanten

Spontan Streptomycin-resistente *V. cholerae*:

Für den Konjugationsschritt bei der Herstellung von Deletionsmutanten wurden Streptomycin-resistente Mutanten des Stammes MAK757K139 benötigt. Dazu wurde 1 ml ÜNK dieses Stammes bei 6500 rpm abzentrifugiert, in 200 µl LB-Medium resuspendiert und der Ansatz dann auf eine LB-Agarplatte (100 µg/ml Strep) ausplattiert. Nach Inkubation ÜN bei 37°C wurde am nächsten Morgen eine Kolonie gepickt und zur Aufreinigung noch einmal auf LB (100 µg/ml Strep) dreifach ausgestrichen.

Deletionsmutanten nach Sonnenberg und Kaper (40):

Nach Konjugation und Integration des rekombinanten Suizidvektors in den lysogenen *V. cholerae* Stamm SMAK757K139 wurden die Kolonien in 2 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 1 µl entnommen und wiederum in 2 ml LB-Medium überimpft und für ca. 10 Std. bei 37°C geschüttelt. Dann wurden noch einmal 1 µl in 2 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend verdünnt (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) und auf Sucrose-Agarplatten (100 µg/ml Streptomycin) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für zwei Tage. Die Sucrose in den Agarplatten wird von den Zellen, die noch das Suizidplasmid enthalten und damit das *sacB* Gen besitzen, in Levan umgewandelt, das die Bakterien zum Absterben bringt. Somit erfolgt durch diese Methode eine positive Selektion auf solche Zellen, die das Suizidplasmid wieder aus ihrem Genom entfernt haben und damit kein *sacB* Gen mehr aufweisen. Dabei kann bei einem Teil der Zellen das über den Suizidvektor eingebrachte deletierte Gen im Genom verbleiben. Die Klone wurden anschließend über Aufkoch-PCR überprüft.

C.5.2. Arbeiten mit Bakteriophagen

C.5.2.1. Herstellung von Phagenlysaten

Spontanlysat:

Zur Herstellung eines Spontanlysates wurde ein K139-lysogener Stamm in LB-Medium (10 mM CaCl₂) angeimpft und bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die

Kultur für 10 Min. bei 6500 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit einem Rotband-Filter (0.25 µm Porengröße, Schleicher&Schuell, Dassel) sterilfiltriert. Das Lysat kann in einem Glasgefäß für mehrere Monate bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Der Phagentiter eines frisch angesetzten Spontanlysates beträgt ca. 10^5 - 10^6 pfu/ml.

Hochtitriges Phagenlysat:

LB-Medium wurde mit CaCl_2 Lösung versetzt (Endkonzentration 10 mM) und mit einer ÜNK MAK757 1:100 angeimpft. Die Kultur wurde nun für ca. 30 Min. bei 37°C im Schüttler vorinkubiert und anschließend Spontanlysat zugegeben (ca. 1:60 für K139, 1:10 000 für K139.cm9). Die Kultur wurde nun für ca. 5-6 Std. geschüttelt bis die Lyse gut sichtbar war. Dann wurde Chloroform im Verhältnis 1:150 zugegeben und für weitere 30 Min. im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in JA10-Zentrifugenbecher überführt und für 10 Min. bei RT mit 8000 rpm abzentrifugiert. Für eine längere Lagerung wurde das Lysat noch sterilfiltriert, für DNA-Präparation jedoch direkt verwendet. Der Phagentiter im Überstand beträgt bei einem hochtitrigen K139-Lysat ca. 10^7 pfu/ml.

C.5.2.2. Plaque-Assay

Um die Fähigkeit zur Plaque-Bildung zu ermitteln wurden Verdünnungsreihen vom jeweiligen Phagenlysat hergestellt. 100 µl der entsprechenden Verdünnung wurden zusammen mit 100 µl MAK757 ÜNK zu 8 ml auf 42°C vorgewärmten TB-Topagar (10 mM CaCl_2) pipettiert. Der Ansatz wurde kurz gevortext und dann schnell auf eine LB-Agarplatte aufgegossen. Nach Festwerden des Topagars wurden die Platten für 6 Std. bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der ausgezählten Plaques wurde mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert und auf 1 ml standardisiert.

C.5.2.3. Plaque-Inhibitions-Assay (modifiziert nach Guidolin und Manning (55))

Zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Phagenpartikel an LPS wurden Plaque-Inhibitions-Assays durchgeführt. Hierfür wurde ein Lysat des entsprechenden Phagen mit LB-Medium (10 mM CaCl_2) auf 10^4 pfu/ml eingestellt. Dann wurden verschiedene Mengen an reinem LPS (siehe Kap. C.7.2.2.) zugegeben. Die Mengen des präparierten LPS wurden durch Vergleich mit definiertem O1 Inaba LPS des *V. cholerae* Stammes 569B (Sigma) nach SDS-PAGE und Silberfärbung abgeschätzt. Nach Inkubation von 60 Min. bei 37°C im Brutschrank wurden 5 µl, 10 µl und 50 µl dieses Ansatzes zusammen mit 100 µl einer ÜNK MAK757 zu 8 ml 42°C warmem TB-Topagar (10 mM CaCl_2) gegeben, der Agar kurz gevortext und dann auf eine LB-Agarplatte gegossen. Nach Inkubation bei 37°C für ca. 6 Std. waren die Plaques sichtbar und konnten ausgezählt werden. Zur Berechnung der Inaktivierung wurde eine 100% Kontrolle benötigt. Hierfür wurde parallel das auf 10^4 pfu/ml verdünnte Phagenlysat ohne

LPS in LB-Medium (10 mM CaCl₂) inkubiert, dies ergab die Zahl der tatsächlich vorhandenen pfu/ml. Zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit des K139 Phagen wurde ein Ansatz mit 10 µg des definierten O1 Inaba LPS inkubiert, was zu einer Herabsetzung des Phagentiters durch Adsorption an das LPS führen musste. Um die Inaktivierung zu ermitteln, wurde die Zahl der Plaques auf 1 ml hochgerechnet und zum Titer des 100% Wertes in Bezug gesetzt.

C.6. Molekularbiologische Methoden

C.6.1. Präparation von Plasmid DNA

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (12). Zur Aufreinigung wurde entweder Phenol-Chloroform Extraktion (128) verwendet oder verschiedene Aufreinigungskits (Qiagen, Macherey-Nagel, BioRad).

C.6.2. Präparation chromosomaler DNA modifiziert nach Grimberg et al. (52)

Dazu wurden 4 ml einer ÜNK in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 5 Min. bei 6500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml TNE aufgenommen und noch einmal für 5 Min. bei 6500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in TNEX aufgenommen, gut resuspendiert und anschließend 60 µl frisch angesetztes Lysozym (5 mg/ml in H₂O) zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 20 Min. wurde 30 µl Proteinase K (20 mg/ml in H₂O) zugesetzt und bei 65°C für ca. 2 Std. oder bis zum Klarwerden des Ansatzes inkubiert. Zur Aufreinigung wurde die Lösung nun in ein "Phase Lock Gel Light"-Gefäß (Eppendorf) überführt, 1 Volumen Phenol (gesättigt mit TE, pH 8.0) zugegeben und invertiert. Dann wurde für 5 Min. bei 13000 rpm abzentrifugiert, die wässrige, obere Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die darin befindliche DNA gefällt. Dazu wurde 50 µl 5 M NaCl und 1.1 ml eiskaltes 100% Ethanol (EtOH) zugegeben, invertiert und bei Raumtemperatur (RT) für 5 Min. mit 13000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% eiskaltem EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen. Zur Resuspension muß die DNA noch eine Weile auf einem Schüttler verbleiben.

TNE: 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
10 mM NaCl
10 mM EDTA, pH 8.0
→ autoklavieren

TNEX: TNE
1% Triton X100
→ sterilfiltrieren

C.6.3. Präparation von Phagen DNA

Für die Isolierung von Phagen DNA wurden 600 ml hochtitriges Phagenlysat hergestellt. Dieses wurde in 2 l Glaskolben überführt und die DNA aus den Phagenpartikeln mit Hilfe des Qiagen Lambda Kits laut Anleitung isoliert.

C.6.4. PCR

Aufkoch-PCR:

Hierfür wurde die Kolonie eines ÜN-Ausstriches in 20 µl H₂O gelöst. Der Ansatz wurde für 10 Min. bei 100°C in einem Heizblock aufgekocht und anschließend für 10 Min. bei 13000 rpm abzentrifugiert, um eventuell störende Zelltrümmer zu beseitigen. Für den PCR-Ansatz wurden 5 µl vom Überstand entnommen.

Überprüfung der K139-verwandten Phagensequenzen mittels PCR:

Die in den Stämmen O395, Ch457 und E8498 durch Southern Blot identifizierten K139-verwandten Phagensequenzen wurden mittels PCR weiter analysiert. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Triple Master (Eppendorf) angesetzt, Pufferwahl und Hybridisierungstemperatur mußten für jedes Primerpaar und für die entsprechende Template-DNA optimiert werden. Um das Auftreten von unspezifischen Banden durch Bindung der Primer an die chromosomale DNA des Wirtes zu verhindern, wurden von sensiblen DNA-Bereichen die sogenannte "Nested-PCR" durchgeführt.

C.6.5. Enzymverdau, Reinigung von DNA-Fragmenten und Ligation

Restriktionsverdau und Ligation wurden nach den Standardmethoden durchgeführt (128). Die Ligation in den Vektor pGEM-T Easy erfolgte nach Anleitung des Herstellers (Promega). Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Kit und die Aufreinigung von PCR-Produkten oder Restriktionsansätzen mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach Anleitung durchgeführt.

C.6.6. Konstruktion rekombinanter Plasmide

C.6.6.1. Subklonierung von DNA-Fragmenten

Subklonierung von *EcoRV*-verdauter K139 DNA:

Um die Sequenzierung des K139 Genoms zu beschleunigen, wurde die isolierte Phagen DNA mit *EcoRV* verdaut, in die entsprechende Schnittstelle des *tet* Gens von pACYC184

ligiert und in den *E. coli* Stamm MC4100 transformiert. Die Klone wurden gepickt, die Plasmid DNA isoliert und im Restriktionsverdau die Klone mit verschiedenen großen Inserts für die Sequenzierung eingesetzt.

Subklonierung der *rep-orf15* Region der K139-verwandten Phagen:

Für die Sequenzierung der Phagensequenzen der *V. cholerae* Stämme O395, Ch457 und E8498 wurde der Genbereich zwischen *rep* und *orf15* über PCR amplifiziert, in den pGEM-T Easy Vektor ligiert und in DH5 α transformiert. Die Klone wurden über Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agarplatten (100 μ g/ml Amp, IPTG, X-Gal) identifiziert. Bei Klonen mit Insert kann das α -Peptid der β -Galaktosidase nicht exprimiert werden, die Kolonien sind also weiß während Klone ohne Insert blaue Kolonien bilden.

Subklonierung von K139 Promotor-Regionen:

Die putativen Promotor-Region $P_{R/L}$, $P_{11/12}$, P_{13} und $P_{16/17}$ wurden mit Primern amplifiziert, die die Schnittstellen *Bam*HI oder *Bgl*III tragen. Die PCR-Produkte konnten somit in die entsprechenden Schnittstellen der "Multiple Cloning Site" (MCS) des Promotor-Test Vektors pLM eingefügt werden. Dieser Vektor trägt die promotorlosen Gene *phoA* und *lacZ*, die nur bei Anwesenheit eines Promotors in der MCS exprimiert werden können. Die Orientierung der Promotoren in der MCS der Promotor-Test Vektoren ist in Abb. C.1 dargestellt.

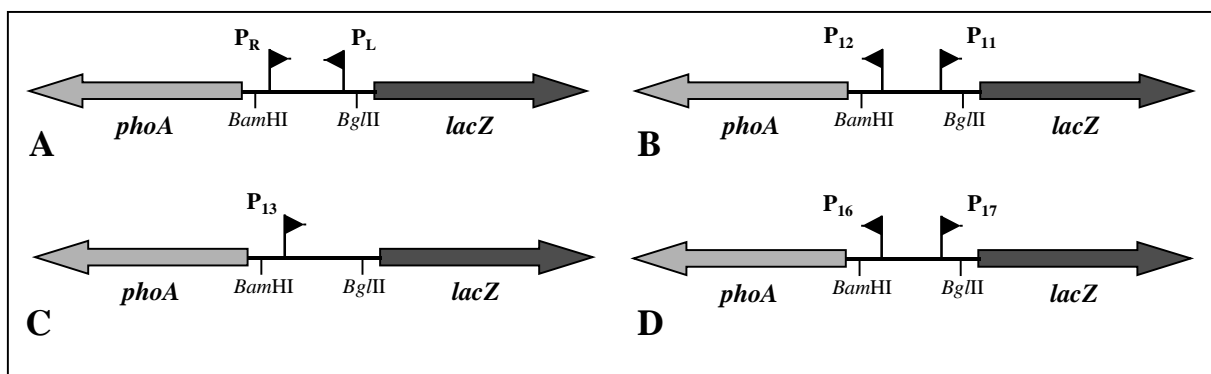


Abb. C.1: Orientierung der Promotoren in den Promotor-Test Konstrukten (A) pLM- $P_{R/L}$, (B) pLM- $P_{11/12}$, (C) pLM- P_{13} und (D) pLM- $P_{16/17}$. Die Regionen wurden mit Primern amplifiziert, die von *Bam*HI- oder *Bgl*III-Schnittstellen flankiert waren. Dies ermöglichte die Ligation in die entsprechenden Schnittstellen der MCS des pLM-Vektors.

C.6.6.2. Konstruktion des Promotor-Test Vektors pLM

Da der Einfluß verschiedener putativer Regulationsproteine von K139 auf die Aktivität möglicher Promotoren des Phagen untersucht werden sollte, mußte ein Promotor-Test Vektor konstruiert werden, dessen *ori* mit dem pTrc99Akan-Überexpressionsplasmid (ColE1-

Kompatibilitätsgruppe) verträglich ist. Hierfür wurde die *ori*-Region von pACYC177 (p15A-Kompatibilitätsgruppe) amplifiziert und in das *BstEII/ScaI*-Fragment (*phoA-lacZ*) von pTAC3575 eingesetzt (Abb. C.2).

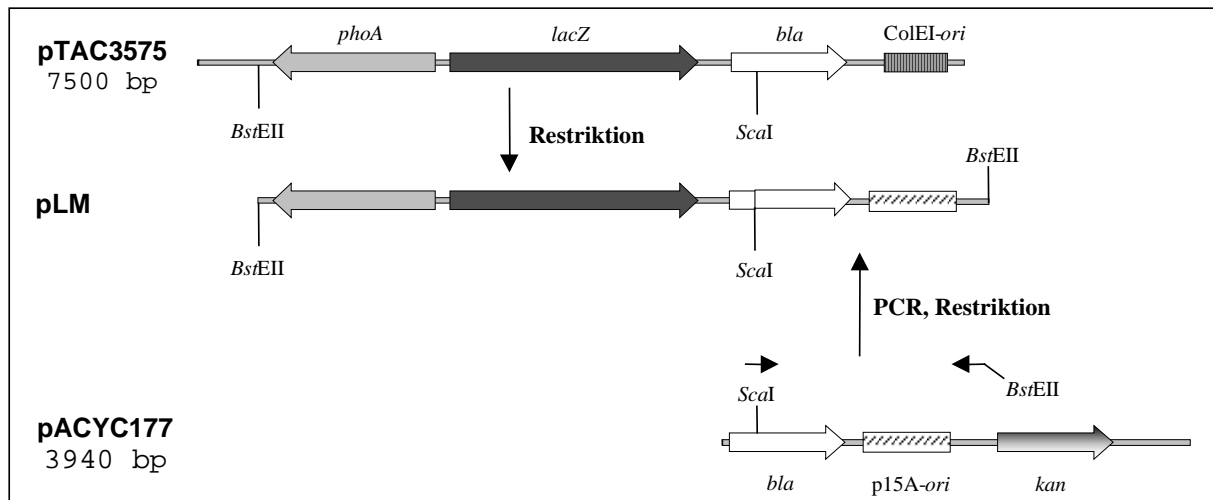


Abb. C.2: Konstruktion des Promotor-Test Vektors pLM. Aus dem pTAC3575 Vektor wurde die *phoA-lacZ*-Region mit den Enzymen *BstEII* und *ScaI* ausgeschnitten. Die *ori*-Region des Vektors pACYC177 wurde über PCR amplifiziert, wobei eine *BstEII*-Schnittstelle eingebracht wurde. Nach Restriktion und Aufreinigung dieses PCR-Fragmentes wurde es mit dem *BstEII/ScaI*-Fragment von pTAC3575 ligiert.

In die MCS dieses Plasmides wurden anschließend die Promotor-Regionen über *BamHI/BglIII* eingesetzt. Die fertigen Konstrukte wurden für die Bestimmung der Promotor-Aktivität in den *phoA/lacZ*-negativen Stamm CC118 transformiert.

C.6.6.3. Expressionsplasmide

orf2-Expression:

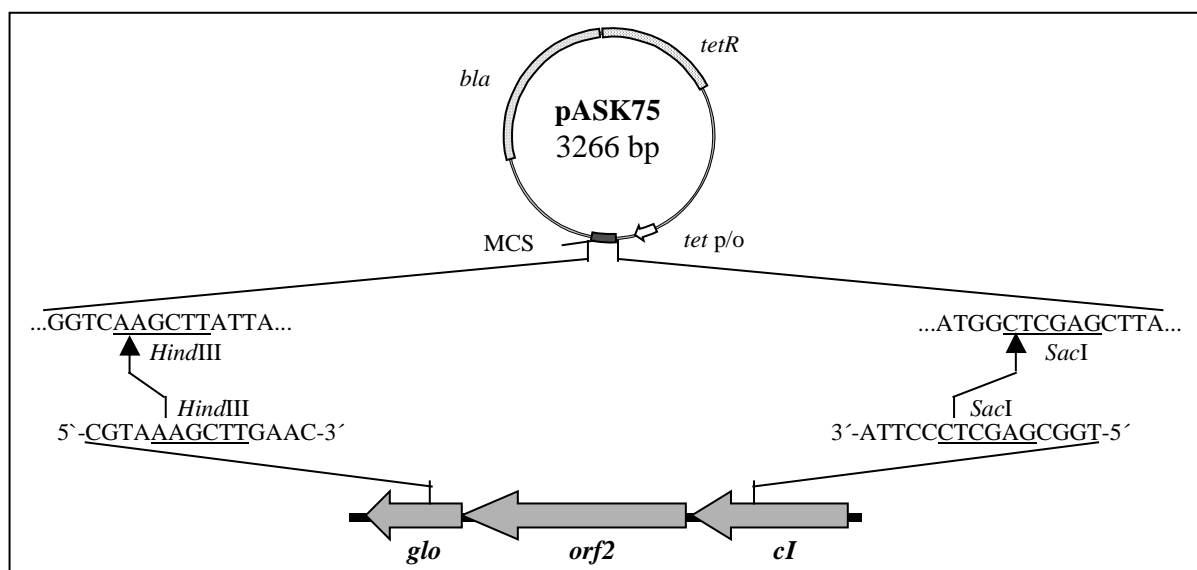


Abb. C.3: Konstruktion des Expressionsplasmids pASKorf2. Ein *HindIII/SacI*-Fragment aus der K139 *glo-cl* Region wurde hinter die *tetA*-Promotor/Operator-Region (*tet p/o*) in die *HindIII/SacI*-Schnittstellen der MCS kloniert. In Anwesenheit des Induktors Anhydrotetrazyklin wird die Synthese des *tet*-Repressors unterbunden, der normalerweise die Expression vom *tet*-Promotor reprimiert.

Für die Überexpression von Orf2 im *E. coli* Stamm LE392 wurde ein *HindIII/SacI*-Fragment aus der Region zwischen dem *glo* Gen und dem *cl* Gen in die entsprechenden Schnittstellen des pASK75 Vektors eingesetzt (Abb. C.3). Da das eben beschriebene rekombinante Expressionsplasmid pASKorf2 in *V. cholerae* Zellen aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber dem Induktor Anhydrotetrazyklin nicht verwendet werden konnte, mußte *orf2* zusätzlich in das Expressionsplasmid pTrc99Akan kloniert werden. Das Gen wurde hierfür über PCR amplifiziert, so daß es in die *NcoI/PstI*-Schnittstellen der MCS des Vektors ligiert werden konnte (Abb. C.4). Auf diese Weise liegt das Startcodon in günstiger Entfernung zur RBS des Vektors, was eine optimale Expression des eingebrachten *orf2* Gens ermöglicht. Leider war es für die Ligation in die *NcoI*-Schnittstelle nötig, eine kompatible *AflIII*-Schnittstelle am Beginn des *orf2* Gens über PCR einzuführen. Dadurch erfolgte ein Basenaustausch (A→T), der einen Aminosäure-Austausch von Threonin zu Serin bewirkt. Da beide Aminosäuren vergleichbare Eigenschaften aufweisen (klein, polar), dürfte dieser Austausch keinen großen Effekt auf die Funktionalität des Proteins haben.

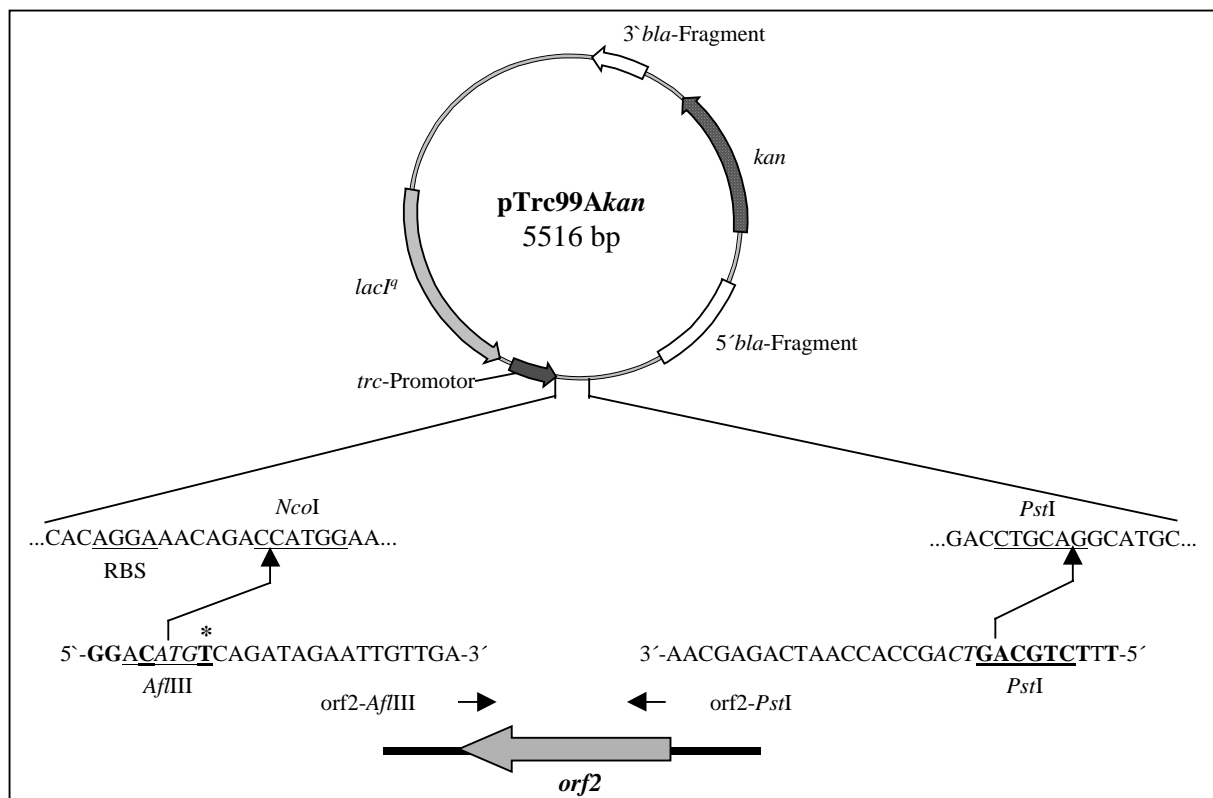


Abb. C.4: Konstruktion des Expressionsplasmides pTrc99Akanorf2. Das Gen wurde mit den Primern orf2-AflIII und orf2-PstI amplifiziert und in die *NcoI/PstI*-Schnittstellen der MCS von pTrc99Akan inseriert. *NcoI* und *AflIII* sind kompatible Schnittstellen. Das zweite Codon von *orf2* mußte allerdings verändert werden (Basenpaaraustausch A→T, markiert durch einen Stern), so daß nun ein Serin statt eines Threonins kodiert wird. Die Insertion in die *NcoI*-Schnittstelle ermöglicht eine optimale Expression aufgrund des Abstandes zur RBS des Vektors. Start- und Stopcodon sind in den Primersequenzen kursiv geschrieben, nichtbindende Basen sind fettgedruckt.

orf8, cI, orf11, orf12 und orf13-Konstrukte:

Als Expressionsvektor für die Gene *orf8*, *cI*, *orf11*, *orf12* und *orf13* wurde ebenfalls der pTrc99Akan-Vektor gewählt. Die Konstruktion erfolgte nach dem gleichen Schema wie die von pTrc99Akanorf2. Ein Basenaustausch war bei diesen Genen jedoch nicht nötig, da die zu *NcoI*-kompatiblen Schnittstellen, die an das 5'-Ende der Gene angehängt wurden (*AflIII-cI*, *NcoI-orf11*, *AflIII-orf12*, *BspHI-orf13*) gut zur Sequenz der Gene paßten. Die Konstruktion der Stämme erfolgte im *E. coli* Stamm LE392, nur das *orf8*-Konstrukt wurde im Stamm GM2163 hergestellt.

C.6.6.4. Plasmide zur Konstruktion von chromosomalen Deletionsmutanten

Für die Konstruktion von Deletionsmutanten in K139 Genen wurden im 5'- und im 3'-Bereich des Gens PCR-Produkte hergestellt, die sowohl einen kleinen Bereich des zu deletierenden Gens als auch einen kleinen Bereich des benachbarten Gens amplifizierten (siehe Abb. C.5, dargestellt für *orf2*-Deletionskonstrukt). An die im zu deletierenden Gen bindenden Primer wurde die Schnittstelle *SalI* angehängt, so daß nach Ligation der PCR-Produkte der größte Teil des Gens im Ligationsprodukt fehlte. Um polare Effekte auf die stromabwärts liegenden Gene zu vermeiden, wurden die Primer so gewählt, daß es zu keiner Leseraster-Verschiebung im deletierten Gen kam. Über die beiden außenstehenden Schnittstellen *ApaI* und *SmaI* wurden die PCR-Produkte in die MCS des Suizidvektors pKEK229 eingeführt.

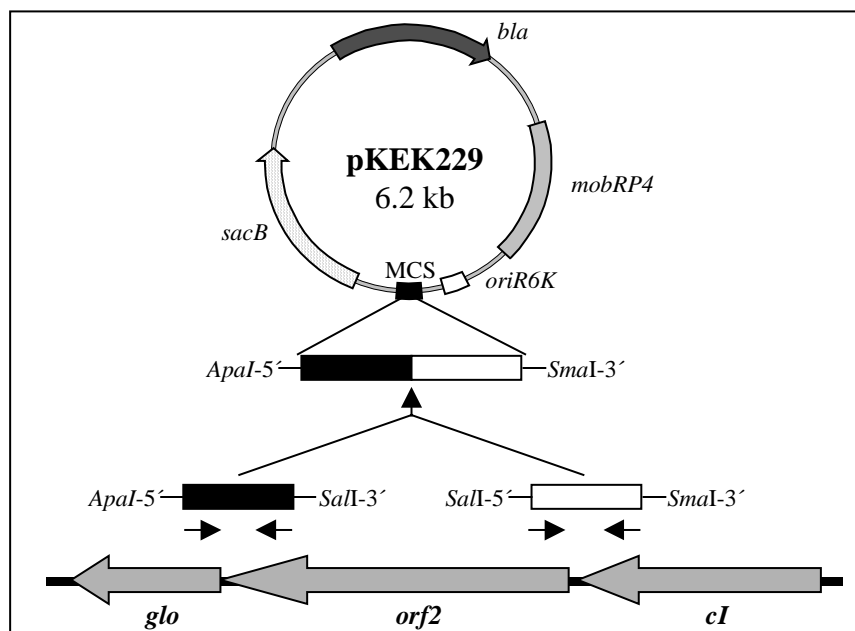


Abb. C.5: Konstruktionsschema zur Herstellung der Deletionsmutante K139 Δ *orf2*. Es wurden zwei PCR-Produkte hergestellt, das erste von *glo*-5' bis *orf2*-3' und das zweite von *orf2*-5' bis *cI*-3'. Die beiden PCR-Produkte wurden anschließend über die *SalI*-Schnittstellen ligiert, so daß ein Produkt entstand, in dem der größte Teil des *orf2* Gens fehlte. Über die außen liegenden Primer wurden die Schnittstellen *ApaI* und *SmaI* eingeführt, um das Ligationsprodukt in die MCS des Suizidvektors pKEK229 einführen zu können.

Der Ligationsansatz wurde anschließend in den *E. coli* Stamm SM10 λ pir (100) transformiert. Nur in diesem Stamm kann der Suizidvektor replizieren, da er einen defekten *oriR6K* aufweist und für seine Replikation das auf einem Lambda-Derivat kodierte *pir* Gen benötigt. Da das Suizidplasmid außerdem für die *mob* Gene kodiert, kann es durch Konjugation in einen *V. cholerae* Stamm eingeführt werden.

Die Deletion von *cI* erfolgte nach dem gleichen Schema. Allerdings mußte für die Deletion das *cI* Gen auf dem Expressionsplasmid pTrc99A*kancl* in den Stamm transformiert werden, da beobachtet wurde, daß der Phage ohne funktionsfähiges *cI* sofort in Lyse geht, die Klone mit deletiertem *cI* also absterben.

C.6.7. Southern Blot

Ca. 15 μ g chromosomale DNA wurde mit einem Restriktionsenzym über Nacht verdaut und auf ein 0.7% Agarosegel aufgetragen. Nach der Färbung im Ethidiumbromid-Bad wurde das Gel mit an den Taschen als Nullpunkt angelegtem Lineal fotografiert, um später Rückschlüsse über die Laufhöhe eines positiven Signals erhalten zu können. Die Übertragung der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham) erfolgte in einer Vakuumblot-Apparatur (Pharmacia). Die Nylonmembran wurde vorher 1-2 Min. in dest. H₂O und anschließend 5 Min. in 10 x SSC geschwenkt. Nach Aufbau der Apparatur wurde die DNA durch Überschichtung des Gels mit Puffer A für 15 Min. depuriniert. Die restliche Lösung wurde mit einer Pipette abgesaugt und das Gel nun zur Denaturierung für 15 Min. mit Puffer B überschichtet. Nach Absaugen der übrigen Lösung B erfolgte eine Überschichtung mit Puffer C zur Neutralisierung der DNA für 15 Min. Danach wurde die restliche Lösung C abgenommen und die DNA durch Überschichten des Gels für 60-90 Min. mit 20 x SSC auf die Membran geblottet. Vor Abbau der Apparatur wurden die Geltaschen mit Bleistift auf der Membran markiert, um die Lage der Spuren ermitteln zu können. Die Membran wurde anschließend kurz in 2 x SSC geschwenkt und nach kurzem Antrocknen auf Whatman-Papier die DNA auf der Membran in einem UV-Crosslinker fixiert. Anschließend wurde die Membran nochmals kurz in 2 x SSC geschwenkt und dann mit Hybridisierungslösung (ECL-Kit) in ein Röhrchen gegeben und bei 42°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Die weitere Inkubation, die Markierung der Sonde und die Detektion des Signals erfolgte mit dem ECL-Kit nach Anleitung. Die Waschschrte wurden mit Harnstoff-Puffer (einmal 20 Min., zweimal 10 Min. bei 42°C im Hybridisierungsofen) und 2 x SSC (zweimal 5 Min. bei RT auf dem Schüttler) durchgeführt.

Um die Sonde für eine erneute Hybridisierung von der Membran zu waschen wurde 0.5% SDS aufgekocht, in einer Schale über die Membran gekippt und bis zur Abkühlung auf

RT geschüttelt. Anschließend wurde die Membran für zweimal 5 Min. mit 2 x SSC gewaschen.

20 x SSC: 3 M NaCl
0.3 M Na-Citrat
Puffer A: 0.25 M HCl
Puffer B: 1.5 M NaCl
0.5 M NaOH
Puffer C: 1.5 M NaCl
0.5 M Tris-Cl, pH 5.1
Harnstoff-Puffer: 0.5 x SSC
0.4% SDS
6 M Harnstoff

C.6.8. DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Methode von Sanger et al. (130). Die DNA für die Sequenzierung wurde über Aufreinigungskits präpariert, PCR-Produkte wurden mit QIAquick aufgereinigt.

C.6.8.1. Sequenzierung mit dem LiCor System

Für die Sequenzier-Reaktion wurden 200 ng DNA pro kb Template und 1 pmol IRD-800 markierter Primer zusammenpipettiert und auf ein Endvolumen von 13 µl mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. 3 µl dieses Prämix wurden zu je 1 µl Terminations-Mix (Thermo Sequenase Sequencing Kit) in ein Sequenziergefäß pipettiert und die Reaktion nach folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 Zyklus:	Denaturierung	95°C	2 Min.
30 Zyklen:	Denaturierung	95°C	45 Sek.
	Hybridisierung	T_m des Primers + 3°C	45 Sek.
	Elongation	70°C	45 Sek.

Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl Stop-Puffer gestoppt und 1.5 µl dieses Ansatzes auf das Sequenziergel aufgetragen.

Für die Auftrennung der DNA wurde ein denaturierendes PAA-Gel hergestellt. Hierfür wurden 28 ml SequaGel XR und 7 ml SequaGel Complete (National Diagnostics, Atlanta, USA) gemischt und nach Zugabe von 300 µl 10% APS zwischen zwei Glasplatten (41 cm x 25 cm x 0.25 cm) gegossen. Die Elektrophorese wurde in 1 x TAE-Laufpuffer (BioRad) durchgeführt. Die Datensammlung erfolgte durch das automatische Sequenziergerät LiCor 4000 (MWG Biotech).

C.6.8.2. Sequenzierung mit dem ABI Sequenzer

Für den Reaktionsansatz wurde ca. 300 ng PCR-Produkt mit 15-20 pmol Primer und 4 µl BigDye-Prämix gemischt und mit bidestilliertem Wasser auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1 Zyklus:	Denaturierung	96°C	2 Min.
25 Zyklen:	Denaturierung	96°C	30 Sek.
	Hybridisierung	T _m des Primers	15 Sek.
	Elongation	60°C	4 Min.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die DNA durch Zugabe von 80 µl H₂O, 10 µl 3M Na-Acetat (pH 4.6) und 250 µl 100% EtOH (RT!) gefällt. Anschließend wurde der Ansatz für 15 Min. bei 15000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 250 µl 70% EtOH (RT!) gewaschen. Nun wurde noch einmal für 5 Min. bei 15000 rpm abzentrifugiert, das Ethanol entfernt und das Pellet in einer Speed-Vac Zentrifuge (SL110, Savant, Holbrook, USA) für 5 Min. getrocknet. Das Pellet wurde in 25 µl TSR aufgenommen und für 2 Min. bei 90°C im Heizblock denaturiert.

C.6.9. Aufreinigung von Phagenpartikeln

Für die Aufreinigung der Phagenpartikel wurden 2 x 600 ml hochtitriges K139-Lysat mit DNaseI und RNaseA (je 1 µg/ml Endkonzentration) versetzt und für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die durch die lysierten Zellen freigesetzten Nukleinsäuren abzdauen. Danach wurde festes NaCl bis zur Endkonzentration von 1 M und PEG6000 bis zur Endkonzentration von 10% darin gelöst. Der Ansatz wurde in JA14-Zentrifugenbecher überführt und über Nacht auf Eis inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Phagenpartikel durch Zentrifugation bei 4°C für 10 Min. mit 11000 rpm gefällt. Das Pellet wurde nun in Phagenpuffer resuspendiert. Anschließend wurde ein Cäsiumchlorid-Gradient (CsCl) (1.4 g/ml, 1.2 g/ml) vorsichtig mit der Phagen-Suspension überschichtet. Nach Zentrifugation bei 4°C für 3 Std. bei 25000 rpm in einem Beckman SW28-Rotor wurden zwei Banden isoliert. Hierzu wurden die Zentrifugenröhrchen kurz unterhalb der zu isolierenden Banden mit einer Spritze durchstoßen, die Nadel unmittelbar unter der Bande angesetzt und diese dann vorsichtig abgezogen. Die beiden Proben wurden getrennt voneinander einer zweiten Zentrifugation unterzogen, diesmal in einem kontinuierlichen CsCl-Gradienten bei 4°C für 18 Std. bei 55000 rpm in einem Beckman SW60-Rotor. Die erneut isolierten Banden wurden anschließend für 48 Std. gegen 5 l Phagenpuffer bei 4°C dialysiert.

Phagenpuffer: 20 mM NaCl
10 mM MgCl₂
20 mM Tris-HCl, pH 8.0

C.6.10. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Ein Tropfen der aufgereinigten Phagenpartikel-Suspension wurde auf ein Kupfernetz gegeben und für ca. 30 Sek. inkubiert. Anschließend wurde mit einigen Tropfen 0.5% Uranylacetat abgespült, schließlich mit einem Tropfen Uranylacetat für weitere 30 Sek. bis 1 Minute inkubiert. Die Flüssigkeit wurde zuletzt vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss 900 Elektronenmikroskop bei einer Elektronenbeschleunigung von 50 kV. Die Phagenpartikel wurden bei einer Vergrößerung von 80 bis 100000fach fotografiert.

C.7. Biochemische Methoden

C.7.1. Identifizierung von Proteinen des K139 Phagenpartikels

2D SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Zwei Hauptfraktionen aus der CsCl-Aufreinigung der Phagenpartikel wurden ankonzentriert und der Phagenpuffer durch Diafiltration (Millipore, Bedford, USA) gegen IEF-Puffer ausgetauscht. Danach wurde eine 2D SDS-PAGE nach Bjellqvist (13) durchgeführt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit IPG-Streifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3-10) (ReadyStrips, BioRad) in einer Multiphor Elektrophorese Apparatur (Amersham Pharmacia). Die anschließende SDS-PAGE wurde mit 8 cm x 13.5 cm x 1 mm Gradienten-Gelen (8-16%) (Criterion, BioRad) durchgeführt.

IEF-Puffer: 7 M Harnstoff
 2 M Thioharnstoff
 50 mM Tris, pH 7.5
 2% CHAPS
 0.4% Dithioerythritol

MALDI-TOF Massenspektroskopie:

Die Identifizierung der Proteine der Phagenpartikel erfolgte durch Peptidmassen-Analyse von Trypsin-verdauten Proben mit Matrix-unterstützter Laser-Ionisations Massenspektrometrie (Bruker Daltonics, Bremen) wie von Grünenfelder (54) beschrieben. Die gefundenen Peptide wurden sowohl mit der Swissprot-Datenbank als auch mit allen Leserastern des K139 Genoms verglichen. Kriterium für die Identifikation eines Proteins war die Übereinstimmung der Molekulargewichte (MW) aus vier bis fünf verschiedenen Peptiden mit den aus den Datenbanken ermittelten MW.

C.7.2. Präparation von LPS

C.7.2.1. Modifizierte Methode nach Grimberg et al. (52)

Für die Isolierung von LPS nach der modifizierten Methode von Grimberg et al. (siehe Kap. C.6.2) wurde nach der Phenol-Extraktion ein entsprechendes Aliquot der Lösung abgenommen. Die Qualität des nach dieser Methode gewonnenen LPS ist für die Analyse in PAA-Gelen ausreichend.

C.7.2.2. Heiße Phenol/Wasser Methode nach Slauch et al. (141)

Zur Isolierung von reinem LPS hoher Qualität für Plaque-Inhibitionsstudien wurde diese Methode benutzt. Hierfür wurde eine 100 ml LB ÜNK abzentrifugiert und das Pellet einmal in 30 ml H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 15 ml Puffer A resuspendiert und der Ansatz in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml; Nalgene, Rochester, USA) überführt. Nach Zugabe von 15 ml Phenol wurde vorsichtig invertiert und danach für 30 Min. bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde für 20 Min. bei 10000 rpm (RT) abzentrifugiert, die obere wässrige Phase in einen Zentrifugenbecher (250 ml) überführt und das vierfache Volumen 100% eiskaltes EtOH zugegeben. Die Fällung des LPS erfolgte bei -20°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde für 30 Min. bei 11000 rpm (4°C) abzentrifugiert und das Pellet mit 25 ml 95% eiskaltem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde in 5 ml Puffer A aufgenommen, die noch vorhandene DNA und RNA durch Zugabe von 2.5 µg DNaseI und 2.5 µg RNaseA für 30 Min. bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die Lösung in ein 11.5 ml Ultrazentrifugen-Röhrchen (Sorvall Ultracrimp11) überführt, bis zum Überlaufen mit Puffer A aufgefüllt, das Röhrchen verschlossen und bei 39000 rpm für 3 Std. (4° C) abzentrifugiert (Festwinkel-Rotor TFT 65.13, Sorvall). Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 200 µl PBS auf einem Schüttler resuspendiert.

MOPS gesättigtes Phenol:

Festes Phenol (Applichem) wird bei 65°C im Wasserbad geschmolzen (Abzug!). Zum flüssigen Phenol wird 20 mM MOPS, pH 6.9 zugegeben und gut gemischt. Zur Phasentrennung wird das Phenol für einen Tag bei 4°C gelagert, dann die obere, wässrige Phase verworfen und erneut MOPS zugegeben. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, bis das Phenol benutzt werden konnte.

Puffer A 150 mM NaCl
20 mM MOPS, pH 6.9

PBS: 0.8% NaCl
0.02% KCl
0.18% Na₂HPO₄ x 2 H₂O
0.024% KH₂PO₄
auf pH 7.4 mit HCl einstellen

C.7.3. Herstellung von Periplasma-Extrakten nach Hovde et al. (65)

1 ml ÜNK wurde bei 6000 rpm für 5 Min. abzentrifugiert und einmal in kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 60 µl kaltem PBS mit 2 mg/ml Polymyxin B resuspendiert und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation von 5-10 Min. bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proben können bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

PBS: Siehe Kap. C.7.2.2.

C.7.4. Aufreinigung des Orf2 Proteins

C.7.4.1. Überexpression des Proteins

Eine ÜNK LE392pASKorf2 wurde 1:50 in 1 l LB (50 µg/ml Kanamycin) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nun wurde die Expression durch Zugabe von 200 ng/ml Anhydrotetracyclin induziert und für weitere 3-4 Std. bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend in JA10-Zentrifugenbecher überführt und für 10 Min. bei 7000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 30 ml Tris-Puffer gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Probe bei -80°C gelagert.

Tris-Puffer: 10 mM Tris, pH 7.5
2 mM EDTA
1 mM DTT

C.7.4.2. Aufschließen der Zellen mittels "French-Press"

Die Zellen wurden in der "French-Press" aufgeschlossen. Nach mehrmaliger Wiederholung wurden die noch intakten Zellen bei 6000 rpm und 4°C für 10 Min. abzentrifugiert, das Pellet erneut in 7.5 ml Tris-Puffer gelöst und erneut in der "French-Press" aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden am Ende durch Zentrifugation für 10 Min. bei 6000 rpm und 4°C beseitigt und der Überstand für die Ammoniumsulfat-Fällung sofort weiterverwendet.

C.7.4.3. Ammoniumsulfat-Fällung

Zu 40 ml Überstand aus der "French-Press" wurden langsam 30.68 g Ammoniumsulfat zugegeben und der Ansatz auf Eis bis zum Lösen des Salzes gerührt. Die ausgefällten Proteine wurden anschließend durch Zentrifugation in JA20-Röhrchen bei 16000 rpm und 4°C für 15 Min. pelletiert und das Pellet in 2 ml 20 mM Tris (pH 7.5) aufgenommen.

C.7.4.4. Dialyse

Zur Vorbereitung der Dialyse wurden Dialyse-Schläuche ("Visking", Typ 36/32, 10-20 kDa Ausschlußgrenze, Roth) dreimal in PBS autoklaviert. Vor Einfüllen der Probe wurde der Schlauch innen und außen gut mit destilliertem Wasser abgewaschen. Die Probe wurde dann über Nacht bei 4°C gegen 5 l 20 mM Tris (pH 7.5) unter Rühren dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend durch einen Rotbandfilter (0.45 µm Porengröße, Schleicher & Schuell) sterilfiltriert.

PBS: siehe Kap. C.7.2.2.

C.7.4.5. Aufreinigung des Proteins mittels Chromatographie

Anionenaustauscher-Chromatographie:

Das Zell-Lysat wurde nach der Dialyse über eine 30Q HiPrep 16 Anionenaustauscher-Säule (Pharmacia) aufgereinigt. Hierfür wurde das Gradi-Frac System (Pharmacia) benutzt, daß eine automatische Probensammlung der fraktionierten Eluate ermöglicht. Nach dem Anschließen der Säule wurde das Gerät zuerst mit Hochsalz-Puffer auf den 100% Leitfähigkeitswert und dann mit Niedrigsalz-Puffer auf den 0% Leitfähigkeitswert geeicht. Danach wurde die Probe in die Säule eingespritzt, wobei die Proteine an die Matrix der Säule binden. Durch Anlegen eines Salzgradienten (1. Gradient: 20 mM Tris, pH 7.5 mit 0-0.5 M NaCl bei 0.5 ml/Min. bis 20 ml Elutionsvolumen; 2. Gradient: 20 mM Tris, pH 7.5 mit 0.5-1 M NaCl bei 0.5 ml/Min. bis 10 ml Elutionsvolumen) wurden die Proteine von der Säule gewaschen und in verschiedenen Fraktionen gesammelt. Durch eine UV-Meßeinheit konnte die Elution der Proteine detektiert werden. Zum Schluß wurde die Säule noch einmal mit Hochsalz-Puffer gewaschen, um die Proteine vollständig aus der Säule zu entfernen. Die Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE auf die Anwesenheit des Orf2 Proteins überprüft und die entsprechenden Fraktionen für die weitere Aufreinigung verwendet.

Hochsalz-Puffer: 20 mM Tris, pH 7.5
1 M NaCl

Niedrigsalz-Puffer: 20 mM Tris, pH 7.5

Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule:

Die Hauptfraktion aus dem Anionenaustauscher wurde nochmals mit 100% Ammoniumsulfat gefällt und für 2 Tage gegen 4 l Phosphat-Puffer bei 4°C dialysiert. Nach dem Eichen des Gerätes mit Hochsalz- und Niedrigsalz-Puffer wurde die Probe auf die Heparinsäule geladen und die Proteine mit einem Gradienten von 0-1 M NaCl (0.5 ml/Min. bis 20 ml Elutionsvolumen) von der Säule gewaschen und in Fraktionen gesammelt. Nun wurden wiederum mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung die Fraktionen bestimmt, die das

Orf2 Protein enthielten. Der Aufreinigungsgrad nach der Affinitätschromatographie stellte sich dabei als ausreichend für die weiteren Analysen des Orf2 Proteins heraus.

Phosphat-Puffer: 0.01 M Na-Phosphat, pH 7
2 mM EDTA
Niedrigsalz-Puffer: 0.01 M Na-Phosphat, pH 7
Hochsalz-Puffer: 0.01 M Na-Phosphat, pH 7
1 M NaCl

C.7.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von LPS und Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (80) angewandt. Der SDS-Laufpuffer und die Lösungen zum Gießen der Gele wurden nach Anleitung (128) hergestellt. Als Acrylamid-Stammlösung wurde eine fertige Mischung aus 30% Acrylamid und 0.8% Bisacrylamid (Gel 30, Roth) verwendet. Je nach Größe des nachzuweisenden Proteins wurden Gele zwischen 10% und 15% Polyacrylamid (PAA)-Konzentration gegossen. Vor dem Auftragen wurde zu den Proteinproben SDS-Probenpuffer bis zur Endkonzentration von 1 x zugegeben und für 10 Min. bei 96°C im Heizblock erhitzt. Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in der Mini Protean 3 Cell (BioRad), die Auftrennung von LPS dagegen in der Protean II Xi Cell (BioRad).

5 x SDS-Probenpuffer: 1.1 g SDS
0.41 g EDTA
0.17 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O
1.1 ml β-Mercaptoethanol
auf 10 ml mit H₂O auffüllen, pH 7.2 einstellen
10 ml 50% Glycerin
20 mg Bromphenolblau

C.7.6. Färbung von Proteinen in PAA-Gelen

Die Färbung der Proteine erfolgte je nach Alter der Färbelösung für 15 bis 60 Min. in Coomassie-Färbelösung auf dem Schüttler. Da durch die Färbung das gesamte Gel blau wurde, mußte anschließend der Hintergrund durch Schütteln in Entfärbelösung wieder entfärbt werden.

Coomassie-Färbelösung: 0.2% Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva, Heidelberg)
40% Methanol
10% Eisessig
Entfärbelösung: 40% Methanol
10% Eisessig

C.7.7. Färbung von LPS in PAA-Gelen

Die Färbung von LPS erfolgte in einer modifizierten Form (W. Brabetz, persönliche Mitteilung) nach der Methode von Tsai und Frasch (150). Hierfür wurde das Gel über Nacht

in 100 ml Fixierlösung auf dem Schüttler inkubiert. Der Fixierer wurde am nächsten Morgen abgeschüttet und für die Oxidation erneut 100 ml Fixierer mit 0.87 g Na-Perjodat (Sigma) zugegeben und für 5 Min. auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde dreimal 30 Min. mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Nun wurde das Gel für 10 Min. in einer frisch angesetzten Färbelösung geschüttelt und danach wiederum dreimal für 10 Min. mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Durch Zugabe von Entwicklerlösung wurde das Silber unter vorsichtigem Schütteln ausgefällt, der Entwickler bei ausreichender Färbung abgekippt und die Reaktion durch Zugabe von 100 ml 50 mM EDTA (pH 8) gestoppt. Vor dem Trocknen des Geles wurde es noch einmal für mindestens 10 Min. in bidestilliertem Wasser gewaschen.

Fixierlösung: 25% Isopropanol
7% Essigsäure

Färbelösung: 70 ml H₂O
1.4 ml NaOH
1 ml NH₃
1.25 ml 20% AgNO₃
Wichtig: frisch ansetzen, Reihenfolge einhalten!

Entwickler: 2.5% Na₂CO₃
auf 60°C vorwärmen
30 µl 37% Formaldehyd
Wichtig: frisch ansetzen!

C.7.8. Western Blot

Mit dieser Methode können Proteine, die auf eine Membran transferiert wurden, immunologisch nachgewiesen werden. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran (Hybond, Amersham) erfolgte nach der Methode von Towbin et al. (149), geblottet wurde elektrophoretisch in einer Semi-Dry Apparatur (BioRad) bei 20 kV für 30 Min.

Die Membran wurde nach dem Blotten durch Zugabe von TBS/Milchpulver für 1 Std. bei RT unter Schütteln geblockt. Als primärer Antikörper wurde polyklonales Kaninchen-Anti-Orf2-Serum in einer Verdünnung von 1:2000 zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgekippt und die Membran dreimal 5 Min. in TBS gewaschen, dann noch einmal TBS/Milchpulver zugegeben. Als zweiter Antikörper wurde an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG in einem Verhältnis von 1:5000 dazupipettiert. Nach 2 Std. Schütteln bei RT wurde die Lösung wieder abgekippt und die Membran erneut für dreimal 5 Min. in TBS gewaschen. Der enzymatische Nachweis der Antikörper durch die gekoppelte Meerrettich-Peroxidase erfolgte mit dem ECL-Kit (Amersham) nach Anleitung des Herstellers.

Transferpuffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
20% Methanol

TBS/Milchpulver: pH 8.3 (überprüfen!)
 20 mM Tris, pH 7.5
 150 mM NaCl
 3% Magermilch-Pulver (BioRad)

C.7.9. Gelshift-Assay

Die Bindung von Orf2 an DNA wurde mit Hilfe des DIG Gelshift-Kits (Roche) überprüft. Hierzu wurden PCR-Produkte von putativen K139 Promotor-Regionen hergestellt und mit Digoxigenin gelabelt. Die DNA wurde anschließend mit Orf2 in einem Bindepuffer inkubiert und dann auf ein nicht-denaturierendes PAA-Gel aufgetragen. Die Herstellung des Gels und die Elektrophorese erfolgten nach dem herkömmlichen Protokoll (6). Die DNA wurde dann in der Semi-Dry Apparatur für 30 Min. bei 20 kV auf eine Nylonmembran geblottet und enzymatisch laut Anleitung nachgewiesen.

C.7.10. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

2 ml einer ÜNK wurden 10 Min. bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Z-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die OD_{578} von diesen Ansätzen bestimmt. Danach wurden 3 Tropfen $CHCl_3$ und 2 Tropfen 0.1% SDS zugegeben und für 10 Min. bei RT inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren. Durch Zugabe von 100 μ l ONPG (2-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) wurde die Reaktion gestartet. Nach Eintreten der Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zupipettieren von 500 μ l 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Nach erneutem Abzentrifugieren für 2 Min. bei 13000 rpm wurde die Absorption bei 405 nm gemessen und die spezifische Aktivität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spez. Aktivität } (\mu\text{mol Produkt/Min.} \times \text{mg Protein}) = \frac{\Delta E_{405} \times V_t}{OD_{578} \times c_p \times V_B \times t \times \epsilon \times d}$$

ΔE_{405} = Extinktion von o-Nitrophenol bei 405 nm

OD_{578} = eingesetzte Bakterienmenge

c_p = Proteinkonzentration (107 μ g Protein/ml OD_{578})

V_t = Endvolumen des Ansatzes

V_B = Volumen an eingesetzter Zellsuspension

ϵ = Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol ($4860 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = Durchmesser der Küvette (1 cm)

t = Reaktionszeit in Min.

Z-Puffer: 10.7 g $Na_2HPO_4 \times H_2O$
 5.5 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$
 0.75 g KCl
 0.246 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$

C.7.11. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

Eine ÜNK Kultur wurde auf eine OD_{600} von 1 verdünnt und für 5 Min. bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 1 M Tris (pH 8) gewaschen und anschließend wieder in 1 ml 1 M Tris (pH8) aufgenommen. Nun wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l *p*-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP) gestartet und bis zur Gelbfärbung bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l 1 M K_2HPO_4 wurde die Reaktion gestoppt und die Absorption bei 405 nm bestimmt. Die spezifische Aktivität berechnet sich nach obiger Formel, der Extinktionskoeffizient von pNPP ist $9600 M^{-1} \times cm^{-1}$.

C.8. Bioinformatik

C.8.1. Auswertung der DNA-Sequenz

Die einzelnen Sequenzen wurden mit Hilfe des Auto Assembler 2.0 (Applied Biosystems) zu einem Contig zusammengesetzt. Anschließend wurde die DNA-Sequenz nach ORFs mit ATG, GTG oder TTG als Startcodon und mit einer Größe von mindestens 30 Codons abgesucht (Orf Finder; VektorNTI, Informax, Oxford, England). Im Zweifelsfalle wurden als Kriterien für die Entscheidung zwischen zwei ORFs die mögliche Homologie zur Datenbank, Größe, Vorhandensein einer RBS oder die genaue Einpassung des Gens in ein Operon gewählt. Am 5'-Ende der potentiellen Gene wurde nach einer möglichen RBS gesucht, als Kriterien wurden die Regeln von Stormo angewendet (144). Der Bereich vor dem Beginn eines Operons wurde nach Promotor-Sequenzen mit Homologie zu *E. coli* σ^{70} -Promotoren (103) abgesucht, mögliche Terminatoren mit dem GCG-Programmpaket (Wisconsin Package Version 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Wisconsin, USA) bestimmt. Die weitere Auswertung von Sequenzeigenschaften erfolgte mit dem GCG-Programm, dem DNAstrider oder den im folgenden Kapitel aufgeführten Internet-Programmen.

C.8.2. Internet-Programme

Programm	Funktion	Website	Referenz
ORF Finder	Suche nach ORFs	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html	
BlastX V2.1.2.	Homologie auf Aminosäure-Ebene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	(3)
FastA V3.4t11	Homologie auf DNA-Ebene	http://alpha10.bioch.virginia.edu/fasta/	(117)
Blast2	Paarweiser Vergleich	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	(147)
HTH motif prediction	Helix-Turn-Helix Motive	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hth.html	(38)
PSIpred V2.0	Sekundärstruktur	http://insulin.brunel.ac.uk/psipred/	

TMHMM	Signalsequenzen, Transmembran- Domänen	http://www.cbs.dtu.dk/services/	(142)
ClustalW 1.8	"Multiple Alignment"	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/	
Boxshade	Darstellung von "Multiple Alignments!"	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html	
Blockmaker	Konservierte Bereiche	http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html	

Tab. C.10: Die für die K139 Sequenzauswertung benutzten Programme aus dem Internet.

D. Ergebnisse

D.1. Bioinformatische Auswertung des K139 Genoms

D.1.1. Eigenschaften des Genoms

Die Gesamtlänge des K139 Prophagen (*attL-attR*) beträgt 33,105 bp. Der durchschnittliche AT-Gehalt liegt bei 51.1%, was sich nur unwesentlich vom AT-Gehalt des *V. cholerae* Chromosoms I (52.3%, (60)), auf dem die Integrationsstelle von K139 lokalisiert ist (107), unterscheidet. Der Verlauf des AT-Gehaltes über das gesamte Phagengenom ist in Abb. D.1 dargestellt.

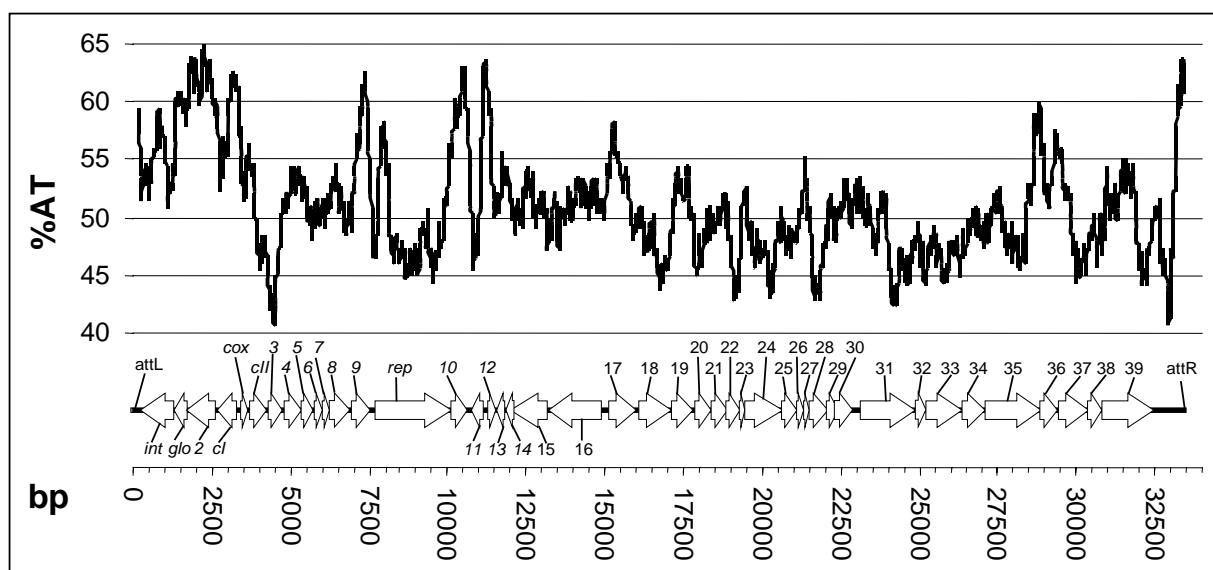


Abb. D.1: Verlauf des AT-Gehaltes über das gesamte K139 Genom. Zur besseren Orientierung sind die ermittelten offenen Leseraster (ORFs, "open reading frames"), durch Pfeile symbolisiert, in der unteren Bildhälfte dargestellt.

Mit Werten um 60% bis 65% ist der AT-Gehalt vor allem im linken Genombereich bis etwa zum *cox* Gen auffallend hoch, um danach abrupt auf etwas über 40% abzufallen. Bis zu *orf8* liegt er auf eher durchschnittlichem Niveau und steigt dann im Bereich von *orf9* wieder stark auf ca. 62% an. Nach einem kurzen, aber steilen Abfall erfolgt am Beginn von *rep* wiederum ein Anstieg auf ca. 58%, doch schon nach dem ersten Viertel des Gens sinken die Werte schnell auf unter 50% ab. Am Ende von *rep* bis *orf10* und von *orf11* bis *orf12* liegen dann noch einmal zwei Scheitelpunkte mit über 60%. Die nachfolgende Region zeigt eher durchschnittliche Schwankungen. Ab dem letzten Drittel von *orf35* bis zum Anfang von *orf37* sind nochmals zwei kleinere Scheitelpunkte, die jeweils bis knapp unter 60% ansteigen. Der Rest der kodierenden Region liegt dann wieder im durchschnittlichen Bereich. In der nicht-kodierenden Sequenz bis zur rechten *att*-Site erfolgt dann ein starker Anstieg auf etwa 64%.

Insgesamt wurden in der K139 Sequenz 38 potentielle ORFs identifiziert, was zusammen mit der früher veröffentlichten Sequenzen (123) (107) eine Gesamtzahl von 44 ORFs ergibt (siehe untere Hälfte von Abb. D.1 und Tab. G.1). Zwei ORFs (*rep* und *orf39*) weisen GTG als mögliches Startcodon auf, alle anderen vermutlich das Standard-Startcodon ATG. Die Ribosomenbindungsstellen (RBS) wurden mit Hilfe der Regeln von Stormo ermittelt (144). Je höher die Stormo-Klassifizierung, desto besser der Abstand zum Startcodon und die Homologie zur 16 S rRNA. Die Klassifizierung der einzelnen RBS sowie das theoretische Molekulargewicht (MW) und der pI der abgeleiteten Genprodukte sind ebenfalls in Tab. G.1 eingetragen.

Die Orientierung der ORFs des K139 Genoms läßt darauf schließen, daß es in mindestens sechs transkriptionelle Einheiten eingeteilt ist. Am jeweiligen Beginn der Operone wurden Promotoren des *E. coli* σ^{70} -Typs gefunden (103) (Tab. D.1).

Promotor	Lage	-35 —N— -10	Homologie zu <i>E. coli</i> σ^{70}
P _R	3252-3280	TCGTCT - N ₁₇ - GAAAAT	51%
P _L	3398-3369	CTTAAA - N ₁₈ - TCTATT	experimentell* (107)
P ₁₁	11109-11078	TTGGCA - N ₂₀ - CATATT	50%
P ₁₂	11239-11267	TTGAGA - N ₁₇ - TAATAT	72%
P ₁₃	11856-11828	TACAAA - N ₁₇ - TATGAT	51%
P ₁₆	15007-14976	GTGAAT - N ₂₀ - GAAATT	41%
P ₁₇	15022-15050	CTGAAA - N ₁₇ - TATGGT	49%

Tab. D.1: Putative Promotoren der K139 Sequenz. Die Promotoren wurden im Computer durch ihre Homologie zu *E. coli* Promotoren des σ^{70} -Typs nach dem Algorithmus von Mulligan et al (103) bestimmt. *Die experimentelle Bestimmung des P_L-Promotors erfolgte durch Primerextension (107).

Drei Operone weisen zudem putative Rho-unabhängige Transkriptions-Terminatoren auf (Tab. D.2), die mit dem GCG-Programmpaket ermittelt wurden. Zwei von ihnen besitzen relativ niedrige ΔG -Werte (< -15 kcal/mol), ihre Lage kurz hinter einem ORF läßt aber vermuten, daß es sich um tatsächliche Terminatoren handeln könnte.

Terminator	Lage	Sequenz	ΔG
T ₁₀	10691-10708	CCACCACCAAGCGCCTGCGGGCGCTTTGTTTTCT	-10.6 kcal/mol
T ₁₂	11565-11598	CTTAAGCCGTTGCCGCGCTTCTGGCGGCAACGCTTAC ACAAATCAAA	-17.7 kcal/mol
T ₃₉	32440-32461	ACCACAACGCAGCCTAACCGCTGCGTTTCTTTTTG	-12.4 kcal/mol

Tab. D.2: Putative Rho-unabhängige Terminatoren der K139 Sequenz. Die unterstrichenen Nukleotide sind Teil des Stammes, die punktiert unterstrichenen Nukleotide bilden den "Loop". Die ΔG -Werte wurden mit dem VektorNTI-Programm, basierend auf Tinoco et al. (148) ermittelt.

Die Sequenzanalyse der isolierten DNA aus den Phagenpartikeln ergab außerdem eine terminale Redundanz der Sequenz, die sich mindestens über die Reichweite einer Sequenzierung (ca. 600 bp) erstreckt. Dies würde die bereits früher bei Southern Analysen beobachteten Hinweise auf eine terminale Redundanz des Phagen bestätigen (123).

D.1.2. Ergebnis der Datenbankvergleiche

D.1.2.1. Homologie zu V86

Bereits bei der Sequenzierung der Kontrollregion durch Nesper et al. (1999) (107) wurde eine Überlappung von ca. 700 bp mit einer Sequenz aus dem O1 El Tor *V. cholerae* Stamm V86 festgestellt (Accession Nr. AF008938). Nach Abschluß der Sequenzierung von K139 zeigte sich, daß sich die Überlappung mit V86 über den gesamten veröffentlichten Bereich von ca. 6 kb erstreckt. Die in der Datenbank publizierte V86 Sequenz entspricht dabei dem Genombereich zwischen dem *cII* Gen und dem putativen Replikationsgen *rep* (siehe Abb. D.1). Der Hauptunterschied zwischen beiden Sequenzen ist die Anwesenheit zweier zusätzlicher Nukleotide in der V86 Sequenz (G an Position 5617 und A an Position 5626), was zu einer Verschiebung des Leserasters im *rep* Gen und damit zu einem vorzeitigen Genabbruch führt. Falls es sich bei dieser Verschiebung des Leserasters nicht um einen Sequenzierfehler handelt, dürfte es sich bei V86 allerdings um einen defekten Prophagen handeln, da das putative Replikationsgen nicht exprimiert werden kann. Auf jeden Fall ist anzunehmen, daß V86 einen zu K139 identischen oder zumindest sehr nahe verwandten Prophagen trägt.

D.1.2.2. Funktionelle Organisation des Genoms

Die Zusammenfassung der Detailergebnisse der Datenbankvergleiche ist in Tab. G.1 im Anhang gezeigt. Insgesamt zeigen 14 ORFs signifikante Homologien zu Proteinen bekannter Funktion, 16 ORFs sind homolog zu putativen Proteinen und weitere 14 ORFs weisen keinerlei Homologie zu bisher bekannten Proteinen auf. Insgesamt sind 26 ORFs homolog zu Proteinen der P2-Phagenfamilie. Vor allem die Homologien zu den gut charakterisierten P2-Phagen P2 und 186 ermöglicht eine funktionelle Zuordnung vieler ORFs (Abb. D.2).

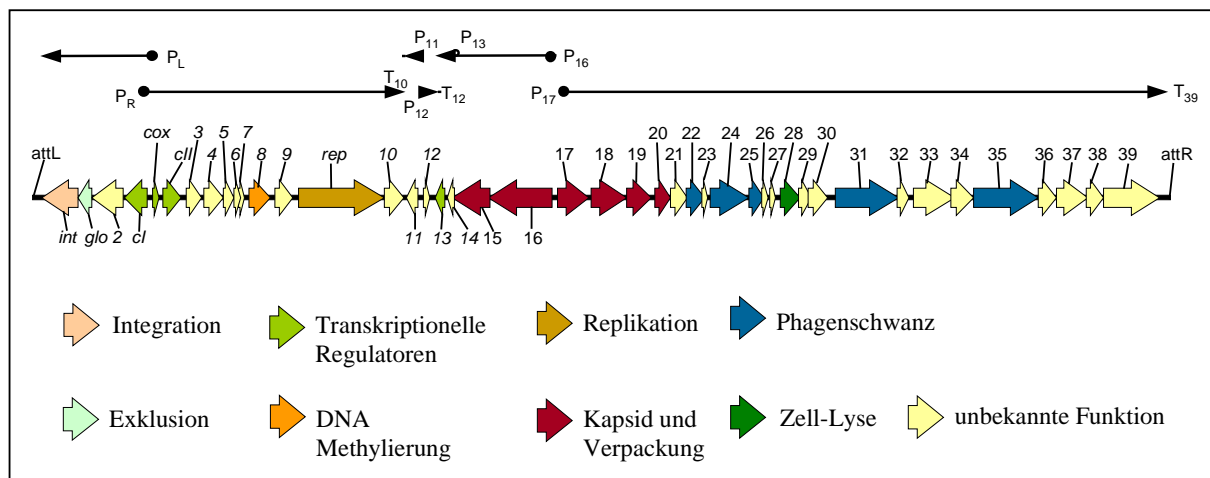


Abb. D.2: Funktionelle Einheiten des K139 Genoms. Über dem Genom sind die vermutlichen transkriptionellen Einheiten eingezeichnet. Die Funktion der ORFs wird durch die Farbe der Pfeile symbolisiert.

Das erste von P_L aus transkribierte Operon auf der linken Seite enthält die Gene, die zur Etablierung und Aufrechterhaltung des lysogenen Zustandes benötigt werden, während die Expression des nach rechts weisenden Promotors P_R wahrscheinlich zur lytischen Entwicklung des Phagen führt, wie bereits von Nesper (1999) (107) beschrieben. Dieses frühe lytische Operon endet wahrscheinlich am putativen Promotor T_{10} . Die sich rechts daran anschließende Region enthält drei in gegenläufige Richtungen transkribierende Operone, die jeweils nur ein Gen enthalten. Der übrige Teil des Genoms ist in zwei gegenläufigen Operonen organisiert und enthält alle Gene, die für die Bildung des Phagenpartikels, die Verpackung des Phagen-genoms und für die Lyse der Wirtszellen benötigt werden.

Die Anordnung der funktionellen Gencluster beim K139 Prophagen entspricht weitgehend der der bereits sequenzierten P2-Phagen (Abb. D.3). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, handelt es sich bei den P2-Phagen durchaus nicht um eine einheitliche Gruppe. Auffällig ist das Vorhandensein eines verschiedenen Schwanz-Gencluster Typs bei HP1/HP2 im Vergleich zu 186/P2/ Φ CTX. Als Prototyp für die letztere Gruppe ist in der Abbildung der P2-Phage dargestellt.

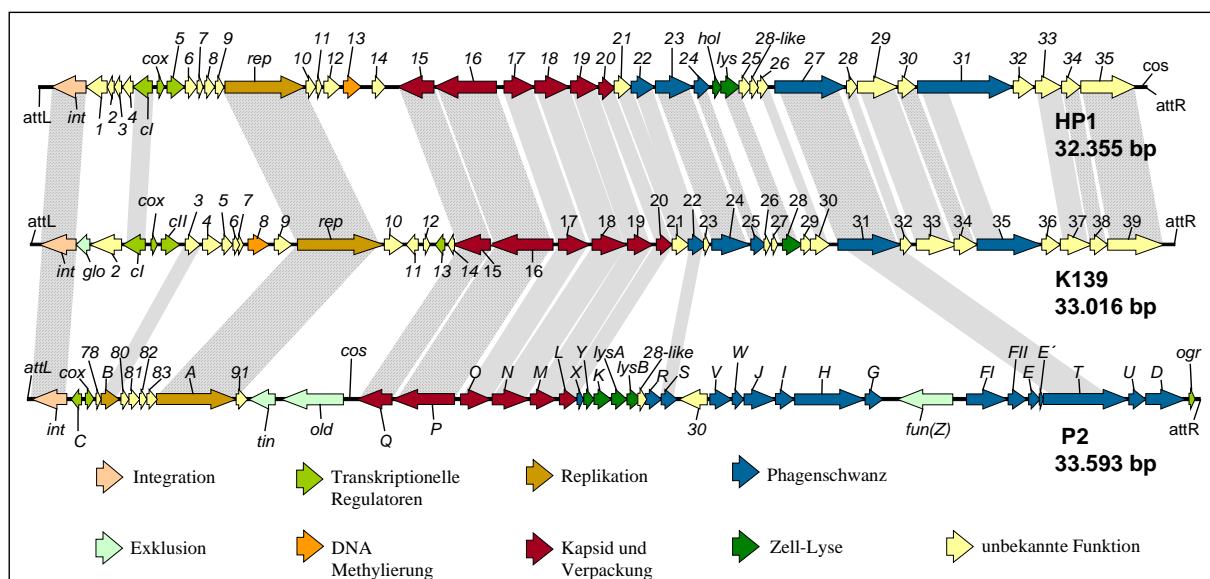


Abb. D.3: Vergleich des K139 Phagen-genoms mit dem von HP1 und P2. Auch hier symbolisiert die Farbe der Pfeile die unterschiedliche Funktion der ORFs. Homologe ORFs sind durch Querbalken miteinander verbunden, wobei graue Balken alleine für Homologie auf AS-Ebene, punktierte Balken dagegen für zusätzliche Homologie auf DNA-Ebene stehen.

Schon auf den ersten Blick ist erkennbar, daß K139 den gleichen Schwanz-Gencluster Typ aufweist wie HP1, mit Ausnahme des vermutlichen Schwanzfaser-"Assembly" Proteins Orf36. Im Gegensatz dazu sind nur zwei der Schwanzproteine von K139 zu P2 homolog. Auch das Zell-Lyse Cluster liegt bei HP1 und K139 an äquivalenter Stelle, im Vergleich zu P2 ist es weiter in das Schwanz-Cluster hinein verschoben. Das Kapsid-Cluster weist die größte Konservierung hinsichtlich des Gen-Gehaltes und der Organisation auf, dies gilt auch für die beiden anderen durchsequenzierten P2-Phagen 186 und Φ CTX (siehe Tab. G.1, Abb.

G.1). In den frühen Operonen dagegen gibt es kaum Ähnlichkeiten. Nur die für die grundlegenden Phagenfunktionen zuständigen Proteine, die Integrase und das Replikationsprotein, sind noch stark konserviert. Daneben sind in dieser Region in allen P2-Phagen eine unterschiedliche Anzahl an ORFs ohne jede Homologie zueinander oder zur Datenbank kodiert. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen der HP1/HP2- und der P2/186/ Φ CTX-Gruppe ist die Lage des Verpackungssignals (*cos*), das bei P2 (ebenso bei 186 und bei Φ CTX) stromabwärts vom Kapsid-Cluster lokalisiert ist, während es bei HP1/HP2 neben dem Integrase Gen liegt. Die Lage des Verpackungssignals bei K139 ist noch nicht bekannt. Die Beobachtung der terminalen Redundanz der Phagen-DNA bei der Sequenzierung spricht jedoch gegen das Vorhandensein einer *cos*-Sequenz.

D.1.3. Funktionelle Gengruppen

D.1.3.1. Genregulatoren und putative DNA-bindende Proteine

Homologie zu Regulatoren weisen die in der Lysogenie/Lysis-Kontrollregion kodierten Proteine CI, Cox und CII auf sowie das neben dem Kapsid-Cluster kodierte Orf13. Typische DNA-Bindemotive dagegen besitzen Orf11 und Orf26. Die sich aus der Homologie-Analyse ergebende mögliche Funktion der putativen Regulatoren in der Kontrollregion wurde bereits von Nesper et al. (107) beschrieben. CII und CI dienen vermutlich der Etablierung und Aufrechterhaltung des lysogenen Zustandes, Cox dagegen spielt möglicherweise eine Rolle beim Wechsel zum lytischen Zustand. Eine experimentelle Überprüfung der CI-Funktion wird in Kap. D.3.4 vorgestellt. Ein Kriterium für die Funktion als DNA-bindendes Protein ist das Vorhandensein einer Helix-Turn-Helix (HTH) Struktur in der Aminosäure-Sequenz. Das in der Region zwischen dem Replikationsgen und dem Kapsid-Cluster kodierte Orf11 weist ein solches Motiv auf (Tab. G.1). Es besitzt allerdings keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen, so daß keinerlei Hinweise auf eine mögliche Funktion existieren. Ein weiterer putativer Regulator, Orf13, konnte in der Region unmittelbar neben dem Kapsid-Gencluster (Abb. D.3) identifiziert werden.

P2 Ogr	1	----MFH	CPLCQHA	AHARTSR	YITDITK	ERYHOC	QNVNCS	SATFIT	YESVQR	YIVKPG	EVH
186 B	1	----MFH	CPKCHHA	AHARTSR	YITENTK	ERYHOC	QININC	SCTFMT	METIER	FIVTPG	AID
RSc0964	1	-----	MNCPHC	GSVAT	IRTSRP	VSRITR	ELYCQ	CSNVLC	GHFTFV	SLVEVV	RTLSP
phiCTX Ogr	1	VSVYK	LVCPC	CHSRM	IRSR	SEGQTP	CFRSM	YAOCT	NALCG	ATFTG	SLSWD
K139 Orf13	1	---MR	VFCPE	CEGK	RIQK	INRFT	AGVAD	LYCAC	CDPEC	GHTFV	MNLSYS
			*	*			*	*			
P2 Ogr	57	AVRPH	PLP	-SGQ	IMWM	-----	-----	-----	-----	-----	-----
186 B	57	PAPP	PTV	-CGQ	PLWL	-----	-----	-----	-----	-----	-----
RSc0964	56	PEVA	RQLA	-CRSE	PAHAV	-----	-----	-----	-----	-----	-----
phiCTX Ogr	61	PMVLP	MAPS	KTRQ	LARR	DLAA	TNQL	DLDD	HVECM	Q	
K139 Orf13	58	SQLA	FDL	CKA	LPPE	ARQ	RLKH	QLSM	L	-----	-----

Abb. D.4: Sequenzvergleich der Zink-Finger Aktivatoren der späten Phagenoperone mit dem ClustalW Programm. Mit einem Stern (*) markiert sind die vier Cysteine, die wahrscheinlich an der Koordination und Bindung des für die Enzymaktivität notwendigen Zink-Ions beteiligt sind. Identische AS sind mit schwarzem Hintergrund versehen, konservierte Substitutionen dagegen mit grauem Hintergrund.

Die Datenbanksuche ergab Ähnlichkeiten zu einem putativen ORF von *Ralstonia solanacearum* und zu Orf34 von Φ CTX. Letzteres Protein gehört zur Gruppe der Aktivatoren der späten Operone, die auch bei den anderen P2-Phagen außer bei HP1/HP2 zu finden sind. Als gemeinsames Sequenzmotiv wurde ein Zink-Finger beschrieben. Bei einem Vergleich verschiedener später Regulatoren dieser Gruppe zeigte sich, daß Orf13 von K139 das gleiche Sequenzmotiv aufweist (Abb. D.4).

Ein weiterer ORF der K139-Sequenz; Orf26, weist ebenfalls ein Zink-Finger Motiv auf (Abb. D.5) und könnte somit ein potentiell DNA-bindendes Protein darstellen. Es ist homolog zu einer ganzen Reihe von Phagen-Proteinen, über deren Funktion allerdings bisher noch nichts bekannt ist. In den P2-Phagen P2, 186 und Φ CTX sind die homologen Proteine allerdings nicht im späten Operon stromaufwärts vom Zell-Lyse Cluster, sondern im frühen Operon in der Nähe des Replikationsgens kodiert.

933W L0141	1	MADIIDNAAEIEELQRNLSLQKYKS----DSNAPSATHCCECGDPIDERRRLAVQGCRTC
VT2-Sa Orf79	1	MADIIDNAAEIEELQRNLSLQKYKS----DSNAPSATHCCECGDPIDERRRLAVRGCRAC
186 Orf37	1	MADAMDLAQLREQEDRERHTSNARS----RRHEVSAFTICEECDAPPEARRRAIPGVQCC
P2 Orf82	1	MPDNVDFIQEQQAELLERQINAARV----KHCCASALVCEECDAPIPAARRAAYPSATRC
phiCTX Orf39	1	-VDVIDQANERAENMVCAALACRTN----TRLAPSALWCEDCGEIQIPEARROAAPGCECC
K139 Orf26	1	-MDVIDDAAKTEAKFQQMALANHRARAMQTAYLPSRTHCLECDPIPKERQEKVKGCQYC
		* * *
933W L0141	57	ASCQEDIELISKQRGSK--
VT2-Sa Orf79	57	ASCQCDIELINKQRGVK--
186 Orf37	57	VTCQEIIELEKSKHYNGGAL
P2 Orf82	57	VSCQSVFEEKNKHYRRTA-
phiCTX Orf39	56	ISCQELREHPARR-----
K139 Orf26	60	TPCQAAKEQR-----
		*

Abb. D.5: ClustalW-Vergleich einiger Orf26-homologen Zink-Finger Proteine. Auch hier sind die an der Zink-Koordination beteiligten Cystein-Reste mit Sternen (*) markiert.

D.1.3.2. Replikation

Das Rep Protein von K139 zeigt Homologie zu Replikationsproteinen einer großen Anzahl von Phagen, darunter zu Rep von HP1/HP2 und zu den Proteinen A der am besten untersuchten Phagen 186 und P2 (Tab. G.1). Wie in der Einleitung schon erwähnt, zählen die Replikationsproteine der P2-Phagen zur Superfamilie I der Rep-Klasse der RC-Replikationsproteine. Kennzeichen dieser Gruppe sind drei Motive, die in allen diesen Proteinen vorhanden und gleich angeordnet sind. In einem Vergleich von K139 Rep mit den Replikationsproteinen der P2-Phagen HP1, P2 und 186 konnten auch im K139 Protein diesselben Motive gefunden werden (Abb. D.6). Das N-terminale Motiv 1 besteht aus einer Gruppe verzweigt-kettiger, hydrophober Reste und wird von einem Threonin abgeschlossen. Typisch für die Replikationsproteine von Bakteriophagen ist das in die hydrophobe Gruppe eingeschobene Threonin (78), das auch bei K139 Rep zu finden ist. Das zentrale Motiv 2

besteht aus zwei Histidin-Resten, die ebenfalls in eine Gruppe verzweigt-kettiger, hydrophober Aminosäuren eingebettet sind.

	Motiv 1	Motiv 2	Motiv 3
K139 Rep	305 FLTLTTPS	370 TPHWHLLIW	443 TGYIAKYIS
186 A	319 FYTLTAPS	384 TPHWHMLMF	440 TGYVAKYIS
P2 A	323 FITLTAPS	397 TPHWHMMLF	448 AGYIAKYIS
HP1 Rep	396 FLTLTAPS	457 TPHWHALAY	510 TAYIAKYIA
Consensus	FUTLTaPS	TPHWHuUuU	tgyUAKYIS
			* *

Abb. D.6: Motive der Replikationsproteine der P2-Phagen nach Ilyina und Koonin (67). Die durch die beiden Sterne (*) gekennzeichneten Tyrosin-Reste sind Teil des aktiven Zentrums des P2 A Proteins (114). U steht für verzweigt-kettige, hydrophobe Aminosäuren; als solche gelten Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) oder Tryptophan (W). Aminosäuren, die in allen Proteinen konserviert sind, sind in Großbuchstaben dargestellt. Die Zahlen vor den Motiven geben die Lage innerhalb der Proteinsequenz an.

Diese Histidin-Reste spielen vermutlich bei der Koordination von Metall-Ionen eine Rolle, die für die Aktivität des Enzyms notwendig sind. Analog zu anderen Metalloenzymen, bei denen Histidin-Reste an der Koordination beteiligt sind, liegt auch hier ein Prolin direkt neben dem bindenden Histidin. Das dritte Motiv schließlich weist die beiden Tyrosin-Reste des aktiven Zentrums auf, die für die "cleavage-joining"-Aktivität des Replikationsproteins A des P2-Phagen benötigt werden (114).

Der Replikationsursprung von P2 und 186 wurde innerhalb der kodierenden Sequenz des Replikationsgens selbst lokalisiert (88) (137). In einem Blast2 Vergleich der Nukleotid-Sequenzen von K139 *rep* und P2 A wurde ein Bereich von 30 bp gefunden, in dem die beiden Gensequenzen 90% Identität zeigen (Abb. D.7). Interessanterweise liegt der Replikationsursprung von P2 genau innerhalb dieses Bereiches. Auch ein Vergleich mit dem Phagen 186 zeigt, daß dieser Bereich hoch konserviert ist. Die Homologie zwischen beiden Sequenzen beträgt sogar 94%.

186 A:	1819	tctgcgccctctcggagttctgtcaataactgtacgg	1855
K139 rep:	1999	tctgcccgcctctcggagttctgtcaataactgtacgg	2035
P2 A:	1849	gcccgcctcggagtcctgtcaataactgt	1878
		↑	

Abb. D.7: Vergleich der DNA-Sequenzen der Replikationsgene von K139, P2 und 186. Der dargestellte Bereich von K139 *rep* weist 94% Identität zu 186 A und 90% zu P2 A auf. Der Pfeil kennzeichnet den in P2 exakt lokalisierten Replikationsursprung (88).

Neben dem Rep Protein weist K139 noch Orf3 als mögliches Replikationsprotein auf. Es ist zu 28% identisch zum B Protein von P2, allerdings mit einem sehr niedrigen e-Wert von 0.37. Das B Protein fungiert bei P2 als DnaC-Analog bei der Replikation. MW und pI liegen ungefähr in der gleichen Größenordnung (16.4 kDa und pI 9.3 bei Orf3, 20.6 kDa und

pI 8.3 bei P2 B). Passend zur hohen Abundanz von Protein B in der replikativen Phase von P2 weist das Gen eine gute RBS auf. Auch bei Orf3 von K139 ist eine gute RBS (Stormo-Regel 7) zu finden, was ebenfalls auf eine gute Expression hindeutet.

D.1.3.3. Methylierung

Im frühen lytischen Operon, noch vor dem *rep* Gen, liegt *orf8*, das auf Aminosäure-Ebene 29% Identität zu plasmidkodierten putativen Proteinen von *E. coli* O157:H7 und *S. flexneri* aufweist. Bei einer Suche nach möglichen Proteinmotiven in der Datenbank konnte ein N-6 Adenin-spezifisches DNA-Methylase Motiv identifiziert werden. Die experimentelle Überprüfung der Funktion von Orf8 soll in Kap. D.3.2 erläutert werden.

	Motiv X		Motiv I		Motiv II	
Orf8 K139	11	NELYPTPAEIVDALLAKL	34	DIFLEPCYGTGAIYEKI	63	QKSFAEIQ
TaqI	18	LGRVETPPEVVDVFMVSLA	41	GRVLEPACAHGPFTRAF	66	RFVGVVEID
BsuBI	25	LGQFFFTPSSISIFMACLF	50	AKVLDACAGIGSLTSAF	79	DLHLLLEID
PstI	35	LGQFMSSSAVSELMANLF	59	HEILDACAGVGSLTAAF	110	KIRAMEFE
AccI	29	FAQFFTFPFLAYAMAKWI	53	KTVLEPAFGLGVFSRAI	77	NIKCFEVD
Eco57I	13	RGGYTYPQNLADYVTKWV	36	KTIILEPSCGDGVFTQAI	65	CFELFDTE
CviBIII	25	QGIFFTPKTVREKLFGET	51	FSILEPSCGTGEIISEC	75	SIKGVELD
HincII	9	LGQFFTPTHIVKYMIGLM	32	ASILEBSSGNGVFLDSL	55	NLTSYEID

	Motiv III		Motiv IV		Motiv V		Motiv VI	
Orf8 K139	69	-LTTDFGQQ	77	-DVIITNPPFSL	91	-----FMRKSLKELA-PDGTVMVY-----		
TaqI	86	-IIADFLIW	98	FDLIICGNPPYGI	139	KYNLYGAFLEKAVRLLK-PGGVLVVFVVPATWL		
BsuBI	110	IIIDDFIEW	137	FTHAILNPPYKK	166	TVNLYSAFVALTVDLMS-DGGETVFIIPRSEC		
PstI	119	NWQQKIIIES	146	YNKAILNPPYK	175	ASNLYSAFVALAIKQLK-SGGELVAITPRSEC		
AccI	103	ILLQDYMYN	117	YDGIICGNPPYFK	152	FTNLYTLFLKSLHQLS-QNGRCAYIIPSEEL		
Eco57I	90	ITEGDFLWV	110	FDGAILGNPPFIR	147	HTNAWVPFLSLALLK-QGCRIGMVIPSEIS		
CviBIII	100	IVNEDFLW	113	FDFIVGNPPYVV	139	RSNLYVEFLYKCTEHLKEDGILAFIIPSTIG		
HincII	76	-FITSYDKP	85	YDSIICGNPPYVR	121	LCDYFYIFIIKSLQLK-VGGLIFICPDYEF		

	Motiv VII		Motiv VIII	
Orf8 K139	108	----LQR----LNYLG----	122	FWFEIG
TaqI	176	LIREFLAREGKTSVYYLGVVFP	192	EVFPQK
BsuBI	203	GIRKFLINNGSFEKIIIFNESK	225	KAFKDD
PstI	212	DFRKQMLDECSLNKIHVFNSRK	234	SAFKAD
AccI	189	HFRQHLLNKTSIKHMHLEFSRD	211	NVFDDA
Eco57I	184	SIRSYLGHVCS--KIVIIDPKE	204	IWFEDT
CviBIII	177	LVKTYLIKSKTLRHIIVIDFEE	196	HDFCDT
HincII	158	PIRKLIIIT-LDILSFEILDK--	180	-VTHGV

Abb. D.8: ClustalW-Vergleich von K139 Orf3 mit einigen Adenin-Methylasen der γ -Gruppe. Dargestellt sind nur die Bereiche mit den Sequenzmotiven. Die Zahlen vor den Sequenzen geben die Lage innerhalb der Aminosäure-Sequenz an.

Für Adenin-Methylasen wurden eine Reihe von Sequenzmotiven beschrieben, aufgrund derer eine Einteilung in drei verschiedene Untergruppen möglich ist (93). Deshalb wurde die Orf8-Sequenz mit Methylasen aus allen drei Untergruppen in einer ClustalW-Analyse

verglichen und schließlich als Mitglied der γ -Untergruppe der Adenin-Methylasen identifiziert (Abb. D.8).

Auch in der Phagensequenz des HP1 Phagen ist eine Methylase kodiert (Abb. D.3), die die Sequenzmotive der γ -Subgruppe der Adenin-Methylasen aufweist (118), jedoch keinerlei Homologie zu Orf8 von K139 zeigt.

D.1.3.4. Kapsid und Verpackung

Die an der Bildung des Kapsids und der Verpackung der Phagen DNA beteiligten Gene *orf15* bis *orf20* sind in zwei Operonen organisiert (Abb. D.3). Die beiden von P₁₆ aus nach links transkribierten Gene zeigen dabei auch auf DNA-Ebene Homologie zu den entsprechenden Genen der P2-Phagen (Tab. G.1), die von P₁₇ aus nach rechts transkribierten Kapsidgene dagegen nur auf AS-Ebene. Die hohe Konservierung zu den gut untersuchten Phagen P2 und 186 ermöglicht auch hier eine funktionelle Zuordnung aller putativen Kapsidgene.

So konnte Orf18 konnte als die Hauptuntereinheit des Kapsids identifiziert werden. Dazu passend deutet auch die optimale RBS (Stormo Regel 7) an, daß das Gen eine hohe Expression aufweist. Als Gerüstprotein für den Zusammenbau der Hauptuntereinheiten könnte Orf17 dienen. Orf15 weist Ähnlichkeit zu den Portal- oder Konnektor-Proteinen auf, bildet also wahrscheinlich den Eintrittskanal für die Phagen-DNA und die Anheftungsstelle für den Phagenschwanz. Interessanterweise besitzt Orf15 laut Sequenzanalyse ein HTH-DNA-Bindemotiv, was vielleicht für die Verpackung der DNA eine Rolle spielen könnte. Das letzte Gen im Kapsid Morphogenesis-Cluster, *orf20*, ist homolog zu Kapsid-"Completion" Proteinen. Das Homolog in P2 spielt ebenfalls eine Rolle bei der Anheftung des Phagenschwanzes.

Laut Vergleich zur Datenbank kodiert *orf16* für die große Terminase-Untereinheit, die bei anderen Phagen an der Bindung des Prokapsids, der Verpackung und für das Zurechtschneiden der Phagen-DNA zuständig ist. Neben der Ähnlichkeit zu den P2-Phagen ist Orf16 auch zu einer Sequenz aus dem O1 klassischen *V. cholerae* Stamm Z17561 homolog. Das entsprechende *V. cholerae* Protein besitzt allerdings nur eine Größe von 20 kDa im Vergleich zum 69 kDa Orf16 Genprodukt. Möglicherweise handelt es sich also nur um ein unvollständig sequenziertes Fragment eines mit K139 näher verwandten Phagen. Dafür spricht auch, daß ein weiteres Fragment aus diesem *V. cholerae* Stamm Homologie zu einem K139 Genprodukt aufweist, was bei der Besprechung der Phagenschwanz-Gene noch diskutiert werden soll. Entsprechend seiner möglichen Funktion für das Zurechtschneiden der Phagen-DNA während des Verpackungsprozesses konnte in der Orf16 Sequenz ein HTH DNA-Bindemotiv identifiziert werden. *orf19* weist Homologie zu den kleinen Terminase-

Untereinheiten einer großen Anzahl von Phagen auf. Sie ist möglicherweise an der Erkennung der Phagen-DNA und deren Transport zu den Prokapsiden beteiligt.

D.1.3.5. Phagenschwanz

Die meisten der putativen K139 Schwanzgene zeigen lediglich Homologie zu Proteinen des HP1-Phagen, nicht aber zu den am besten funktionell charakterisierten Phagen P2 und 186. Dies trifft auf die Genprodukte von *orf21*, *23*, *32* bis *34* und *37* bis *39* zu. Demzufolge kann nur einem kleinen Teil der Schwanzgene eine mögliche Funktion zugewiesen werden.

Orf22 dagegen besitzt neben seiner Homologie zu Orf22 von HP1 und zu weiteren uncharakterisierten Genprodukten auch 26% Identität zum Schwanz-"Completion" Protein von 186, allerdings nur mit sehr niedrigem e-Wert. Mutanten des entsprechenden HP1 Orf22 können lediglich schwanzlose Phagen herstellen, was für eine tatsächliche Funktion im Zusammenbau des Phagen-Schwanzes spricht. Orf24 and 25 weisen lediglich eine Homologie zu HP1/HP2 Proteinen auf, nämlich Orf24 zum putativen Schwanzscheiden-Protein und Orf25 zum Schwanzröhren-Protein. Allerdings ist zu beachten, daß die Funktionszuordnung der entsprechenden HP1 Homologe vor allem auf Vergleichen der Protein-Eigenschaften (pI, MW und Abundanz der Proteine in SDS-Gelen von HP1-Phagenpartikeln) mit den P2 Schwanzscheiden und -röhren Proteinen beruht (42). Unterzieht man die entsprechenden K139 ORFs einem parallelen Vergleich, so zeigen sich ebenfalls vergleichbare Eigenschaften was MW und pI anbelangt (Tab. D.3).

Eigenschaft	Schwanz-Scheiden Protein			Schwanz-Röhren Protein		
	P2 FI	HP1 Orf23	K139 Orf24	P2 FII	HP1 Orf24	K139 Orf25
MW	46 kDa	43 kDa	41 kDa	20 kDa	17 kDa	17 kDa
pI	5	5.8	4.8	5	4.9	5.7

Tab. D.3: Vergleich der Eigenschaften der P2 Schwanzscheiden und -röhren Proteine mit den vermuteten HP1 und K139 Proteinen gleicher Funktion.

Die Homologie von Orf31 dagegen ermöglicht eine eindeutigere Funktionszuordnung. Die identischen P2 und 186 Proteine bestimmen die Länge des Phagenschwanzes. Aus diesem Grund müssen sie die gesamte Länge des Schwanzes durchspannen können. Das Protein muß entsprechend ziemlich groß sein und vor allem α -helikale Sekundärstrukturen aufweisen (86). Eine theoretische Abschätzung der Größe des Längendeterminator-Proteins wurde von Linderoth et al. vorgeschlagen. Diese geht aus von der gemessenen Größe des P2-Phagenschwanzes und einem Aminosäure-Abstand im Protein von 0.15 nm pro Aminosäure (86). Stellt man eine vergleichbare Berechnung für K139 an, so kommt man bei einer Schwanzlänge von ca. 101 nm (123) auf eine Anzahl von 670 AS, um diese Länge zu durchspannen, oder grob umgerechnet auf 67 kDa MW für das Protein. Dies ist in guter Übereinstimmung zum MW von Orf31, das 64 kDa beträgt. Die Berechnung der

Sekundärstruktur ergab einen Anteil von 67% α -helikaler Strukturen, beim entsprechenden P2 T Protein sind es 62%.

Schließlich konnten noch Orf35 und Orf36 als mögliche Schwanzproteine identifiziert werden. Orf35 weist in seinem N-terminalen Ende Homologie zur Schwanzfaser von HP1 auf, in seinem C-terminalen Bereich dagegen zu einer putativen Phagensequenz von *Agrobacterium tumefaciens*. Die bei anderen Phagen gefundene modulare Struktur der Schwanzfaser konnte auch für K139 bestätigt werden, wie in Kap. D.2.3.2. noch gezeigt werden soll. Für den direkt stromabwärts kodierten Orf36 dagegen konnte 26% Homologie zu einem Schwanzfaser-Assembly Protein von HK97 gefunden werden.

D.1.3.6. Wirtszell-Lyse

Bei den Genen des möglichen Wirtszell-Lyse-Clusters ist eine genaue Funktionszuordnung schwierig. Betrachtet man sich die gut charakterisierten Phagen P2 und 186 (119) (159), so könnte man entsprechend bei K139 folgende Gene erwarten: ein Holin, gefolgt von einem Lysozym, einem oder zwei Hilfsproteinen und einem weiteren kleinen ORF mit bisher noch unbekannter Funktion. Doch konnte tatsächlich lediglich Orf28 aufgrund seiner Homologie zu Phagen-Lysozymen eindeutig eine Funktion in der Zellyse zugesprochen werden. Interessanterweise findet sich bei einer Analyse der Proteinsequenz ein mögliches Signalpeptid (SP) oder eine putative Transmembranhelix (TMH) am N-Terminus. Kein Genprodukt von K139 weist dagegen Homologie zu Holinen auf. Eine Sequenzanalyse von Orf27 ergab das Vorhandensein von 2 TMHs, bei Orf29 dagegen gibt es eine TMH oder eine mögliche Signalsequenz am N-Terminus. In der Sequenz von Orf30 konnte ebenfalls ein Signalpeptid identifiziert werden. Darüber hinaus weist es 39% Identität zu Orf26 von HP1 auf, das ebenfalls stromabwärts des HP1 Lysozyms kodiert wird. Von Esposito et al. (42) wurde für Orf25 und Orf26 die Funktion von Lysis-Hilfsproteinen vorgeschlagen, ausgehend von einer ähnlichen Lokalisation der für die beiden Hilfsproteine kodierenden Gene *lysA* und *lysB* in P2 (42).

D.2. Vergleichende Phagengenomik

D.2.1. Southern-"Screening" verschiedener *V. cholerae* Isolate

Um das Vorkommen von K139 oder nahe verwandter Phagen innerhalb der Species *V. cholerae* zu untersuchen, wurden 43 Isolate verschiedener Serogruppen unterschiedlichster Herkunft mit Hilfe von Southern Hybridisierungen getestet (Tab. D.4). Die isolierte chromosomale DNA wurde dazu mit *HindIII* verdaut und mit K139 Gesamt-DNA als Sonde hybridisiert.

Stamm	Serogruppe	K139 pos.	Stamm	Serogruppe	K139 pos.
10259	O53	-	Ch780	Nicht-O1/O139	-
1528-89	Nicht-O1/O139	-	Ch821	Nicht-O1/O139	-
170/998	O38	-	Ch83	Nicht-O1/O139	-
2559-78	O1	-	Ch84	Nicht-O1/O139	-
3223-74	O1	-	CLP-1	O36	-
A2-2	Nicht-O1/O139	-	CO966	O1 El Tor Ogawa	-
ATCC25872	Nicht-O1/O139	-	CO968	O1 El Tor Ogawa	-
B2-2	O41	-	CO970	O1 El Tor Ogawa	-
B2-3	Nicht-O1/O139	-	E8498	O141	+
Ch154	Nicht-O1/O139	-	F1873	O1 El Tor Inaba	+
Ch18001	Nicht-O1/O139	-	F1875	O1 El Tor Inaba	+
Ch18022	Nicht-O1/O139	-	M654	O1 El Tor	-
Ch18117/I	Nicht-O1/O139	-	M799	O1 El Tor	+
Ch18133	Nicht-O1/O139	-	M804	O1 El Tor	+
Ch187	Nicht-O1/O139	-	M807	O1 El Tor	+
Ch309	Nicht-O1/O139	-	M817	O1 El Tor	+
Ch359	Nicht-O1/O139	-	MO3	O139	+
Ch430	Nicht-O1/O139	-	O103	O154	-
Ch433	Nicht-O1/O139	-	O83	O6	-
Ch457	Nicht-O1/O139	+	OA2-3	O5	-
Ch757	Nicht-O1/O139	-	V52	O37	-
Ch762	Nicht-O1/O139	-			

Tab. D.4: K139-positive *V. cholerae* Stämme. Die Isolate sind sowohl unterschiedlicher zeitlicher als auch räumlicher Herkunft (vgl. Tab. C.2) und wurden mit K139 DNA als Sonde im Southern Blot durchgetestet. Die Klassifizierung der Serogruppe als Nicht-O1/O139 bedeutet, daß die entsprechenden Stämme bisher keiner Serogruppe zugeordnet werden konnten, jedoch nicht mit O1- und O139-Antisera agglutinieren.

Nimmt man die von Reidl und Mekalanos (123) untersuchten Stämme mit hinzu, so kommt man auf die in Tab. D.5 dargestellte Verbreitung von K139 oder verwandten Phagensequenzen in verschiedenen *V. cholerae* Stämmen.

Serogruppe	Untersuchte Stämme	Positive Stämme	Anteil (%)
O1	19	9	47%
O139	8	4	50%
Nicht-O1/O139	30	2	7%

Tab. D.5: Vorkommen von K139 oder verwandten Phagensequenzen in verschiedenen *V. cholerae* Serogruppen.

Das Southern-"Screening" zeigte außerdem das Vorhandensein von vier unterschiedlichen Hybridisierungsmustern von K139 mit verschiedenen *V. cholerae* Stämmen.

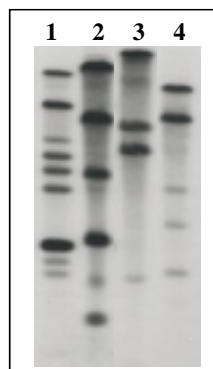


Abb. D.9: Restriktions-Polymorphismus von K139-verwandten Phagensequenzen im Southern Blot von verschiedenen *Hind*III-verdauten *V. cholerae* Stämmen. 1: In O139 und O1 El Tor Stämmen; 2: Im O1 klassischen Stamm O395; 3: Im Nicht-O1/O139 Stamm Ch457; 4: Im O141 Stamm E8498.

Typ 1 ist in O1 El Tor und O139 Stämmen zu finden, Typ 2 im O1 klassischen Stamm O395, Typ 3 im Nicht-O1/O139 Stamm Ch457 und schließlich Typ 4 im O141 Stamm E8498 (Abb. D.9).

D.2.2. Überblick über die Organisation der K139-verwandten Phagensequenzen

D.2.2.1. Southern Blot mit K139-Gencluster Sonden

Um einen ersten Überblick über die Zusammensetzung dieser Phagensequenzen im Vergleich zu K139 zu erhalten, wurden wiederum Southern Hybridisierungen mit *Hind*III-verdauter chromosomaler DNA durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde der nicht-lysogene Stamm MAK757 benutzt, als Positiv-Kontrolle der gleiche Stamm mit K139 lysogenisiert. Elf verschiedene PCR Fragmente, die das gesamte K139 Genom abdeckten und verschiedenen funktionellen Gengruppen entsprachen, dienten als Sonde. Abb. D.10 zeigt das Ergebnis dieser Hybridisierungen.

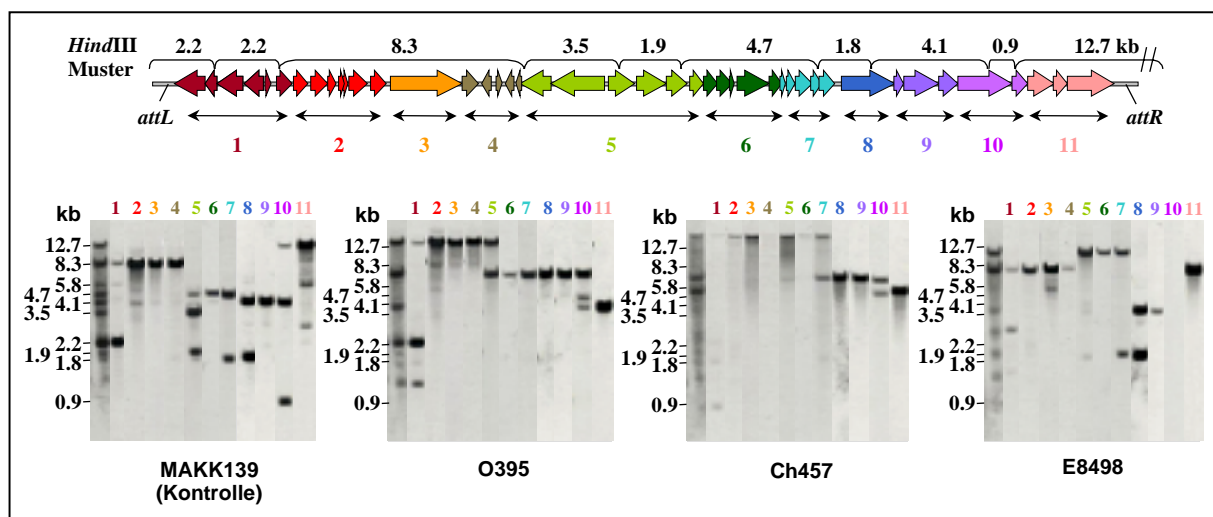


Abb. D.10: Hybridisierung der K139-verwandten Phagensequenzen mit K139-Gencluster Sonden. Im oberen Teil skizziert ist das K139 Genom mit der Fragmentgröße der *Hind*III-verdauten DNA. Unter dem Genom sind die als Sonde benutzten PCR-Fragmente (1-11) eingezeichnet, die Nummern über den Blots symbolisieren die Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde. In der ersten, nicht nummerierten Spalte wurde K139 GesamtdNA als Sonde verwendet. Als Größenvergleich sind die Fragmentgrößen der *Hind*III-verdauten K139 DNA angegeben. 1: Lysogenes Operon und Kontroll-Region (*int-cII*); 2: Frühes lytisches Operon, Methylierung (*orf3-9*); 3: Replikation (*rep*); 4: Späte Regulation (*orf10-14*); 5: Kapsid (*orf15-20*); 6: Schwanz-Region 1 (*orf21-25*); 7: Zell-Lyse (*orf26-30*); 8: Schwanz-Region 2 (*orf31*); 9: Schwanz-Region 3 (*orf32-34*); 10: Schwanzfaser (*orf35-36*); 11: Schwanz-Region 4 (*orf37-39*).

Fast alle Sonden ergaben ein positives Hybridisierungssignal. Der O1 klassische Stamm O395 hybridisierte mit allen Sonden vergleichbar stark wie die Positivkontrolle. Auch der O141 Stamm E8498 ergab vergleichbare Signale, mit Ausnahme der schwachen Hybridisierung mit den Sonden 1 (lysogenes Operon und Kontroll-Region), 4 (späte Regulation) und evtl. 9 (Schwanz-Region 3) und dem fehlenden Signal mit Sonde 10 (Schwanzfaser). Der Stamm Ch457 schließlich hybridisiert nur ab Schwanz-Region 2 vergleichbar mit der Kontrolle, die übrigen Sonden hybridisieren wesentlich schwächer, nur

sehr schwach ist die Hybridisierung mit den Sonden 1 (lysogenes Operon und Kontroll-Region), 4 (späte Regulation) und 6 (Schwanz-Region 1). Der als Negativ-Kontrolle dienende nicht-lysogene Stamm MAK757 zeigte mit keiner der Sonden eine Hybridisierung (nicht dargestellt).

D.2.2.2. Analyse der Phagen-Sequenzen mittels PCR

Zur näheren Charakterisierung der Phagen-Sequenzen wurden PCRs mit Primern durchgeführt, die von der K139 Sequenz abgeleitet wurden. Als Template für die PCR diente chromosomale DNA der verschiedenen Stämme, da Versuche zur Isolierung von Phagen-DNA fehlschlugen. In der folgenden Tabelle sind die Primer dargestellt, mit denen der größte Teil des Phagen-genoms durchgetestet werden konnte.

Primerpaar	Genomregion bei K139	MAKK139	O395	Ch457	E8498
GSP1glo – PromL	<i>glo - cox</i>	1.9	+	+	
GSP3ci – cII	<i>ci - cII</i>	1.4	+	+	+
Glo <i>Pst</i> I – Glo <i>Nco</i> I	<i>glo (int 5' - glo 5')</i>	0.4	+	+	+
orf2 <i>Hind</i> III – orf2 <i>Af</i> III	<i>orf2</i>	0.9	+	+	+
ci <i>Sal</i> I – ci <i>Af</i> III	<i>ci</i>	0.7	+		+
orf8 5' <i>Bsp</i> HI – orf8 3' <i>Sal</i> II	<i>orf8</i>	0.6	+	+	+
orf3 – orf9	<i>orf3 - orf9</i>	3.1	+	+	(+)
rep5' – rep3'	<i>rep</i>	2.3	+	+	+
K139seq1 – K30-2-2	<i>rep - orf15</i>	3.4	5.0	3.0	3.5
rev6 – rev10	<i>orf15 -orf16</i>	2.4	+	+	+
PromLate – orf20	<i>orf16 - orf20</i>	3.4	+	+	+
rev18 – orf25	<i>orf20 - orf25</i>	2.7	+	+	+
orf26 –orf31 3'	<i>orf26 - orf31</i>	3.7	+	+	+
orf32 – mwg32	<i>orf32 - orf35</i>	2.6	+	+	
orf32 – orf39	<i>orf32 - orf39</i>	7.5			+
K915 – fiber3'	<i>orf34 - orf35</i>	1.9	+	+	+
orf35middle – orf36	<i>orf35 - orf36</i>	1.6	+	+	+
orf37 – orf39	<i>orf37 - orf39</i>	2.9	+	+	+

Tab. D.6: PCR-Primer und Größe der damit produzierten PCR-Fragmente in den *V. cholerae* Stämmen MAKK139, O395, Ch457 und E8498. "+" bedeutet vergleichbare Fragmentgrößen wie K139, verschiedene Fragmentgrößen sind angegeben.

In der folgenden Graphik sind zur Veranschaulichung einige der amplifizierten PCR-Fragmente dargestellt.

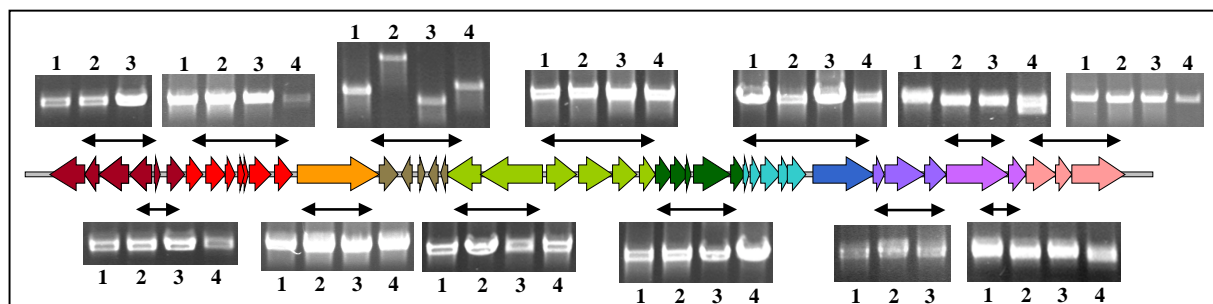


Abb. D.11: PCR-Fragmente der Phagensequenzen aus den Stämmen MAKK139 (1), O395 (2), Ch457 (3) und E8498 (4). Zur Orientierung ist die Lage der PCR-Fragmente im Vergleich zur K139 Genomsequenz dargestellt. Die Farbe der Pfeile entspricht dabei den Genbereichen, die als Sonde bei der Hybridisierung gedient haben (Abb. D.10).

Die größten Probleme bei der Herstellung von PCR-Produkten ergaben sich für den E8498 Stamm hauptsächlich in der frühen Region bis zum *rep* Gen. Es konnten entweder nur sehr schwache oder gar keine Banden amplifiziert werden. Doch konnten zumindest einige der wichtigen Gene dieser Region durch PCR nachgewiesen werden, wie *int*, *glo*, *orf2*, *cI* und *orf8*. Der auffallendste Unterschied bestand in der Region zwischen dem *rep* Gen und dem ersten Gen des Kapsid-Genclusters *orf15*. Trotz fehlender Hybridisierung der Sonde 10 mit der E8498-Sequenz konnten PCR-Produkte in diesem Bereich hergestellt werden.

D.2.3. Sequenzierung ausgewählter Genombereiche

Für die Sequenzierung wurden zwei Genbereiche ausgesucht. Aufgrund der auffallenden Größenunterschiede wurde der K139-Genombereich zwischen den Genen *rep* und *orf15* ausgewählt. Das Schwanzfaser und des Schwanzfaser-"Assembly" Gen dagegen wurden trotz vergleichbarer PCR-Fragmentgrößen aufgrund vermuteter wirtsspezifischer Unterschiede gewählt. Die Präsenz der Phagensequenzen in z.T. unterschiedlichen Serogruppen (O1, O141, Nicht-O1/O139) legt diese Vermutung nahe, da das LPS als der Phagenrezeptor für den K139 Phagen nachgewiesen wurde (108) und die Schwanzfaser bei anderen Phagen an der Rezeptorbindung beteiligt ist (57).

D.2.3.1. Genomregion *rep* bis *orf15*

Die durch PCR generierten *rep-orf15* Fragmente wurden in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und sequenziert. Die entsprechende Genregion von K139 enthält fünf Gene, *orf10* bis *orf15* (Abb. D.12).

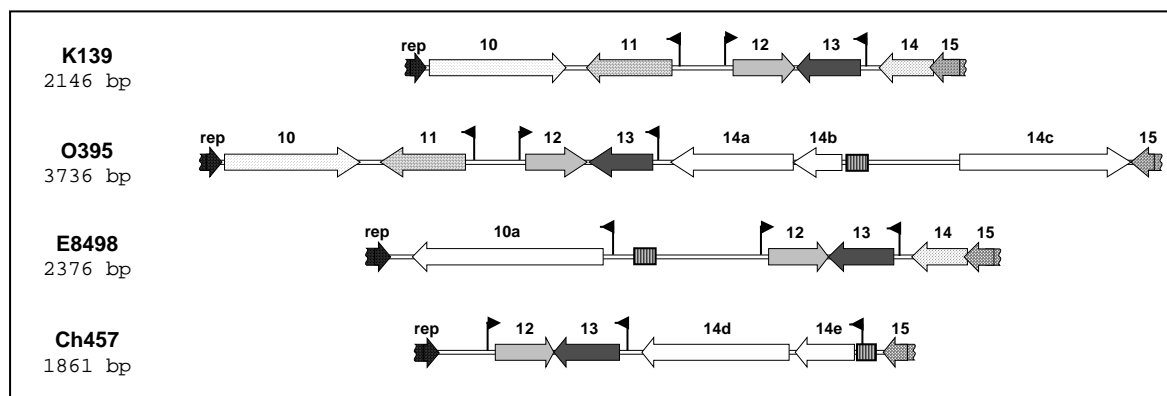


Abb. D.12: Sequenzierte PCR-Fragmente der Phagensequenzen aus K139, O395, Ch457 und E8498. Die Sequenzen entsprechen der K139-Region *rep* bis *orf15*. Gleiche Farbe oder Musterung der Pfeile steht für eine Homologie der entsprechenden ORFs, weiße Pfeile dagegen symbolisiert fehlende Homologie untereinander. Die schraffierte Box entspricht einer kurzen Sequenz mit 84% Homologie auf Nukleotid-Ebene zwischen den Stämmen O395, Ch457 und E8498. Putative Promotoren sind durch die Flaggen gekennzeichnet.

Nur zwei der Gene, *orf12* und *orf13*, sind in allen vier Phagensequenzen vorhanden. Orf13 ist der vermutliche Aktivator der späten Operone, während Orf12 keine Homologien

zur Datenbank aufweist. Die Sequenz von *orf10* bis *orf13* ist in O395 und K139 zu 98% identisch (Tab. G.2). Anstelle von *orf14* ist in O395 eine ca. 1.8 kb Sequenz vorhanden, die mindestens drei ORFs enthält. Orf14a zeigt Homologie zu putativen ORFs von *E. coli* und *Synechocystis spec.*, Orf14b zeigt keine und Orf14c zeigt Homologie zu putativen ORFs von *Y. pestis* und dem Phagen APSE-1. Ch457 besitzt mit ca. 1.9 kb Gesamtlänge die kleinste Genomsequenz in diesem Bereich. *orf12* und *orf13* liegen hier direkt neben dem *rep* Gen, rechts davon werden noch zwei ORFs kodiert, von denen nur Orf14d Ähnlichkeit zu putativen ORFs von *Methanosarcina mazei* und *Ralstonia solanacearum* aufweist. Die Sequenz von E8498 dagegen ist im Bereich von *orf13* und *orf14* auf DNA Ebene mit 96% homolog zu K139, während zwischen dem *rep* Gen und *orf12* eine völlig andere Sequenz vorzufinden ist. Diese Sequenz kodiert vermutlich nur einen ORF, Orf10a, der keinerlei Homologie zur Datenbank aufweist.

Betrachtet man sich die Sequenzen etwas näher, um Aufschluß über die evolutive Geschichte dieser Phagen zu erhalten, so ergibt sich ein interessantes Bild. Obwohl, wie schon erwähnt, *orf12* und *orf13* in allen vier Stämmen vorhanden sind, können zwei verschiedene Typen unterschieden werden, der K139/O395-Typ und der Ch457/E8498-Typ. Im Vergleich zueinander weisen beide Typen nur 48-50% Homologie auf, während innerhalb jedes Typs 97% Identität besteht (Tab. D.7). Dieselbe Gruppierung ist beim Vergleich der Orf13 Sequenz zu beobachten, obwohl hier die Unterschiede wesentlich geringer ausfallen.

Orf12 Orf13	K139	O395	Ch457	E8498
K139		97	50	50
O395	98		48	48
Ch457	92	91		97
E8498	93	92	95	

Tab. D.7: % Identität von Orf12 und Orf13 Sequenzen im Blast2 Vergleich.

Interessant ist, daß sich die Homologien zwischen den Nukleotidsequenzen von *orf12* und *orf13* nicht nur über den Bereich der kodierenden Sequenz erstrecken, sondern etwas mehr als 100 bp stromaufwärts darüberhinaus. In diesen Bereichen konnten Promotoren des *E. coli* σ^{70} Typs identifiziert werden.

Promotor	Lage	-35 —N— -10	Homologie zu <i>E. coli</i> σ^{70}
Ch457 P ₁₂	248-276	TAGAAA - N ₁₇ - TATATT	67%
Ch457 P ₁₃	830-802	TACAAA - N ₁₇ - TATGAT	51%
Ch457 P _{14e}	1699-1671	TCAACC - N ₁₇ - TATGAT	54%
O395 P ₁₁	1073-1042	TTGGCA - N ₂₀ - CATATT	50%
O395 P ₁₂	1203-1231	TTGAGA - N ₁₇ - TAATAT	72%
O395 P ₁₃	1820-1792	TACAAA - N ₁₇ - TATGAT	51%
O395 P _{14b}	2608-2581	TTGTTT - N ₁₆ - TATATT	56%
O395 P _{14c}	2925-2953	TTGAGT - N ₁₇ - TACTCT	41%

E8498 P _{10a}	959-931	TTGACA - N ₁₆ - AGTTAT	49%
E8498 P ₁₂	1470-1499	TAGAAA - N ₁₇ - TATATT	67%
E8498 P ₁₃	2050-2022	TACAAA - N ₁₇ - TATGAT	51%

Tab. D.8: Putative Promotoren der K139-verwandten Phagensequenzen.

Eine weitere bemerkenswerte Entdeckung ist das Vorhandensein einer kurzen (89-130 bp), zu 84% homologen Sequenz in Ch457, E8498 und O395 inmitten eines ansonsten nicht-homologen Bereiches (Abb. D.12, schraffierte Box). Es scheint sich um keine kodierende Region zu handeln, da bei einem Vergleich der Leseraster kein durchgehender ORF in allen drei Phagensequenzen gefunden wurde.

D.2.3.2. Schwanzfasergene

Die dem Genombereich *orf35* bis *orf36* entsprechende Region der K139-verwandten Phagensequenzen wurde über PCR amplifiziert und das PCR-Produkt nach Aufreinigung direkt für die Sequenzierung eingesetzt. Die Analyse der putativen Schwanzfasergene *orf35* ergab dabei eine deutlich mosaikartige Struktur, wie es auch bei anderen Phagen beschrieben wurde (57). Für die verschiedenen Schwanzfaser-Proteine konnten zwei konservierte (C1 und C2) und zwei variable (V1 und V2) Bereiche unterschieden werden (Tab. D.9, Abb. D.13).

C1 C2	K139	O395	Ch457	E8498	V1 V2	K139	O395	Ch457	E8498
O395	96		94	94	O395	94		28	28
Ch457	98	97		96	Ch457	27	-		42
E8498	100	96	98		E8498	100	94	27	

Tab. D.9: % Identitäten der konservierten Regionen C1 und C2 und der variablen Regionen V1 und V2 der Schwanzfasergene im Blast2 Vergleich.

Die C1 Region erstreckt sich über fast die ganze N-terminale Hälfte der Proteine, während die C2 Region zwischen der im Anschluß an die C1 Region gelegenen V1 und der C-terminalen V2 Region lokalisiert ist. Die Kombination dieser variablen Regionen bestimmt die Einteilung in drei Protein-Typen (Abb. D.13). Typ 1 ist in Stämmen der Serogruppe O1 El Tor, O139 und im O141 Stamm E8498 zu finden, Typ 2 im O1 klassischen Stamm O395 und Typ 3 im Nicht-O1/O139 Stamm Ch457. Bei einem Blast-Vergleich mit der Datenbank wurde außerdem ein Fragment aus dem O1 klassischen Stamm Z17561 identifiziert (Accession No. AJ231114), das dem Ende der Region C1 und dem größten Teil von V1 entspricht. Derselbe Stamm besitzt außerdem eine Sequenz mit Homologie zu Orf16 von K139 (siehe Kap. D.1.3.4), so daß es sich hierbei wahrscheinlich um fragmentarisch sequenzierte Bereiche eines zu K139 verwandten Phagen handelt.

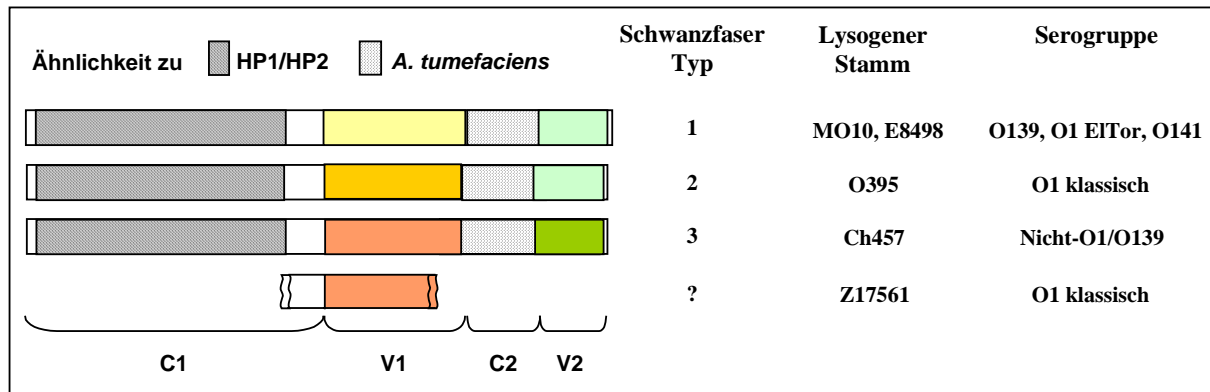


Abb. D.13: Schematische Darstellung der Schwanzfaser Typen der Phagen der K139 Gruppe. Die gemusterten Bereiche entsprechen den homologen Regionen zu HP1/HP2 bzw. *A. tumefaciens*. C1/C2 steht für konservierte Region 1 bzw. 2, V1/2 für variable Region 1/2. Gleiche Farbe steht für $\geq 80\%$ Homologie, verschiedene Farbe für $\leq 42\%$ Homologie. Größe und Vorkommen der verschiedenen Schwanzfaser Typen sind mit angegeben.

Obwohl der K139 Phage in Stämmen der O139 Serogruppe lysogen vorliegt, kann er diese nicht infizieren (123). Wie anhand von LPS-Bindungsstudien durch Plaque-Inhibitions-Assays gezeigt werden konnte, kann der K139 Phage nicht an O139 LPS binden (108). Da der im O141 Stamm E8498 lysogen vorliegende Phage denselben Schwanzfaser-Typ aufweist wie K139, wurden entsprechende Plaque-Inhibitionsassays mit gereinigtem O141 LPS durchgeführt (Abb. D.14). Die Konzentration des O141 LPS wurde auf silbergefärbten PAA-Gelen mit einer definierten Menge des O1 Inaba LPS verglichen um sicherzustellen, daß genug LPS zur Inhibierung vorhanden ist. Für den Versuch wurde dann O141 LPS über ein breites Konzentrations-Spektrum zugegeben.

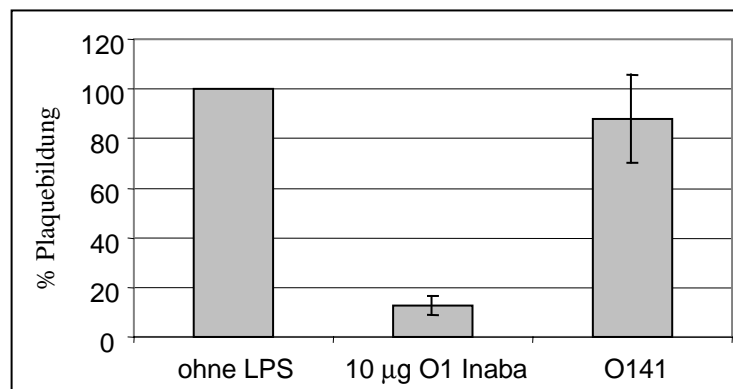


Abb. D.14: Plaque-Inhibitions-Assay mit gereinigtem O141 LPS. Das K139.cm9 Phagenlysat wurde auf 10^4 pfu/ml verdünnt und 1 Std. mit verschiedenen Konzentrationen an LPS inkubiert. Der 100% Wert wurde von einem ohne LPS inkubierten Ansatz bestimmt. Definierte Mengen des O1 Inaba LPS, die in einer früheren Inaktivierungskurve (108) ermittelt wurden, dienen als Positiv-Kontrolle.

Wie der Abb. D.14 zu entnehmen ist, kann der K139 Phage nicht an O141 LPS des Stammes E8498 interagieren. Da K139 den gleichen Schwanzfaser-Typ aufweist wie der residente E8498 Phage (100% Identität, siehe Tab. G.2), würde das dafür sprechen, daß der im O141 Stamm vorliegende Phage nicht an das LPS seines Wirtes binden kann.

Während die Schwanzfaser Proteine in Bezug auf ihr Homologie-Muster eine mosaikartige Struktur aufweisen, zeigen die Schwanzfaser-"Assembly" Proteine eine gleichmäßig hohe Homologie untereinander über die gesamte Sequenz auf (Tab. D.10).

Orf36	K139	O395	Ch457
O395	90		
Ch457	91	87	
E8498	99	90	91

Tab. D.10: % Identität zwischen den putativen Schwanzfaser-"Assembly" Proteinen Orf36 der K139-verwandten Phagensequenzen.

D.3. Experimentelle Überprüfung von Genfunktionen

D.3.1. MALDI-TOF Analyse mit gereinigten Phagenpartikeln

Zur Identifizierung der Proteine, die an der Bildung des Phagenpartikels beteiligt sind, wurden die Phagenpartikel in einem CsCl-Gradienten aufgereinigt, in einem 2D-SDS-Gel aufgetrennt und die einzelnen Spots über MALDI-TOF analysiert. Die 2D-SDS-Gelelektrophorese und die MALDI-TOF Untersuchung wurden von Stefan Evers von Hoffman LaRoche (Basel, Schweiz) durchgeführt. Für die Analyse wurden zwei verschiedene CsCl-Fraktionen ausgewählt, die sich in ihrem Proteingehalt bei Überprüfung in einem Standard SDS-Gel unterschieden hatten. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. D.15 zu sehen.

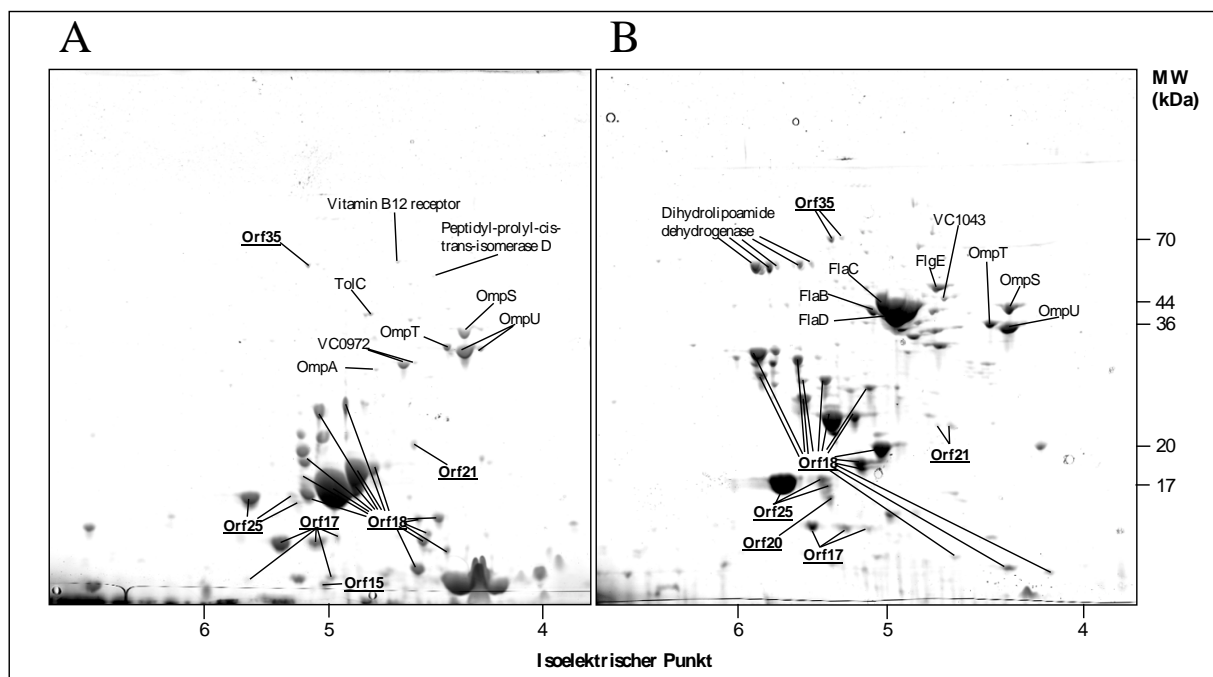


Abb. D.15: 2D-SDS Gele CsCl-gereinigter Phagenpartikel und Identifizierung der Proteinspots über MALDI-TOF. Es wurden zwei verschiedene CsCl-Fraktionen analysiert (A und B).

Die putativen Kapsid-Proteine Orf15 (Kapsid-Portal Protein), Orf17 (Kapsid-Gerüst Protein), Orf18 (Haupt-Kapsidprotein) und Orf20 (Kapsid "Completion" Protein) konnten identifiziert werden. Das putative Haupt-Kapsidprotein ist außerdem tatsächlich das häufigste Phagenproteine, was ebenfalls für die Richtigkeit der funktionellen Zuordnung spricht. Von den putativen Schwanz-Proteinen konnten Orf21 (Homologie nur zu uncharakterisiertem HP1 Protein), Orf25 (Schwanzröhren Protein) und Orf35 (Schwanzfaser) einem Proteinspot zugeordnet werden.

D.3.2. Methylase

Bei der bioinformatischen Auswertung hatten sich bereits Hinweise auf eine Methylasefunktion von Orf8 ergeben (Kap. D.1.3.3). Um dies nun auch experimentell zu überprüfen, wurde das *orf8* Gen in das Überexpressionsplasmid pTrc99Akan kloniert. Dieses Plasmid und das Kontrollplasmid pTrc99Akan alleine wurden dann in den *dam⁻dcm⁻* *E. coli* Stamm GM2163 transformiert, um eine Überlagerung des *orf8* Phänotyps durch die bakteriellen Methylasen zu vermeiden. Nun wurde sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNA aus beiden Stämmen isoliert und ihre Sensitivität gegenüber ausgewählten Restriktionsenzymen getestet (Abb. D.16).

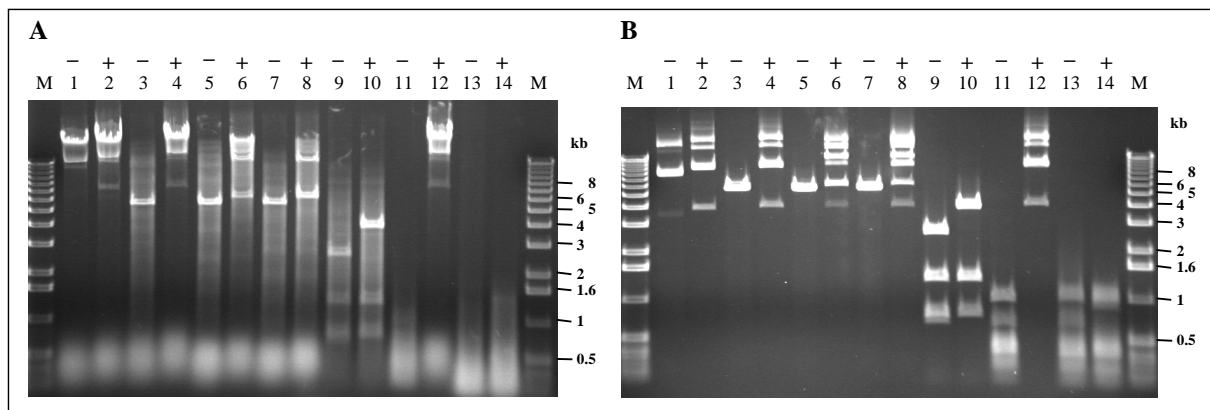


Abb. D.16: Restriktionsverdau von DNA aus dem Orf8-überexprimierenden Stamm GM2163pTrc99Akanorf8 (+) und aus dem Kontrollstamm GM2163pTrc99Akan (-). **Bild A** zeigt den Verdau der chromosomalen DNA; **Bild B** den Verdau der Plasmid-DNA. M: Marker; Spur 1 und 2: unverdaut; Spur 3 und 4: *BclI*; Spur 5 und 6: *ClaI*; Spur 7 und 8: *EcoRV*; Spur 9 und 10: *BstYI*; Spur 11 und 12: *MboI*; Spur 13 und 14: *Sau3A*.

Tab. D.11 zeigt die theoretischen Fragmentgrößen, die bei vollständiger Restriktion der Plasmid-DNA zu erwarten wären.

Restriktions-enzym	Theoretische Fragmentgröße		Restriktion	Erkennungssequenz des Enzyms
	pTrc99Akan	pTrc99Akanorf8		
<i>BclI</i>	5.5 kb	4.8 kb, 1.3 kb	-	TGATCA
<i>ClaI</i>	5.5 kb	6.1 kb	+/-	ATCGAT
<i>EcoRV</i>	5.5 kb	6.1 kb	+/-	GATATC
<i>BstYI</i>	2.6 kb, 1.3 kb, 2 x 0.7 kb	3.9 kb, 1.3 kb, 0.7 kb	+	(A/G)GATC(C/T)
<i>MboI</i>	26 Schnittstellen	28 Schnittstellen	-	GATC
<i>Sau3A</i>	26 Schnittstellen	28 Schnittstellen	+	GATC

Tab. D.11: Theoretische Fragmentgrößen und tatsächliche Restriktion von Orf8-überexprimierendem Plasmid und Kontrollplasmid durch verschiedene Restriktionsenzyme.

Für die Restriktionsenzyme *BclI* (TGATC) und *MboI* (GATC), die sensitiv gegenüber Adenin-Methylierung in ihrer Erkennungssequenz sind (97), wurde eine vollständige Inhibition festgestellt. Für *Sau3A*, das ein Methylase-resistentes Isoschizomer von *MboI* ist, sowie für das ebenfalls Methylase-resistente *BstYI* (A/G GATC C/T) konnte keine Inhibition beobachtet werden. Vergleicht man die spezifischen Erkennungssequenzen der sensitiven Enzyme, so läßt sich die Basenabfolge 5'-GATC-3' als gemeinsame Sequenz feststellen, die als spezifische Methylierungs-Sequenz für Orf8 in Frage kommt. Eine partielle Inhibition konnte für die Enzyme *ClaI* (ATCGAT) und *EcoRV* (GATATC) nachgewiesen werden. Demzufolge müßten auch nicht-kanonische Sequenzen methyliert werden, allerdings offensichtlich mit geringerer Effizienz. Bei der ebenfalls 5'-GATC-3' spezifischen T4 Methylase konnte gezeigt werden, daß bei hohen Enzymkonzentrationen auch 5'-GAT-3' und 5'-GAC-3' Sequenzen methyliert werden (79). Die Expression von Orf8 im pTrc99Akan-Vektorsystem hat wohl auch in diesem Fall eine hohe Enzymkonzentration in den Zellen zur Folge, so daß sich ein ähnlicher Effekt ergeben könnte.

D.3.3. Orf2

Im Lysogenie-Operon von K139 sind zwei Proteine kodiert (Glo und Orf2), die keine Homologie zu bisher bekannten Proteinen in der Datenbank aufweisen. Dem Glo-Protein konnte bereits von Nesper et al. eine Exklusionsfunktion für superinfizierende Phagen zugeschrieben werden (107). Um nun auch die Funktion des Orf2-Proteins zu ermitteln, wurden die folgenden Untersuchungen angestellt.

D.3.3.1. Phänotyp Orf2-überexprimierender Zellen

Das *orf2* Gen wurde in das IPTG-induzierbare Überexpressionsplasmid pTrc99Akan kloniert. Dabei mußte, wie bereits in Kap. C.6.6.3 beschrieben, ein Basenaustausch erfolgen, der zu einem AS-Austausch von Threonin zu Serin führt. Da beide AS vergleichbare Eigenschaften haben, dürfte dieser Austausch allerdings keinen großen Effekt auf die Aktivität von Orf2 zur Folge haben.

Spontanphagentiter des Orf2-überexprimierenden Stammes MAK757K139:

Das Plasmid pTrc99Akanorf2 und das Kontrollplasmid pTrc99Akan wurden in den K139-lysogenen Stamm MAK757K139 transformiert, um den Einfluß von Orf2 auf den Spontan-Phagentiter der Stämme mit und ohne IPTG-Induktion zu bestimmen (Abb. D.17).

Es konnten keine Unterschiede in der Zahl der pfu/ml zwischen den Stämmen mit und ohne *orf2*-Expression festgestellt werden. Die durchschnittliche Zahl der pfu/ml ist bei

Induktion von *orf2* zwar etwas größer als ohne Induktion bzw. im Kontrollplasmid (ca. 140%), zeigt aber auch eine höhere Standardabweichung.

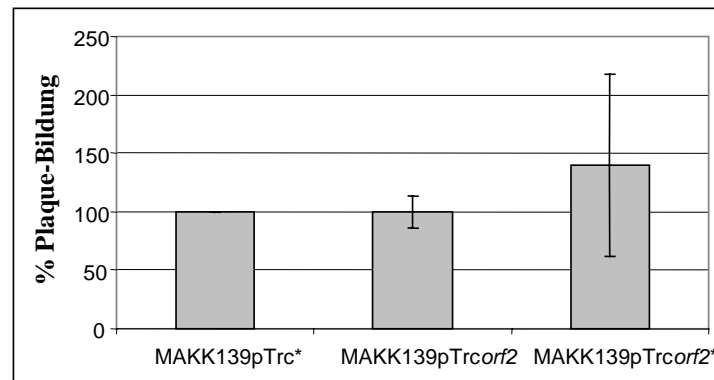


Abb. D.17: Spontan-Phagentiter einer ÜNK von MAKK139 mit dem Kontrollplasmid pTrc99Akan und mit dem Orf2-exprimierendem Plasmid pTrc99Akanorf2 ($n = 3$). Als Indikatorstamm diente der nicht-lysogene Stamm MAK757. Die mit Stern (*) markierten Stämme wurden mit 1 mM IPTG in der ÜNK angezogen. Der 100%-Wert entspricht $1.8 \cdot 10^6$ pfu/ml.

Plaque-Bildung von K139.cm9 auf MAK757pTrc99kanorf2:

Weiterhin wurde die Plaque-Bildung der lytischen Mutante K139.cm9 auf den Orf2-überexprimierenden Stamm MAK757pTrc99Akanorf2 im Vergleich zum Kontroll-Stamm MAK757pTrc99Akan untersucht. Dazu wurde ein hochtitriges Phagenlysat von K139.cm9 hergestellt und der Phagentiter in einem Plaque-Assay ermittelt.

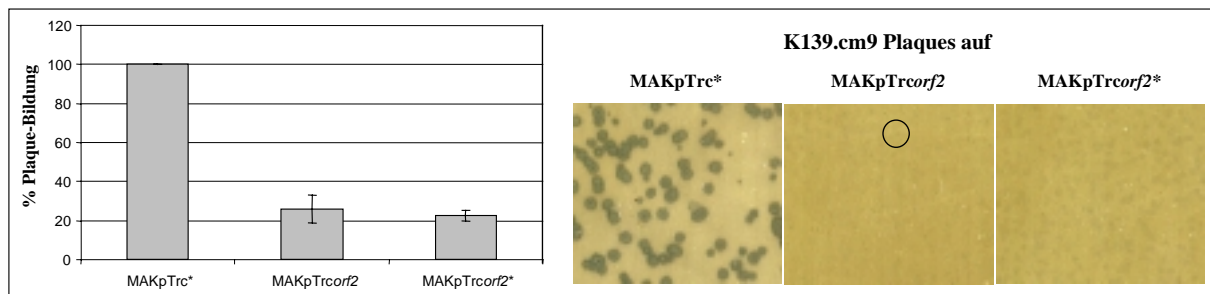


Abb. D.18: Plaque-Bildung und Plaque-Morphologie von K139.cm9 auf dem Orf2-überexprimierenden Stamm MAKpTrc99Akanorf2 und auf dem Kontrollstamm MAKpTrc99Akan ($n = 3$). Bei den mit Stern markierten Stämmen wurde 1 mM IPTG in den Top-Agar mit eingegossen.

Die Zahl der Plaques ist bei den Orf2-überexprimierenden Stämmen auch ohne Induktion des *trc*-Promotors mit IPTG wesentlich verringert. Zur Verdeutlichung des Effektes wurde die Plaque-Bildung in Prozent angegeben, der 100%-Wert entspricht $1.6 \cdot 10^8$ pfu/ml. Doch nicht nur die Zahl der Plaques ist durch die Orf2-Überexpression verringert, die Plaques der hochlytischen Mutante werden auch kleiner und trüber.

D.3.3.2. Phänotyp der *orf2*-Deletionsmutante

Um einen definierten Orf2-Knockout Phänotyp zu erhalten, wurde der größte Teil des *orf2* Gens durch die in Kap. C.6.6.4 beschriebene Methode deletiert. Die Deletion wurde über PCR und Southern-Blot überprüft und von den gesuchten Mutanten wurde dann der Spontan-Phagentiter einer ÜNK bestimmt (Abb. D.19).

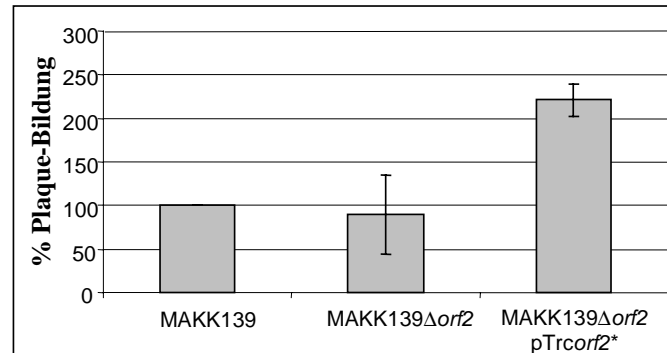


Abb. D.19: Spontan-Phagentiter der *orf2*-Deletionsmutante K139 Δ *orf2* und der Komplementante im Vergleich zum Wildtyp K139 (n = 3). Der 100%-Wert entspricht $1.4 \cdot 10^6$ pfu/ml. Als Indikatorstamm diente wiederum MAK757.

Während sich der Spontan-Phagentiter von Wildtyp und Orf2-Mutante nicht unterscheiden, steigt der Titer der Komplementante MAKK139 Δ *orf2*pTr*corf2* auf etwas über das Doppelte des Wildtyp-Phagen. Von der Plaque-Morphologie her sind die *orf2*-Deletionsmutante und der Wildtyp nicht zu unterscheiden, die Trübung der Plaques ist vergleichbar hoch.

D.3.3.3. Aufreinigung von Orf2

Um die Funktion des im Lysogenie-Operon zwischen dem lytischen Repressor *cI* und dem Exklusions-Gen *glo* kodierten *orf2* zu ermitteln, wurde das Gen in den mit Anhydrotetrazyklin induzierbaren Expressionsvektor pASK75 kloniert und aufgereinigt. Zuerst wurde eine grobe Aufreinigung über einen Anionenaustauscher durchgeführt. Da Orf2 im Blast-Vergleich sehr schwache Ähnlichkeit zu DNA-bindenden Proteinen aufweist, wurde anschließend eine chromatographische Aufreinigung über eine Heparinsäule gewählt, da Heparin eine Affinität für DNA-Bindeproteine besitzt. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in Abb. D.20 zu sehen. Während nach Aufreinigung über die Anionenaustauscher-Säule vor allem noch viele Proteine über 40 kDa MW in der Fraktion vorhanden waren, konnte durch die Heparin-Affinitätschromatographie eine vollständige Aufreinigung von Orf2 erzielt werden.

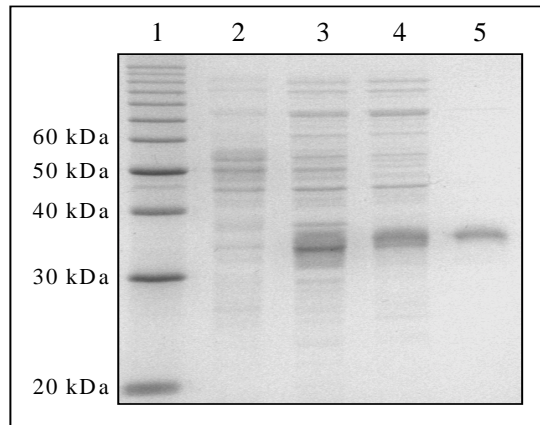


Abb. D.20: SDS-PAGE von Gesamtzell-Extrakten des Kontroll-Stammes LE392pASK75 und des Stammes LE392pASK75orf2 nach verschiedenen Aufreinigungsschritten. Spur 1: Marker; Spur 2: Gesamtzell-Extrakt des Kontroll-Stammes; Spur 3: Gesamtzell-Extrakt des Orf2-überexprimierenden Stammes; Spur 4: Orf2-enthaltende Fraktion nach Anionenaustausch-Chromatographie; Spur 5: Orf2-enthaltende Fraktion nach Heparin-Affinitätschromatographie. Das theoretische MW von Orf2 beträgt 34 kDa (Tab. G.1).

D.3.3.4. Lokalisation von Orf2

Mit spezifischen Anti-Orf2 Antikörpern (Kaninchen-Serum gewonnen nach Impfung mit gereinigtem Orf2, Biotrend) konnte Orf2 im Cytoplasma von K139-lysogenen Zellen nachgewiesen werden (Abb. D.21).

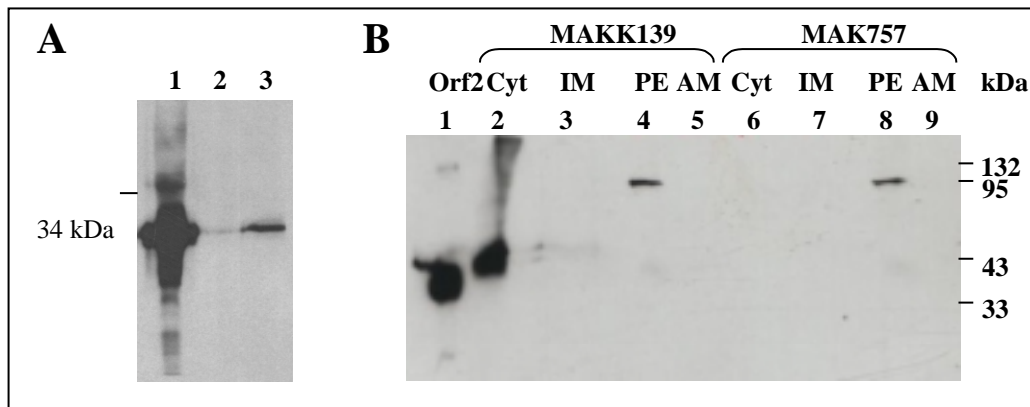


Abb. D.21: Lokalisation von Orf2 durch Western-Blot mit Anti-Orf2 Antikörpern. **A:** Western Blot mit (1) gereinigtem Orf2, (2) Gesamtzell-Extrakt aus MAK757, (3) Gesamtzell-Extrakt aus MAKK139. **B:** Western-Blot mit Cytoplasma-Extrakt (Cyt), Innenmembran-Extrakt (IM), Periplasma-Extrakt (PE) und Außenmembran-Extrakt (AM). (1) Gesamtzell-Extrakt aus dem Orf2-überexprimierenden Stamm MAKpTrc99Akanorf2; (2-5) Extrakte aus dem lysogenen Stamm MAKK139; (6-9) Extrakte aus dem nicht-lysogenen Kontroll-Stamm MAK757.

Blot A zeigt, daß Orf2 nur in K139-lysogenen Zellen vorhanden ist. Das Signal in der ersten Spur ist sehr stark, da als Vergleich gereinigtes Orf2 Protein aufgetragen wurde. In Blot B sollte die genaue Lokalisation von Orf2 innerhalb der lysogenen Zellen ermittelt werden. Die Innenmembran-Extrakte haben sich beim Lauf im SDS-Gel sehr stark ausgedehnt, die anderen Fraktionen sind deshalb etwas zur Seite gedrängt und verschoben. Dennoch sieht man im Cytoplasma-Extrakt der lysogenen MAKK139 Zellen eindeutig ein positives Signal mit dem Orf2-Antikörper. In den Periplasma-Extrakten der lysogenen wie auch der nicht-

lysogenen Zellen ist ebenfalls ein Signal zu beobachten, doch aufgrund seiner Größe von 95 kDa dürfte es sich um eine unspezifische Hybridisierung handeln.

D.3.3.5. Gelshift-Assays

Da in den Plaque-Assays ein gewisser Einfluß von Orf2 auf die Plaque-Bildung festgestellt werden konnte, wurde nach einer möglichen Fähigkeit von Orf2 zur Bindung an die K139 Promotor-Regionen gesucht. Untersucht wurden dabei die putativen Promotor-Regionen $P_{R/L}$, $P_{11/12}$, P_{13} und $P_{16/17}$. Als Beispiel ist in Abb. D.22 der Ansatz mit der $P_{R/L}$ Promotor-Region zu sehen.

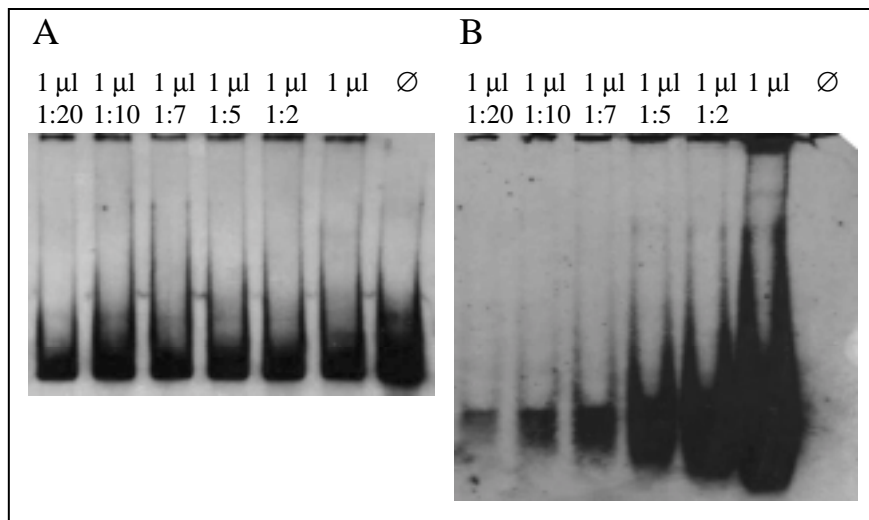


Abb. D.22: Orf2 Gelshift-Assay. Das Digoxigenin-markierte PCR-Fragment der Lysogenie/Lysis-Kontroll-Region $P_{R/L}$ wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von gereinigtem Orf2 inkubiert (Angaben über der Spur), die Ansätze in einem PAA-Gel aufgetrennt und geblottet. **A.** Nachweis des Digoxigenin-markierten PCR-Fragmentes. **B.** Western Blot mit Anti-Orf2 Antikörper. Dargestellt ist jeweils derselbe Blot im gleichen Größenverhältnis.

In keiner der Promotor-Regionen konnte eine Bindung von Orf2 festgestellt werden. Wie in Abb. D.22B zu sehen ist, läuft die Orf2-Proteinfraction unterhalb der DNA-Fraktion, Gelshift oder Kolokalisation von Orf2 und gelabelter DNA konnte also nicht nachgewiesen werden.

D.3.4. Lytischer Repressor CI

D.3.4.1. Phänotyp CI-überexprimierender Zellen

Der im lysogenen Operon lokalisierte lytische Repressor CI ist eines der ersten Gene, welches nach Eintritt der Phagen-DNA in die Wirtszelle exprimiert wird. Seine Aufgabe ist es, in der Anfangsphase die Lysogenisierung herbeizuführen und den lysogenen Zustand aufrechtzuerhalten (39) (43). Um zu überprüfen, ob die Genregulation bei K139 in ähnlicher

Weise abläuft, wurde der Phänotyp sowohl von CI-überexprimierenden Zellen als auch von *cI*-Deletionsmutanten überprüft.

Spontan-Phagentiter des CI-überexprimierenden Stammes MAK757K139:

Das *cI* Gen wurde über PCR amplifiziert und in den Überexpressionsvektor pTrc99Akan ligiert. Um den Einfluß von CI auf den Spontan-Phagentiter zu überprüfen, wurde das Plasmid anschließend in den K139-lysogenen Stamm MAK757K139 transformiert.

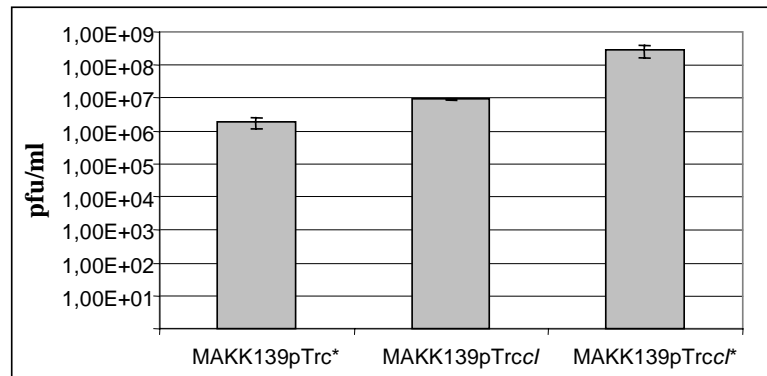


Abb. D.23: Spontan-Phagentiter CI-überexprimierender Zellen im Vergleich zur Kontrolle (n = 3). Die mit Stern (*) markierten Stämme wurden mit 1 mM IPTG in der ÜNK angezogen.

Die Überexpression von CI hat einen Anstieg des Phagentiters zur Folge, und zwar um das 5fache ohne IPTG-Induktion und um das 150fache mit IPTG-Induktion.

Plaque-Bildung von K139.cm9 auf MAK757pTrc99kanCI:

Das CI-Überexpression-System wurde in den nicht-lysogenen Stamm MAK757 transformiert und die Plaque-Bildung des hochlytischen Phagen K139.cm9 auf diesem Stamm im Vergleich zu einem Kontrollstamm untersucht.

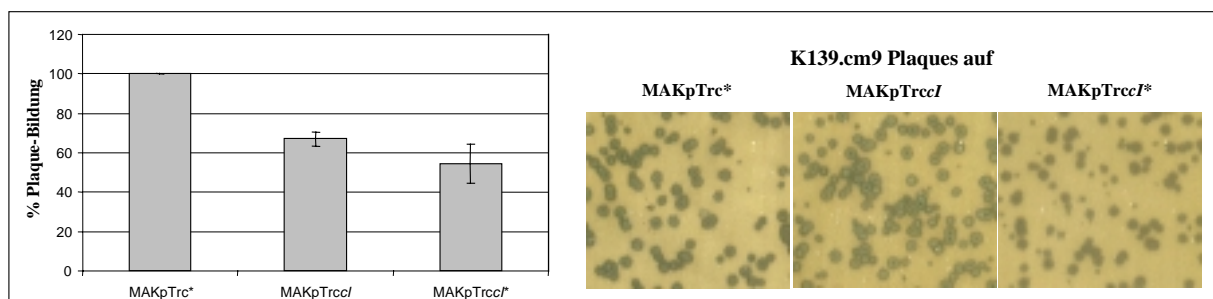


Abb. D.24: Plaque-Bildung und Plaque-Morphologie der hochlytischen Mutante K139.cm9 auf CI-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (n = 3). Der 100%-Wert entspricht $1.6 \cdot 10^8$ pfu/ml.

Die Zahl der Plaques geht unter Einfluß der CI-Expression auf ca. 60% des Wertes des Kontrollstammes zurück. Die Morphologie der Plaques ist kaum verändert.

D.3.4.2. Phänotyp der *cl*-Deletionsmutante

Die chromosomale *cl*-Deletionsmutante wurde im lysogenen MAKK139 Stamm nach dem gleichen Prinzip wie für die *orf2*-Deletionsmutante konstruiert. Anschließend wurde der Spontan-Phagentiter einer ÜNK von Deletions-Stamm, Komplementante und Wildtyp miteinander verglichen (Abb. D.25).

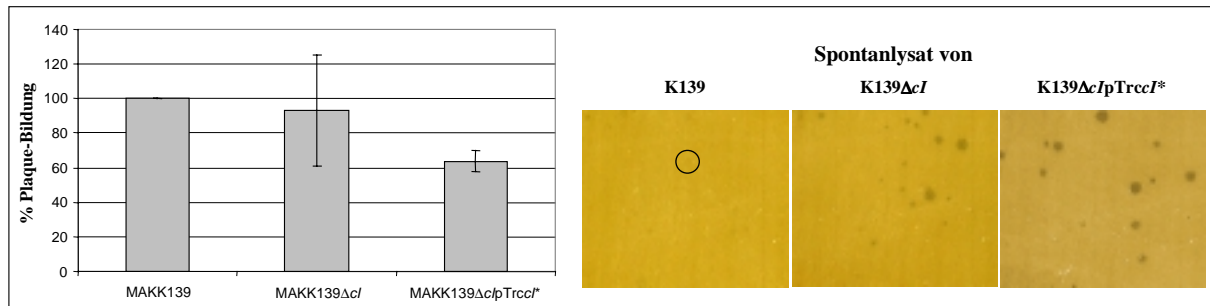


Abb. D.25: Spontan-Phagentiter und Plaque-Morphologie von *cl*-Deletionsmutante, Komplementante und K139 Wildtyp (n = 3) auf MAK757 Zellen. Der 100%-Wert entspricht $1.4 \cdot 10^6$ pfu/ml.

Der Phagentiter der *cl*-Deletionsmutante geht im Vergleich zum Wildtyp nur unwesentlich zurück, der der Deletionsmutante mit CI-Komplementationsplasmid dagegen auf ca. 60% des Wildtyp-Titers. Die Plaques wurden bei Deletion von *cl* klarer.

D.3.5. Analyse putativer Regulatoren im Promotor-Test System

Um die Aktivität verschiedener putativer Regulatoren auf die K139-Promotoren überprüfen zu können, wurde ein Promotor-Test Vektor gewählt. Dieser trägt entgegengesetzt orientierte, promotorlose *phoA* und *lacZ* Gene, die durch Einbringen von aktiven Promotoren in die MCS am Beginn der Gene transkribiert werden können. In diesen Vektor wurden die putativen K139 Promotoren P_{R/L}, P_{11/12}, P₁₃ und P_{16/17} ligiert und diese dann in den *phoA/lacZ*-negativen Stamm CC118 transformiert. Anschließend wurden die Proteine Orf2, CI, Orf8, Orf11, Orf12 und Orf13 im pTrc99*Akan* Überexpressionsplasmid in diese Stämme eingebracht und die Aktivitätsänderung der Reportergene gemessen.

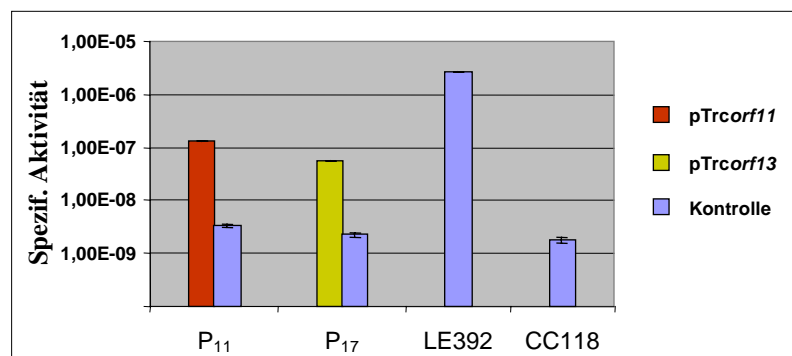


Abb. D.26: Spezifische β-Galaktosidase Aktivität (μmol Produkt/min*mg Protein) des Promotor-Test Vektors bei Überexpression verschiedener Regulatoren (n = 3). Als Positivkontrolle diente der *E. coli* Stamm LE392, als Negativkontrolle einmal der *E. coli* Stamm CC118 ohne Plasmid und mit dem jeweiligen Promotor-Test Plasmid (≙ Grundaktivität der Promotoren).

In Abb. D.26 sind die Ergebnisse für die Aktivität der β -Galaktosidase dargestellt. Ein Erhöhung der Grundaktivität von P₁₁ wurde durch Expression von *orf11* erzielt, eine Aktivitätserhöhung von P₁₇ durch *orf13*. Alle anderen Kombinationen an Promotoren und putativen Regulatoren hat keine Veränderung der Aktivität bewirkt.

Die Bestimmung der Phosphatase-Aktivität gestaltete sich bisher als schwierig. Hier muß das System noch optimiert werden.

E. Diskussion

E.1. AT-Scan und Phagenevolution

Ausgehend von der Überlegung, daß Sequenzen, die über horizontalen Gentransfer neu in ein bakterielles Wirtsgenom aufgenommen wurden, sich im Laufe der Zeit in ihrem AT-Gehalt an den Wirt anpassen, kann ein Vergleich des AT-Verlaufs Rückschlüsse über mögliche Neuerwerbungen von Genen geben (21). Bei einer Anpassung an den AT-Gehalt von *V. cholerae* sollte man für die K139 Gene einen Wert um 52% erwarten. Der tatsächliche AT-Verlauf wurde in Abb. D.1 vorgestellt.

Auffallend sind die hohen Werte im Bereich des lysogenen Operons, v.a. für die Gene *glo* und *orf2*. Wann diese Gene in das lysogene Operon eingegliedert wurden und woher sie stammen ist unklar. Doch läßt der hohe AT-Gehalt darauf schließen, daß sie - in evolutiven Zeiträumen gemessen - noch nicht lange im *V. cholerae* Wirtssystem zu finden sind. Ein Vergleich dieser Genregion mit P2 und 186 zeigt, daß nicht nur bei K139, sondern auch bei HP1 zusätzliche Gene zwischen dem lytischen Repressor und der Integrase lokalisiert sind (Abb. G.1). Vergleichende Genomanalysen in Phagengruppen mit ähnlich aufgebautem Lysogenie/Lysis-Modul haben gezeigt, daß die Variabilität in dieser Genomregion allgemein sehr hoch ist (z.B. bei S2 von *H. influenzae* im Vergleich zu HP1 (139), bei den *S. thermophilus* Phagen TP-J34 und Sfi21 (112) und bei einer Reihe anderer temperenter *Siphoviridae* aus Gram-positiven Bakterien (92)). Viele der in dieser Region kodierten Gene dienen der Exklusion oder der Immunität gegenüber superinfizierenden Phagen, wie es auch für das *glo* Gen von K139 gezeigt werden konnte (107). Auch im Genom von P2 und 186 sind Superimmunitäts-Gene kodiert, aber nicht im lysogenen Operon, sondern mitten im Schwanz-Gencluster (*fun/Z* bei P2) bzw. zwischen der Replikations-Region und dem Kapsid-Cluster (*tin, old* bei P2; *orf97* bei 186) (21) (19).

Warum erfolgt dann aber die Eingliederung solcher Gene z.B. bei K139 ausgerechnet in das lysogene Operon? Im Falle von P2 stellen die Superimmunitäts-Gene eigenständige transkriptionelle Einheiten (Moron: einzelne Gene mit Promotor und Terminator, die nachträglich in eine Genregion eingefügt wurden (61)) dar, benötigen also einen eigenen Promotor und eventuell einen Rho-unabhängigen Terminator. Die Integration in das lysogene Operon ist dagegen auch dann möglich, wenn die Gene keine eigenständigen Promotoren mitbringen. Da die Superimmunitäts-Funktion nur während der lysogenen Phase benötigt wird, werden die Gene entsprechend mit transkribiert. Eine Eingliederung in das lysogene Operon ist wahrscheinlich auch deswegen vorteilhaft, weil die Integrität transkriptioneller Einheiten nicht gefährdet wird. Das *fun/Z* Gen von P2 ist mitten im Schwanz-Gencluster lokalisiert und liest entgegen der allgemeinen Transkriptionsrichtung. Die Schwanzgene können bei P2 also nicht von einem Promotor aus abgelesen werden, sondern benötigen einen

erneuten Transkriptionsstart nach dem eingesetzten Moron. Interessanterweise beginnt beim 186 Phagen, der keine Gen-Insertion im Schwanz-Gencluster aufweist, an der gleichen Stelle ebenfalls ein neues Operon. Man kann sich vorstellen, daß Phagen mit Integrationen in ungünstige Bereiche, die die Transkription eines Operons beeinträchtigen, im Laufe der Zeit in evolutive "Sackgassen" geraten und verloren gehen, während sich solche mit Integration in günstigere Bereiche durchsetzen können.

Die beiden übrigen Superimmunitäts-Gene von P2 und von 186 sind zwischen der Replikationsregion und dem Kapsid-Gencluster lokalisiert. Genau diese Region (*rep-orf15*) weist auch in K139 einen erhöhten AT-Gehalt auf, was einen Hinweis auf Rekombinationsprozesse mit AT-reicheren Sequenzen in der Vergangenheit darstellen könnte. Die tatsächliche Häufigkeit rekombinativer Ereignisse in diesem Bereich zeigt sich dadurch, daß alle vier Phagen des K139-Typs an dieser Stelle einen variierenden Gen-Gehalt aufweisen. Dies soll in einem späteren Kapitel noch diskutiert werden. Ein weiterer Scheitelpunkt des AT-Gehalts findet sich mitten im Schwanz-Gencluster im Bereich der putativen Schwanzfaser. Auch hier hat der Vergleich der K139-verwandten Phagen zur Aufdeckung von rekombinativen Prozessen geführt (siehe Kap. E.2.1.2).

Auffallend sind außerdem die Schwankungen im AT-Gehalt im zweiten Morphogenesis-Operon ab *orf17*. Betrachtet man sich die Homologie-Tabelle G.1, so fällt auf, daß die beiden Gene des ersten Kapsid-Clusters, *orf15* und *orf16*, relativ hohe Homologien zu den P2-Phagen selbst auf DNA-Ebene aufweisen, während im zweiten Kapsid-Cluster so gut wie keine FastA-Homologien zu beobachten sind (siehe auch Abb. D.3). Denkbar wäre hier, daß eine homologe Rekombination im zweiten Kapsid-Cluster mit einem etwas weiter entfernten Verwandten stattgefunden hat. In einer Studie von Nilsson und Haggard-Ljungquist (113) wurde gezeigt, daß es eine hohe Frequenz homologer Rekombinationen zwischen nahe verwandten P2-Phagen innerhalb des Morphogenesis-Clusters gibt. Diese sind natürlich umso schlechter zu detektieren, je näher die Phagen miteinander verwandt sind. Die hohe Diskrepanz in der FastA-Homologie zwischen den beiden Kapsid-Operonen und die Schwankung im AT-Scan könnten dagegen ein deutlicher Hinweis auf vergleichbare Prozesse innerhalb der Morphogenesis-Gene von K139 darstellen.

E.2. Vergleichende Phagen genomik

Bei einer Suche nach K139-verwandten Phagensequenzen in verschiedenen *V. cholerae* Isolaten konnten zusätzlich zu den zwei bereits bekannten Hybridisierungsmustern in O139/O1 El Tor und in O1 klassischen Stämmen zwei weitere identifiziert werden (Abb. D.9). Doch außer aus den K139-lysogenen Stämmen selber konnte aus keinem dieser Stämme Phagen-DNA isoliert werden. Die Existenz eines defekten Prophagen wurde für den

klassischen Stamm O395 bereits 1975 von Gerdes und Romig beschrieben (50), dieser wurde dann später als K139-verwandter Phage identifiziert (123). Somit stellt sich die Frage, ob die beiden anderen *V. cholerae* Stämme, E8498 und Ch457, ebenfalls defekte Phagen tragen oder der Phagentiter aufgrund der schlechten Induzierbarkeit zu niedrig für die Isolierung ausreichender DNA-Mengen war. Die Herstellung eines hochtitrigen Phagenlysates wie für K139 war nicht möglich, da kein phagenfreier Wirtstamm zur Verfügung stand. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb chromosomale DNA benutzt. Dabei ergaben sich zum Teil große Schwierigkeiten bei der Herstellung der PCR-Produkte. Dies ist wahrscheinlich auf Mutationen innerhalb der bindenden Sequenzen der Primer zurückzuführen, die Primer konnten ja nur anhand der K139 Sequenz ausgesucht werden. Die besten Ergebnisse wurden noch durch die "Nested-PCR"-Methode erzielt, indem große Fragmente bei einer möglichst hohen Bindetemperatur hergestellt wurden. Diese wurden dann aufgereinigt und für eine weitere PCR eingesetzt, wobei dann auch niedrigere Temperaturen für die Herstellung spezifischer Produkte gewählt werden konnten.

Zusammengenommen kann man aus den Ergebnissen der Southern Hybridisierungen, aus dem PCR-"Screening" des Genoms und der Sequenzierung ausgewählter Genbereiche schließen, daß es sich in allen vier Fällen um hoch homologe Phagen handeln muß. Überraschend war die Entdeckung, daß trotz ihrer hohen Homologie alle vier Phagen bereits einen Genbereich mit unterschiedlichem Gengehalt aufweisen. Dies unterstreicht die Dynamik, mit der die Evolution der Bakteriophagen vonstatten geht und wirft ebenfalls einige Fragen hinsichtlich der Evolution des *V. cholerae* Wirtes auf.

E.2.1.1. Sequenzvergleich der Genomregion *rep* bis *orf15*

Wie schon in Kapitel E.1. erwähnt, weist die Region zwischen dem *rep* Gen und *orf15* einen erhöhten AT-Gehalt auf. Durch den Vergleich der Sequenzen der K139-verwandten Phagen wurde deutlich, daß intensive Rekombinationsereignisse zu einer mosaikartigen Struktur in dieser Region geführt haben. Dies erschwert auch Überlegungen hinsichtlich der Phylogenie dieser Phagen, letztlich kann man nur Aussagen über die Verwandtschaft einzelner Gene oder einer kurzen Abfolge von Genen treffen, nicht jedoch über die Phagen als Ganzes. Hierfür wären Sequenzierungen innerhalb stärker konservierter Genbereiche notwendig, etwa innerhalb der Morphogenesis Gene.

Der Genbereich von *rep* bis *orf13* bei K139 weist beispielsweise eine hohe Homologie zu O395 auf, während der nachfolgende *orf14* eine sehr enge Verwandtschaft zur E8498 Sequenz zeigt. Dagegen sind die Gene *orf12* und *orf13* von E8498 näher zu Ch457 verwandt als zu O395 und K139. Interessant ist außerdem die Identifizierung einer kurzen Sequenz von 89 bp bzw. 130 bp mit 84% Identität, die in den Phagensequenzen der Stämme O395, Ch457 und E8498 inmitten ansonsten völlig verschiedener Sequenzen zu finden ist (siehe Abb.

D.12). Diese Sequenz könnte auf der einen Seite ein Relikt einer längeren Sequenz gewesen sein, die bei einem Vorläufer-Phagen zu finden war und später durch unterschiedliche Rekombinationsereignisse verkürzt und an eine andere Stelle verschleppt wurde. Weiterhin könnte eine solche kurze Sequenz auch die Möglichkeit bieten, über homologe Rekombination nicht-verwandte benachbarte Sequenzen auszutauschen, wie es für die Linker Sequenzen des *E. coli* Phagen HK620 vorgeschlagen wurde (29). So könnte man sich denken, daß völlig neue Gene ursprünglich über illegitime Rekombination erworben werden, diese dann innerhalb einer nah verwandten Phagenpopulation dann über homologe Rekombination weitergegeben werden.

Die Moron-Theorie von Hendrix et al. (61) hat die Verbreitung von ganzen Transkriptionseinheiten bei rekombinativen Prozessen in der Phagenevolution vorgeschlagen. So kann ein Einbau in ein Phagen genom an eine beliebige Stelle erfolgen, solange keine transkriptionellen Einheiten dabei unterbrochen werden. Dies wird in der K139-Sequenz vor allem bei den Genen *orf12* und *orf13* deutlich. Wie in Kap. D.2.3.1 dargestellt, können zwei unterschiedliche Verwandtschafts-Gruppen hinsichtlich dieser beiden Gene in den vier bekannten K139-Phagen unterschieden werden. Diese Gruppierung legt nahe, daß ein Austausch entweder untereinander oder mit anderen Phagen erfolgt sein muß, der zu dieser Verteilung geführt hat. Diese Gene sind von unterschiedlichen Sequenzen umgeben, die Homologie endet jedoch nicht an der Gengrenze, sondern erstreckt sich über den 3'-Bereich der Gene hinaus. Innerhalb dieser Bereiche wurden putative Promotor-Regionen gefunden, so daß eine Übertragung zusammen mit diesen Regionen erfolgt sein muß. Für die anderen Gene, die hier kodiert sind, muß dies ebenfalls vermutet werden, da außer *orf10* und *orf14* die Abstände zu den stromaufwärts gelegenen Operonen zu groß für eine translationale Kopplung ist. Ein eigener Promotor stellt außerdem sicher, daß die Transkription des Gens zum geeigneten Zeitpunkt erfolgt. Interessant wäre außerdem die Frage nach der Funktion dieser Gene. Es scheint ein hoher evolutiver Druck zu bestehen, die Gene in diesem Bereich zu variieren. Man könnte sich vorstellen, daß es sich wie bei P2 und 186 hier um Exklusionssysteme handelt, ein hoher Gen-Flux ermöglicht dann eine schnelle Ausgrenzung anderer Phagen. Da K139 in hohem Maße lysogenisiert, könnte man sich vorstellen, daß er verstärkt die Exklusion anderer Phagen favorisiert.

E.2.1.2. Sequenzvergleich der putativen Schwanzfaser-Gene

Die Sequenzierung der Schwanzfaser-Gene führte ebenfalls zu interessanten Entdeckungen. Innerhalb der Sequenz der Schwanzfaser-Proteine konnten durch Vergleich der verschiedenen Phagen untereinander zwei variable Regionen identifiziert werden. Variable Regionen innerhalb des C-Terminus der Schwanzfaser-Proteine werden bei Bakteriophagen allgemein für die Fähigkeit zur Rezeptorbindung verantwortlich gemacht (57). Somit kann für die entsprechenden variablen Regionen des K139 Schwanzfaser-Proteins

eine ähnliche Funktion vermutet werden. Interessanterweise konnten drei Schwanzfaser-Protein Typen identifiziert werden, deren Vorkommen aber nicht mit dem O-Antigen ihrer Wirte korreliert. Das bedeutet, daß ein und derselbe Schwanzfaser Typ in drei verschiedenen Serogruppen gefunden wurde (O1 El Tor, O139, O141), während innerhalb einer Serogruppe drei verschiedene Schwanzfaser-Typen vorkommen (O1 El Tor, O1 klassisch O395 und O1 klassisch Z17561) (siehe Abb. D.13). Da von der Z17561 Gensequenz leider nur ein kleines Fragment in der Datenbank vorliegt, ist noch unklar, ob nur die V1 Region oder ob das ganze Schwanzfaser-Gen mit dem aus dem Ch457 Stamm identisch ist.

Von K139 war ja schon bekannt, daß er zwar in O139 Stämmen lysogen vorliegt, nicht-lysogene O139 Stämme aber nicht infizieren kann (123). LPS-Bindungsstudien haben gezeigt, daß er nur an O1 LPS binden kann, und zwar unabhängig vom Biotyp klassisch oder El Tor (108). Dies wurde dadurch erklärt, daß K139-lysogene und nicht-lysogene O1 El Tor Bakterien ein neues LPS Biosynthese-Cluster erworben haben müssen (10). An das O139 LPS kann der K139 Phage dann nicht mehr binden. In dieser Untersuchung wurde nun ein Schwanzfaser-Gen mit 100% Identität zum K139 Schwanzfaser-Gen gefunden, allerdings in einem O141 Stamm. Durch LPS-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß zumindest der K139 Phage nicht an O141 LPS binden kann. Dies würde den Schluß nahelegen, daß der im O141 Stamm vorliegende Phage ebenfalls nicht an das LPS seines Wirtes binden kann, da er dasselbe Schwanzfaserprotein aufweist wie K139. Parallel zu den Schlüssen für die O139 Stämme müßte also auch hier vorgeschlagen werden, daß die lysogenen O141 Stämme aus O1 El Tor Stämmen durch den Erwerb eines neuen LPS Biosynthese-Clusters hervorgegangen sind. Zudem weist der im O1 klassischen Stamm O395 residente Phage einen anderen Schwanzfaser-Typ auf als K139. Weitere Studien müssen zeigen, ob ein Phage mit diesem Schwanzfaser-Typ in der Lage ist, an O1 LPS zu binden. Da es sich bei dem O395 Phagen um einen defekten Phagen handelt, geht dies wohl nur über die Konstruktion eines chimären Schwanzfaser-Gens im K139 Phagen. Da die variable Region V2 sowohl im Schwanzfaser-Gen von K139 als auch im Schwanzfaser-Gen des O395 Phagen identisch ist, könnte diese Region für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich sein, doch stellt sich dann die Frage, welche Rolle der zweiten variablen Region im Schwanzfaser-Gen zukommt. Auch das Fragment einer Schwanzfaser-Gen Sequenz aus der Datenbank, die ebenfalls in einem klassischen Stamm (Z17561) gefunden wurde, unterscheidet sich in ihrer variablen Sequenz V1 sowohl von der O395 als auch von der K139 Sequenz. Dafür entspricht sie der V1 Region des Phagen aus dem Nicht-O1/O139 Stamm Ch457.

Zusammengefaßt kann man sagen, daß die weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Spezifität der Schwanzfaser-Typen somit dazu beitragen können, die Herkunft neuer *V. cholerae* Serogruppen zu beleuchten. Damit könnte K139 als ein Hilfsmittel dienen, um nicht

nur einen Beitrag zur Klärung evolutiver Fragen hinsichtlich der Entwicklung der Bakteriophagen, sondern auch seines Wirtsbakteriums zu leisten.

E.3. Einzelne funktionelle Gengruppen

E.3.1. Replikation

Die hohe Homologie zu RC-Replikationsproteinen sowie die Anwesenheit der gleichen Sequenzmotive läßt vermuten, daß K139 über einen vergleichbaren Mechanismus repliziert. Auch die hohe DNA-Homologie im Bereich der P2 *ori* Sequenz spricht dafür. Bei P2 wurden als Replikationsprodukte kovalent geschlossene monomere Ringe gefunden, lange Konkamere wie beim λ Phagen dagegen nie (9). Diese monomere, zirkuläre DNA dient dann auch als Substrat für die Verpackung in die Phagenköpfe. Sollte K139 über den gleichen Mechanismus replizieren wie P2, so stellt sich die Frage, ob auch in diesem Fall monomere Ringe als Replikationsprodukt entstehen. Dies würde im Widerspruch zur beobachteten terminalen Redundanz der verpackten DNA stehen (siehe Kap. D.1.1, (123)). Denkbar wäre, daß bei K139 in diesem Fall Konkamere entweder direkt als Replikationsprodukte entstehen, wie es beim λ Phagen der Fall ist, oder daß sie nach der Replikation über Rekombinationsprozesse zwischen monomeren DNA-Molekülen gebildet werden.

Die Verwandtschaft zum Replikationssystem von P2 wird noch durch ein weiteres Indiz gestärkt, nämlich die Homologie von Orf3 zum Replikationsprotein B von P2. Im Gegensatz zum Phagen 186 benötigt P2 neben dem A Protein zusätzlich das Replikationsprotein B, das als DnaC-Analog fungiert und die Wirts-Helikase DnaB zum *ori* von P2 transportiert. Bisher wäre somit K139 der erste unter den P2-Phagen, der ebenfalls über ein B-Homolog verfügt. Da die Homologie zu B allerdings sehr schwach ist, wurde nach weiteren Indizien gesucht, die eine äquivalente Funktion andeuten könnten. In Kapitel D.1.3.2 wurde bereits festgestellt, daß pI und MW bei Orf3 und B vergleichbar sind. Weiterhin wurde nach bestimmten Sequenzmotiven gesucht, die auch in anderen Proteinen gleicher Funktion vorkommen könnten. Hierfür wurden die Proteine P von λ , Orf14 von phi80 und B von P2 gewählt.

K139 Orf3	9	QQVGRNKQOM	105	QLNDIERQKVRRCLEEMNKVTKRF	140	APDFL
P2 B	30	QDTCDYYNOM	41	ERERLFTTVCFHAQLKQRHATMCF	78	AIDEL
lambda P	7	QMVNFDREOM	76	ENCIITTEQVNAQMRVARRQNRPF	178	AADEL
phi80 Orf14	7	QMRNHDREOM	77	ENCIHTVAQVDACMRIARRQERPF	177	AGDLL

Abb. E.1: Ergebnis des Vergleichs verschiedener bekannter oder vermuteter DnaC-Analoga mit dem Blockmaker-Programm. Identische AS sind mit schwarzem Hintergrund versehen, grau unterlegt sind dagegen konservierte Substitutionen.

Da die Sequenzhomologie selbst zwischen diesen bekannten DnaC-Analogen schon sehr niedrig ist (115), wurde das Blockmaker-Programm ausgewählt, um eventuelle

Ähnlichkeiten zu finden. Dieses Programm sucht gezielt nur nach konservierten Blöcken innerhalb der AS-Sequenz. Wie in Abb. E.1 zu sehen ist, konnten drei konservierte Blöcke identifiziert werden, in Block 1 und 2 zeigt Orf3 sogar eine etwas bessere Übereinstimmung zu den DnaC-Analogen von λ und phi80 als P2 B. Interessant ist, daß diese beiden Blöcke dem Bereich entsprechen, der für die DnaB-Interaktion verantwortlich sein könnte (115). Eine Funktion von Orf3 als DnaC-Analog wäre also durchaus möglich.

E.3.2. Methylierung

Durch Überexpression von *orf8* in einem *dam⁻dcm⁻* *E. coli* Stamm und Restriktionsanalysen der aus diesem Stamm isolierten DNA konnte gezeigt werden, daß K139 für eine Adenin-spezifische MTase kodiert, die die Erkennungssequenz GATC aufweist. Auch der nahe verwandte P2-Phage HP1 besitzt eine MTase mit dieser Spezifität (118), die im Blast-Vergleich jedoch keine Homologie zu Orf8 von K139 zeigt. Da beide jedoch aufgrund ihrer Sequenzmotive zur γ -Untergruppe der Adenin-spezifischen MTasen gehören, dürften sie wohl einen gemeinsamen Ursprung haben. Trotz der schlechten Sequenzhomologie zwischen beiden MTasen (siehe Abb. E.2) spricht auch die Tatsache, daß alle weiteren MTasen der γ -Untergruppe eine andere Spezifität aufweisen, für eine gemeinsame Verbindung. Die typischen GATC-spezifischen MTasen gehören dagegen der α -Untergruppe an. Auch die Größe der beiden Phagen MTasen ist mit 205 AS (K139) bzw. 173 AS (HP1) untypisch für die γ -Untergruppe, die meisten MTasen dieser Gruppe sind zwischen 400-600 AS lang (93).

HP1 Orf13	1	MMTKSNTKKS	DKDLWATPWWVFHYAEQYFNI	KFD-----	LDTCAMEHNTKVK																																																			
K139 Orf8	1	-MSS	TNGEVL	ENELYP	TPAEVV	DALLAKLTLR	SSDTFLEPCYGTGAIYEKIALPASQKSF																																																	

HP1 Orf13	48	NF	TPEQNTL	TADWQGR	-YCWMNPPY	SNPLP	FVLR	AI	SQSVLHN	-KTV	VML	LNVDG	STK-																																											
K139 Orf8	60	AE	IQK	GIDYL	TTDF	GQDVI	ITN	PPF	SL	TEEF	MRK	SI	KELAPDGT	MTVYL	QRLN	NYL	GATKR																																							
HP1 Orf13	105	---	WFD	M	CVR	NAKE	I	VY	ITNSR	I	PF	INN	---	ET	GE	ETD	QNN	KP	QML	VLF	FEP	KAPY	G	SL	K																															
K139 Orf8	120	LP	WF	E	I	G	F	P	K	T	P	V	I	V	P	R	P	R	F	V	K	G	G	N	D	S	C	E	Y	A	W	F	I	W	D	K	G	N	R	L	A	I	P	Q	G	L	S	H	I	V	S	I	G	L	V	Q
HP1 Orf13	159	S	-----	Y	V	S	L	H	E	M	K	E	K	G	M	L	Q	----																																						
K139 Orf8	180	DN	CK	N	E	L	R	K	K	D	T	H	C	K	R	C	G	A	T	K	R	E	A	A																																

Abb. E.2: ClustalW Vergleich der MTasen Orf13 von HP1 und Orf8 von K139. Es sind nur noch sehr kurze Bereiche zwischen beiden Proteinen konserviert, das für die Bindung des S-Adenosyl-L-Methionin Substrates wichtige Motiv I (93) (durch Sterne markiert) fehlt bei der HP1 MTase sogar ganz, dennoch wurde ihre Funktionsfähigkeit bestätigt (118).

Über die Funktion der HP1 MTase ist noch nichts bekannt. Auch wurde bei den übrigen P2-Phagen bisher noch keine MTase beschrieben, so daß es von dieser Seite ebenfalls keine Hinweise auf eine mögliche Funktion von Orf8 gibt. Doch kann man zumindest aufgrund seiner spezifischen Erkennungssequenz GATC eine Schutzfunktion vor Restriktions-Modifikationssystemen des Wirtes ausschließen, da durch bakterielle Dam Methylasen

methylierte GATC-Sequenzen eine wichtige regulatorische Rolle spielen. So wurde für *V. cholerae* gezeigt, daß die Dam Methylase die Pathogenität des Bakteriums beeinflußt und sogar für das Überleben der Zellen essentiell ist (68). Bei einer Suche nach GATC-Sequenzen in der K139 DNA konnte eine Häufung von vier Sequenzen in der Nähe der Insertions-Sequenz gefunden werden. Interessanterweise sind diese GATC-Sequenzen genau innerhalb von direkten "Repeats" lokalisiert (Abb. E.3).

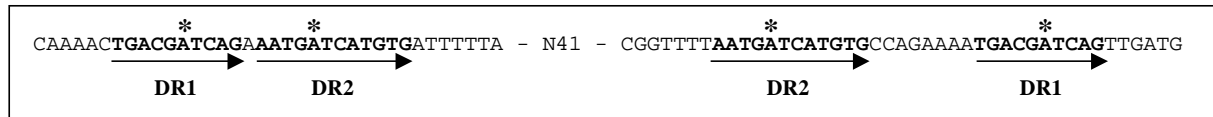


Abb. E.3: GATC-Sequenzen des K139 Genoms in der Nähe der Insertions-Stelle. Die Sequenzen liegen genau innerhalb von direkten "Repeats" und sind mit einem Stern markiert. Möglicherweise sind diese Sequenzen an der Regulation der Verpackung beteiligt.

In diesem Bereich des Genoms liegt beim HP1 Phagen die *cos* Verpackungs-Sequenz, in deren Nähe ebenfalls eine Reihe von "Repeats" lokalisiert sind (140) (47), jedoch fehlen hier GATC-Sequenzen. Von *pac*-"Site" Phagen ist dagegen bekannt, daß sie die Verpackung ihrer DNA über Methylierungen an der *pac*-"Site" regulieren (143). Falls sich beim K139 Phagen das Verpackungs-Signal tatsächlich in diesem Bereich befinden sollte, würde die Anwesenheit der GATC-Sequenzen für einen *pac*-Mechanismus bei der Verpackung sprechen. Zu diesem Verpackungsmechanismus würde auch die schon erwähnte Beobachtung der terminalen Redundanz des K139 Genoms passen. *pac*-"Site" Phagen schneiden nämlich nur am Beginn der Verpackung an einer spezifischen Stelle und setzen ihren zweiten Schnitt erst dann, wenn der Phagen-Kopf voll ist. Da aber in einem Kapsid mehr als nur die einfache Länge des Genoms Platz hat, liegt eine mehr oder weniger lange Sequenz des Genoms dann doppelt vor.

Weitere GATC-Sequenzen konnten im Bereich der Lysogenie/Lyse-Kontroll Region identifiziert werden. In diesem Fall liegen die GATC-Sequenzen innerhalb von inversen "Repeats" nahe des P_R -Promotors (Abb. E.4). Dies deutet darauf hin, daß Orf8 auch bei der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen könnte.

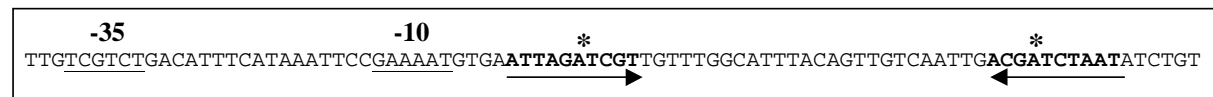


Abb. E.4: GATC-Sequenzen innerhalb von inversen "Repeats" in der Nähe des P_R -Promotors.

E.3.3. Morphogenesis-Gene

Über die Auftrennung von gereinigten Phagenpartikeln im 2D SDS-PAGE und MALDI-TOF Analyse der gefundenen Proteinspots wurde versucht, die an der Bildung des Phagenpartikels beteiligten Genprodukte zu identifizieren. Auf diese Weise konnten vier

putative Kapsid-Proteine (Orf15, 17, 18 und 20) und drei Schwanz-Proteine (Orf21, 25 und 35) den aufgetrennten Proteinspots zugeordnet werden. Wie in der Abb. D.15 zu erkennen ist, sind den identifizierten Proteinen meist mehrere Proteinspots zugeordnet. Für viele der Kapsid-Proteine ist bekannt, daß sie verschiedene Modifizierungsschritte durchlaufen. So wurde schon in den 70er Jahren gezeigt, daß aus dem Haupt-Kapsidgen von P2 durch Modifikationen mindestens drei verschiedene reife Proteine entstehen, die als Bestandteil des Kapsids identifiziert werden konnten (84) (87). Allerdings konnten dem K139 Haupt-Kapsidprotein insgesamt 15 Proteinspots auf dem SDS-Gel zugeordnet werden, die ein breites Massenspektrum umfassen. Denkbar wäre, daß die Auftrennung im 2D SDS-Gel wesentlich genauer ist als die eindimensionale Trennung. Die Analysen der Phagenpartikel wurden bisher immer mit herkömmlichen SDS-Gelen durchgeführt, möglicherweise sind durch genauere Methoden auch bei Proteinen anderer Phagen noch weitere Modifikationen zu finden. Doch kann man die große Zahl der Proteinspots wohl nicht allein durch Modifikationen erklären. Die Untersuchung der gereinigten Phagenpartikel im Elektronenmikroskop hat ergeben, daß die meisten Phagenpartikel durch den Aufreinigungsprozeß beschädigt worden waren. Meist waren die Schwänze kontrahiert und abgebrochen und die DNA offensichtlich schon aus den Kapsiden ausgetreten, so daß die Kapside ein eher deformiertes Aussehen hatten (Abb. E.5). Auch durch das Ausprobieren verschiedener Puffer bei der Aufreinigung und durch veränderte Zentrifugationsbedingungen konnte keine Verbesserung erzielt werden. Somit ist es durchaus möglich, daß viele der beobachteten Proteinspots ein Artefakt der Aufreinigungsprozedur sind.

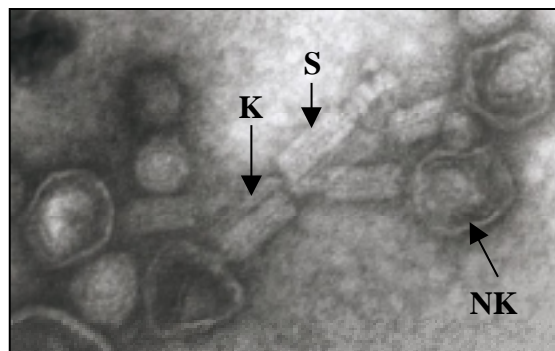


Abb. E.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme gereinigter K139 Phagenpartikel (80000fache Vergrößerung). "K" markiert die Kanüle des Phagenschwanzes, "S" die Schwanzscheide, die in diesem Fall kontrahiert ist, so daß die Kanüle deutlich hervortritt. "NK" markiert das Nukleokapsid. Die Nukleokapside sind eingefallen, enthalten also wahrscheinlich keine DNA mehr.

Weiterhin wurden in der CsCl-gereinigten Proteinfraction auch *V. cholerae* Proteine identifiziert. Dabei handelt es sich vor allem um Flagellen- und Membranproteine. Auch im Elektronenmikroskop konnten Flagellen und Membranvesikel identifiziert werden. Der Phagenpartikel von K139 erwies sich bei der CsCl-Aufreinigung als relativ leicht, so daß nur ein enger Dichtegradient gewählt werden konnte, verglichen mit den Standardprotokollen für die Phagenaufreinigung. Dies hat die Abtrennung von Verunreinigungen wesentlich

erschwert. Möglicherweise ist auch dies auf die Instabilität von K139 zurückzuführen, da die Phagenpartikel bei Verlust der DNA erheblich an Gewicht verlieren.

E.3.4. Zell-Lyse

Von den normalerweise an der Lyse der Wirtszelle beteiligten Phagen-Proteinen konnte nur das Lysozym durch Vergleich mit der Datenbank identifiziert werden. Alle bisher bekannten ds DNA Phagen benötigen jedoch zur Lyse des Wirtes mindestens noch die Aktivität eines Holins, evtl. einen Holin-Inhibitor und oft noch zusätzliche Hilfsproteine (158). Während das Holin in der lytischen Phase in der Cytoplasmamembran akkumuliert, verbleibt das Endolysin in der Regel im Cytoplasma und erreicht sein Substrat, das Peptidoglykan der Zellwand, erst durch die porenbildende Aktivität des Holins (Wang, 2000). Die AS-Sequenz-Analyse des putativen K139 Endolysins Orf28 ergab überraschenderweise als Sequenzmotiv ein Signalpeptid oder eine Transmembranhelix am N-Terminus (siehe Abb. E.5). Dies würde bedeuten, daß das K139 Endolysin entweder im Periplasma oder in der Cytoplasma-Membran lokalisiert ist, wobei der C-Terminus dann voraussichtlich ebenfalls in das Periplasma hineinragen würde. Dies paßt zwar nicht zur gängigen Modellvorstellung über Endolysine, doch wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen über ähnliche Eigenschaften von Endolysinen berichtet. Die Anwesenheit einer möglichen Signalsequenz wurde für das Endolysins Ply21 des *Bacillus cereus* Phagen TP21 vorgeschlagen, ebenso für homologe *Bacillus* Endolysine (90). Eine tatsächliche Membran-Lokalisation konnte dagegen im Falle des Lysins des Bakteriophagen Φ adh (63) und des Autolysins von *Streptococcus pneumoniae* (33) gezeigt werden. Auch wurden mögliche Modelle vorgeschlagen, die eine Erklärung für die außergewöhnliche Lokalisation der Endolysine liefern können. Zum einen würde eine Signalsequenz dem Lysozym ermöglichen, auch ohne Holin sein Substrat zu erreichen (90). Die Läsionen können aber in einem solchen Fall wohl nicht mehr dazu dienen, dem Endolysin den Zugang zu seinem Substrat erst zu ermöglichen, wie es für cytoplasmatische Endolysine der Fall ist. Eine Erklärung von Diaz et al. besagt, daß die Bildung der Läsionen z.B. durch den Zusammenbruch des Energiestatus der Zelle die Interaktion des Endolysins mit der Membran stört und es dadurch erst aktiviert (34). Das Holin würde in diesem Fall eher als Zeitgeber für die Lyse funktionieren.

Daß keines der K139 Gene Homologie zu bisher bekannten Holinen aufweist ist nicht ungewöhnlich, da die Holine eine der diversesten funktionellen Protein-Gruppen darstellen. Zur Zeit sind schon über 30 orthologe Holin-Gruppen bekannt (155), deren Zahl sich durch die fort dauernden Sequenzierungs-Projekte wohl noch weiter erhöhen wird. Bei der Suche nach einem möglichen Holin in der K139 Sequenz kann man die von Wang et al. (2000) definierten Kriterien für die typischen Eigenschaften eines Holins zu Rate ziehen. Demnach sind Holine meist direkt neben dem Lysozym kodiert (in der Regel stromaufwärts), weisen

weniger als 150 AS auf, haben mindestens eine Transmembran-Domäne und einen hydrophilen, stark geladenen C-Terminus. Zwei der um das Lysozym kodierten Proteine haben eine passende Größe, die Sequenz von Orf27 ist 75 AS lang und die von Orf29 116 AS, die von Orf30 dagegen wäre mit 192 AS (siehe Abb. E.6) zu groß für ein typisches Holin.

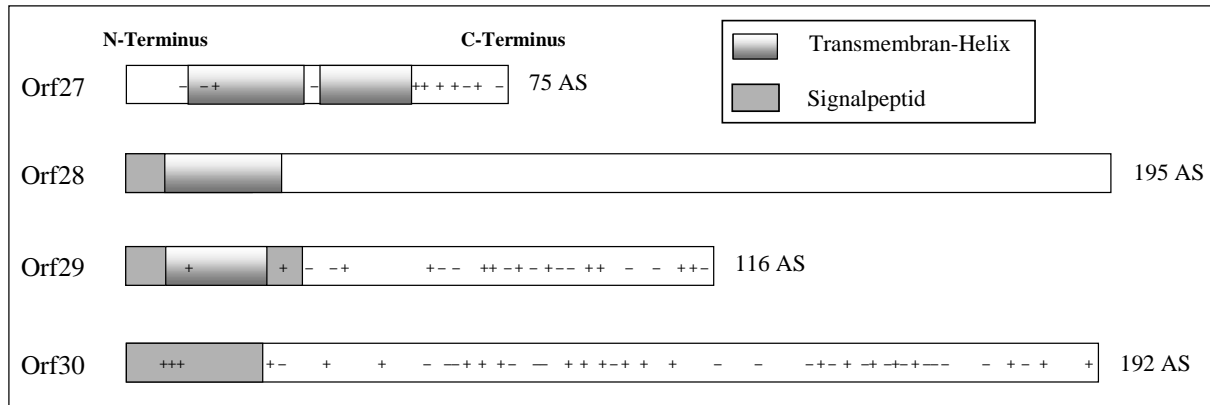


Abb. E.6: Sequenzeigenschaften der um das Lysozym Orf28 kodierten Proteine. Signalpeptid und Transmembran-Helices sind mit dem TMHMM-Programm bestimmt. Die Plus- und Minuszeichen stehen für positiv oder negativ geladene AS.

Die Analyse der Sekundärstruktur ergab die Anwesenheit von zwei putativen Transmembran-Helices in Orf27 und von einer Transmembran-Domäne oder einem Signalpeptid am N-Terminus von Orf29. Außerdem weisen beide einen stark geladenen C-Terminus auf. Ein Kyte-Doolittle Hydropathizitätsplot zeigt für beide einen hydrophilen C-Terminus, wobei die Werte von Orf29 kurz vor Ende noch einmal leicht ansteigen, während sie bei Orf27 eindeutig hydrophil sind (Abb. E.7).

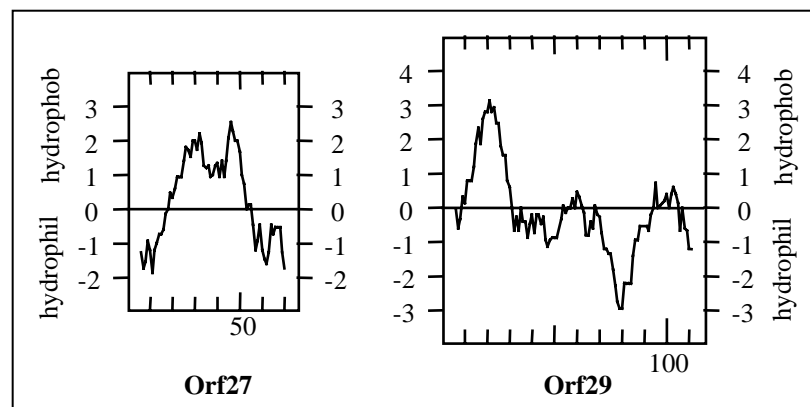


Abb. E.7: Hydropathizitätsplot für Orf27 und Orf29 nach Kyte-Doolittle, erstellt mit dem DNA Strider Programm.

Nimmt man noch die Lage stromaufwärts vom Endolysin mit dazu, erscheint Orf27 als der wahrscheinlichste Kandidat für ein Holin, doch kann dies nur im Experiment eindeutig bestimmt werden. Doch auch eine Beteiligung der beiden Gene *orf29* und *orf30* in der Lyse ist wahrscheinlich. Dafür sprechen die ermittelten AS-Sequenzmotive (Transmembran-Helix oder Signalsequenz in Orf29, Signalpeptid in Orf30). Die bisher bekannten Lysis-

Hilfsproteine beispielsweise erfüllen ihre Funktion im Periplasma (158). Orf30 weist Homologien zu Orf26 von HP1 auf, interessanterweise aber erst in der zweiten Hälfte des Proteins (Abb. E.8).

P2 "Orf28"	1	-----MRTKIFAACTVLTCLMLCAGCTSAPPAPTVPVIVPNACPKVS--LCPMPGSDPQTN
186 Orf28	1	-----MKMKPFAAGITLLCLMLCVGCTPEQPAPVPVIVVNGCPRVS--LCPMPGSDPKTN
phiCTX "Orf28"	1	-----VTMNPITASGLTSLCLMLLAGCNSAPLSPERPLTISGCPAVT--PCSLESAAPKDN
HP1 "Orf28"	1	-----MQKIKICLMAACITMLLACSTAPKPN--IRLICPQTT--ECRALSVNIRTN
K139 Orf30	1	MTTSQSLKRKRWQVLNATFLMLLLSGCANRTETVSTQVIFRLEPAGMLVPCNKPSVQGTWP
P2 "Orf28"	54	GDLSADIRQLENALARCASQVKMKIKHCODENDAQTRQPAQGAD
186 Orf28	54	GDLSADIRRELEGALTACALQVKTVKHCODELDAEAQKPAQSAD
phiCTX "Orf28"	54	GGLQTEVERIGLAWAEC AAKVDMIIIRTQ GATHEQAR-----
HP1 "Orf28"	50	GDLAESLNKALDRLDICTTAYASINKCITDFNNQNKEN----
K139 Orf30	61	EVVSEDIPLRKLQALKECNQQTIEDYLNWRRTARTTNRRERTMTKPVFTTKTIVTVCINCTDFK
HP1 ORF26	1	MEKTQAQSLLEKLTGNLKD SVTINVAGVDFE
K139 ORF30	121	FAPSVADANNYVNGVSGDNKVEPARTVYLERTVDKQKEELVELMNTVPGLIIEIFCKVYE
HP1 ORF26	32	FIRDNAAYDQMLNDIESNNKVTPILDYLLAIVAREQKEALLEIHH-VPTLAAQLAAKVNE
K139 Orf30	181	ASKGGITITLKN
HP1 ORF26	92	VFVPEIQITVKN

Abb. E.8: ClustalW Vergleich von Orf30 mit Proteinen der Lysis-Region der P2-Phagen und mit Orf26 von HP1. Das Bild entstand aus zwei getrennten Vergleichen, für die Orf30 geteilt worden war. Orf30 könnte im ersten Teil des Moleküls Ähnlichkeit zu den Orf28-Proteinen aufweisen, während es in der zweiten Hälfte homolog zu Orf26 von HP1 ist.

Vergleicht man die erste Hälfte von Orf30 mit dem in HP1 vor Orf26 kodierten Orf28-ähnlichen Protein (benannt nach 186 Orf28 (119)) und seinen Homologen in den P2 Phagen, so findet man einige in allen Proteinen konservierte AS. Auch paßt der Beginn des HP1 Orf26 Proteins gut zum Ende der Orf28-ähnlichen Proteine (QAQ-Motiv). Da für beide Proteine eine Funktion in der Lyse vermutet wird (119), könnte man sich vorstellen, daß die in den anderen P2-Phagen von zwei verschiedenen Proteinen ausgeführten Funktionen bei K139 von einem Protein mit zwei funktionell verschiedenen Domänen erfüllt wird.

E.3.5. Orf2

Um die Funktion des im lysogenen Operon kodierten Orf2 zu bestimmen, wurden sowohl eine chromosomale Deletionsmutante als auch *orf2*-überexprimierende Plasmide konstruiert. Dabei zeigte sich, daß die Überexpression von *orf2* keinen Einfluß auf die spontane Lyse eines residenten Wildtyp-Phagen aufweist (Abb. D.17). Auch eine Deletion des Gens hat keinen Einfluß auf den Spontantiter (Abb. D.19). Dies deutet an, daß Orf2 weder für die Induktion der Lyse noch für die Aufrechterhaltung des lysogenen Zustandes benötigt wird. Bei der Infektion eines Phagen in eine *orf2*-überexprimierende Zelle dagegen geht die Zahl der Plaques um 80% zurück, d.h., daß 80% der Phagen keine erfolgreiche Infektion durchsetzen können (Abb. D.18). Zudem sind die Plaques der eigentlich hochlytischen Mutante in Anwesenheit von Orf2 sehr trübe, fast mit denen des Wildtyps vergleichbar. Daß dieser Effekt nicht nur bei der K139.cm9 Mutante auftritt, sondern auch bei der Infektion mit

einem Wildtyp-Phagen, wurde ebenfalls beobachtet. Doch konnten die ohnehin schon sehr trüben Wildtyp-Plaques durch die nochmalige Zunahme der Trübung in diesem Fall nicht mehr ausgezählt werden.

Zusammengenommen legen diese Beobachtungen den Schluß nahe, daß Orf2 zwar keinen Einfluß auf die Genregulation des lysogenen Phagen selber hat, aber in gewissem Maße einen Schutz gegenüber einem superinfizierenden Phagen vermittelt. Auf welcher Ebene der Infektion Orf2 dabei eingreift, müßte noch näher untersucht werden. Aufgrund der Lokalisation von Orf2 kann man schließen, daß es seine Aktivität im Cytoplasma entfaltet (Abb. D.21). Eine lysogene Konversion oder Exklusion wäre demnach nur denkbar, wenn Orf2 diese Funktionen indirekt durch Aktivierung eines oder mehrerer Interaktionspartner erfüllen kann. In diesem Fall müßte entweder das LPS verändert sein, was in Zukunft noch durch Plaque-Inhibitionsstudien mit LPS aus *orf2*-überexprimierenden Zellen überprüft werden kann, oder die Injektion der Phagen-DNA wird verhindert. In diesem Fall müßte die DNA des superinfizierenden Phagen markiert werden, um ihre Präsenz in der Bakterienzelle nachweisen zu können. Die Lokalisation im Cytoplasma spricht aber auch für eine Immunitäts-Funktion. Diese kann jedoch nur auf die Etablierung der Lysogenie, nicht aber auf die Unterbindung der Lyse abzielen. In letzterem Fall müßte nämlich auch die spontane Plaquebildung eines residenten Phagen von einer *orf2*-Überexpression beeinflusst werden, was ja nicht der Fall ist (Abb. D.17). Prinzipiell sind also zwei Möglichkeiten denkbar. Möglicherweise wird die Lysogenisierungsrate erhöht, der Phage kann also erfolgreich lysogenisieren. Auf der anderen Seite könnte auch die Lysogenisierung völlig unterbunden werden, d.h. daß der Phage nicht mehr auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Eine solche abortive Lysogenisierung kann wiederum auf verschiedenen Ebenen eingreifen, durch Abbau der DNA, durch Repression sämtlicher transkriptioneller Aktivität, durch Inhibierung des Ringschlusses, der eine notwendige Voraussetzung für die Integration darstellt, oder durch Verhinderung der Integration selber. Im Gelshift-Assays konnte bisher keine Bindung an eine der putativen Promotor-Regionen nachgewiesen werden (Bsp. siehe Abb. D.22). Die sehr schwache Homologie zu DNA-Bindeproteinen und die erfolgreiche Aufreinigung über die Heparinsäule sind dennoch ein Indiz für eine mögliche DNA-Bindefähigkeit von Orf2. Vielleicht gibt es im Bereich der Kontrollregion noch einen anderen Promotor, der außerhalb des amplifizierten $P_{R/L}$ PCR-Produktes liegt und deswegen nicht identifiziert werden konnte. Durch *Sau3A*-verdaute K139 DNA und deren Einsatz in DNA-Bindestudien oder im Promotor-Test Vektor könnte nach möglichen regulatorischen Sequenzen gesucht werden. Auch die chromosomale "Attachment-Site" muß auf ihre Fähigkeit zur Orf2-Bindung in Zukunft untersucht werden.

Ein überraschendes Ergebnis wurde außerdem noch bei der Bestimmung des Phänotyps der Orf2-Komplementante erzielt (Abb. D.19). Während der Spontantiter der Orf2-

Deletionsmutante unverändert zum Wildtyp war, erhöhte sich der Titer der Komplementante um etwa das Doppelte. Dieser Effekt kann nicht auf die Überexpression von Orf2 alleine zurückzuführen sein, denn dann müßte auch der Titer des Wildtyp-Phagen bei Überexpression erhöht sein. Vielmehr ist es die Kombination aus der *orf2*-Deletion zusammen mit der Überexpression, die diesen Effekt herbeiführt. Ändert sich durch den Verlust des größten Teils der *orf2*-Sequenz vielleicht die DNA-Topologie im Bereich der entscheidenden Kontrollregion? Doch erst die Anwesenheit von Orf2 ändert den Phänotyp, d.h. daß entweder die DNA-Bindung von Orf2 allein oder zusammen mit einem weiteren Bindungspartner zu einer erhöhten Lyse führt.

E.3.6. CI

Wie für Orf2 wurden auch für die Bestimmung der CI Funktion sowohl ein Überexpressionsplasmid als auch eine chromosomale Deletionsmutante hergestellt. Dabei stellte sich heraus, daß CI bei Überexpression in einem K139-lysogenen Stamm die Zahl der durch spontane Lyse freigesetzten Phagen erhöht, und zwar von $1.8 \cdot 10^6$ pfu/ml beim Kontrollstamm auf $9.1 \cdot 10^6$ pfu/ml ohne Induktion mit IPTG und sogar auf $2.8 \cdot 10^8$ pfu/ml mit IPTG-Induktion (Abb. D.23). Dies entspricht einer Induktion der Lyse, was der vermuteten Funktion als lytischer Repressor widersprechen würde. Entsprechend würde man bei einer Deletion von *cI* in diesem Fall einen Rückgang des Spontantiters erwarten. Doch bleibt der Wert mehr oder weniger auf gleichem Niveau, bei Komplementation sinkt er dagegen auf ca. 60% des Kontrollstammes ab (Abb. D.25). Die Plaques werden durch die Deletion von *cI* klar, was darauf hindeutet, daß die Lysogenisierungsrate deutlich abnimmt. Denn bei einem Rückgang der pfu/ml sollte eigentlich eher eine Trübung erwartet werden. Letzteres spricht wiederum für eine Funktion in der Etablierung des lysogenen Zustandes. Auch konnte die Deletion von *cI* nur bei gleichzeitiger Expression von *cI* durchgeführt werden, da ohne plasmidkodierte CI alle untersuchten Klone den Phagen verloren hatten. Dies ist ein Indiz dafür, daß die Zellen unter einem hohen evolutiven Druck stehen könnten. Da für die Bestimmung des Phänotyps der Deletionsmutante die Zellen ohne Kanamycin angezogen wurden, ging das Überexpressionsplasmid wieder verloren. Möglicherweise konnten dann nur solche Zellen überleben, die eine *cI*-Suppressor Mutation, z.B. in der Promotor/Operator-Region, aufweisen. Dies könnte erklären, warum der Phagentiter der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert ist. Auch der Rückgang der Plaquezahl eines infizierenden Phagen bei Anwesenheit von CI spricht für eine Repressor-Funktion (siehe Abb. D.24). Doch bleibt der Widerspruch zur Beobachtung, daß die Zahl der Plaques des Wildtyp-Phagen bei Überexpression so stark zunimmt und sich bei Deletion kaum verändert.

Man könnte sich vorstellen, daß durch die Überexpression ein artifizieller Zustand herbeigeführt wird. Normalerweise wird in einer lysogenen Zelle nur eine relativ geringe Anzahl an Repressoren benötigt, um den lysogenen Zustand aufrechtzuerhalten. Eine Überexpression führt dagegen zu einem großen Überschuß an Protein. Zudem konnte für den homologen CI Repressor von K139 gezeigt werden, daß er in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration in Lösung bis zum Oktamer oligomerisieren kann (135). Der Grad der Oligomerisation bestimmt aber auch die Fähigkeit zur Bindung an die Operator-Regionen. In der Lösung dominieren Repressor-Dimere, was bedeuten könnte, daß diese Form bevorzugt an DNA bindet. Möglicherweise liegen die CI Repressoren von K139 bei Überexpression in einer höheren Oligomerisations-Stufe vor, als für die Bindung an die Operator-Struktur benötigt wird. Trotz vorhandener Repressoren könnte somit die weitere Aufrechterhaltung des lysogenen Zustandes unterbunden werden. Doch warum erhöht sich dann nicht auch der Titer bei Überexpression in der *cI*-Deletionsmutante? Auch hier könnte man sich eine veränderte DNA-Topologie vorstellen, die in diesem Fall zu einer Verbesserung der Bindungsfähigkeit von CI an den Operator und damit zu einer stärkeren Unterdrückung der Lyse führt. Zur Klärung der genauen Funktion von CI sind deshalb noch weitere Experimente notwendig, wie beispielsweise die Überprüfung der Wirkung auf verschiedene Promotoren im Promotor-Test Vektor.

E.3.7. Identifizierung von Regulatoren mit dem Promotor-Test System

Die direkte Messung der Aktivitätsänderung von Promotoren durch den Einfluß verschiedener Regulatoren kann in einem Promotor-Test Vektor erfolgen. Hierzu wurden vier putative Promotor-Regionen von K139 ($P_{R/L}$, $P_{11/12}$, P_{13} , $P_{16/17}$) zwischen die promotorlosen *lacZ* und *phoA* Gene eingesetzt, so daß diese Gene von den neu eingebrachten Promotoren aus transkribiert werden können. Die putativen Regulatoren (*cI*, *orf2*, *8*, *11*, *12*, *13*) wurden anschließend in den pTrc-Expressionsvektor kloniert und mit in die Zellen transformiert. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde durch Einwirkung von Orf11 auf den P_{11} Promotor erhöht. Orf11 wurde in Kap. D.1.3.1. als mögliches DNA-bindendes Protein vorgestellt, da es ein HTH-Motiv enthält. Nun konnte gezeigt werden, daß es zumindest seine eigene Expression vom P_{11} Promotor aus positiv beeinflusst. Ein Einfluß auf andere Promotoren konnte dagegen nicht beobachtet werden, so daß es sich um keinen generellen Regulator zu handeln scheint. Wie durch die Homologie-Vergleiche schon angedeutet wurde, handelt es sich bei Orf13 dagegen um einen Aktivator der späten Gene. Zumindest eine Aktivitätserhöhung des P_{17} Promotors konnte nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Aktivität des P_{16} Promotors durch Orf13 konnte auf Agarplatten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), doch müssen die Phosphatase-Messungen in der Flüssigkultur noch optimiert werden, um eine quantitative Aktivitätsbestimmung zu ermöglichen. Auch ein möglicher Einfluß der Methyltransferase Orf8 auf die Aktivität von P_{12} konnte zumindest auf der Agarplatte

beobachtet werden. Doch auch hier fehlt noch die quantitative Bestimmung im *phoA*-Flüssigttest.

Kein Einfluß konnte dagegen für Orf2, CI und Orf12 gemessen werden. Zum einen liegt das wohl mit an der geringen Grundaktivität der Promotoren. Um beispielsweise eine Repression zu beobachten, müßte eine meßbare Grundaktivität vorhanden sein, die sich von der der Negativkontrolle unterscheidet. Da allgemein eine schlechte Aktivität der Reportergene beobachtet wurde, könnte dies auch mit an der Vektorkonstruktion liegen. Eine Überprüfung der Genaktivität durch Klonierung eines starken Promotors in die MCS könnte dies klären. Eventuell müßte dann noch einmal in ein anderes Promotor-Test System umklontiert werden.

F. Literaturverzeichnis

1. **Ackermann, H. W.** 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol.* **146**:843-57.
2. **Ackermann, H. W., S. S. Kasatiya, T. Kawata, T. Koga, J. V. Lee, A. Mbiguino, F. S. Newman, J. F. Vieu, and A. Zachary.** 1984. Classification of *Vibrio* bacteriophages. *Intervirology.* **22**:61-71.
3. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-402.
4. **Angelichio, M. J., J. Spector, M. K. Waldor, and A. Camilli.** 1999. *Vibrio cholerae* intestinal population dynamics in the suckling mouse model of infection. *Infect. Immun.* **67**:3733-9.
5. **Atlung, T., A. Nielsen, L. J. Rasmussen, L. J. Nellemann, and F. Holm.** 1991. A versatile method for integration of genes and gene fusions into the lambda attachment site of *Escherichia coli*. *Gene.* **107**:11-7.
6. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidenau, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1987. *Current protocols in molecular biology.* John Wiley and Sons, New York.
7. **Basu, R., A. N. Ghosh, S. Dasgupta, and A. Ghosh.** 1993. Biophysical characterization of *Vibrio* El Tor typing phage e5. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**:9-15.
8. **Beaber, J. W., B. Hochhut, and M. K. Waldor.** 2002. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **184**:4259-69.
9. **Bertani, E. L., and E. W. Six.** 1988. The P2-like phages and their parasite, P4, p. 73-143. *In* R. Calendar (ed.), *The Bacteriophages*, vol. 2. Plenum Press, New York.
10. **Bik, E. M., A. E. Bunschoten, R. D. Gouw, and F. R. Mooi.** 1995. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J.* **14**:209-16.
11. **Bik, E. M., R. D. Gouw, and F. R. Mooi.** 1996. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1453-61.
12. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-23.
13. **Bjellqvist, B., C. Pasquali, F. Ravier, J. C. Sanchez, and D. Hochstrasser.** 1993. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis.* **14**:1357-65.
14. **Black, L. W.** 1989. DNA packaging in dsDNA bacteriophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**:267-92.
15. **Bockemuhl, J., K. Roch, B. Wohlers, V. Aleksic, S. Aleksic, and R. Wokatsch.** 1986. Seasonal distribution of facultatively enteropathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*) in the freshwater of the Elbe River at Hamburg. *J. Appl. Bacteriol.* **60**:435-42.
16. **Bockemuhl, J., and A. Triemer.** 1974. Ecology and epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* on the coast of Togo. *Bull. WHO.* **51**:353-60.
17. **Boyd, E. F., A. J. Heilpern, and M. K. Waldor.** 2000. Molecular analyses of a putative CTXphi precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTXphis by toxigenic *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **182**:5530-8.

18. **Boyd, E. F., and M. K. Waldor.** 1999. Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTXPhi by bacteriophage CP-T1. *Infect. Immun.* **67**:5898-905.
19. **Brumby, A. M., I. Lamont, I. B. Dodd, and J. B. Egan.** 1996. Defining the SOS operon of coliphage 186. *Virology.* **219**:105-14.
20. **Brussow, H., and R. W. Hendrix.** 2002. Phage genomics: small is beautiful. *Cell.* **108**:13-6.
21. **Calendar, R., S. Yu, H. Myung, V. Barreiro, R. Odegrip, K. Carlson, L. Davenport, G. Mosig, G. E. Christie, and E. Haggard-Ljungquist.** 1998. The lysogenic conversion genes of coliphage P2 have unusually high AT content, p. 241-252. *In* M. Syvanen and C. Kado (ed.), *Horizontal Gene Transfer*. Chapman and Hall, London.
22. **Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt.** 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**:2796-801.
23. **Campbell, A. M.** 1996. Bacteriophages, p. 2325-2338. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. L. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2 ed, vol. 2. ASM Press, Washington, D. C.
24. **Chakrabarti, A. K., A. N. Ghosh, G. B. Nair, S. K. Niyogi, S. K. Bhattacharya, and B. L. Sarkar.** 2000. Development and evaluation of a phage typing scheme for *Vibrio cholerae* O139. *J. Clin. Microbiol.* **38**:44-9.
25. **Chakrabarti, B. K., D. J. Chattopadhyay, and A. N. Ghosh.** 1993. *Vibrio* phage D10 contains non-permuted DNA with cohesive ends. *J. Gen. Virol.* **74**:2749-52.
26. **Chattoraj, D. K.** 1978. Strand-specific break near the origin of bacteriophage P2 DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:1685-9.
27. **Chattoraj, D. K., and R. B. Inman.** 1973. Origin and direction of replication of bacteriophage 186 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**:1768-71.
28. **Christie, G. E., E. Haggard-Ljungquist, R. Feiwell, and R. Calendar.** 1986. Regulation of bacteriophage P2 late-gene expression: the *ogr* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:3238-42.
29. **Clark, A. J., W. Inwood, T. Cloutier, and T. S. Dhillon.** 2001. Nucleotide sequence of coliphage HK620 and the evolution of lambdoid phages. *J. Mol. Biol.* **311**:657-79.
30. **Colwell, R. R.** 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science.* **274**:2025-31.
31. **Correa, N. E., C. M. Lauriano, R. McGee, and K. E. Klose.** 2000. Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization. *Mol. Microbiol.* **35**:743-55.
32. **Davis, B. M., K. E. Moyer, E. F. Boyd, and M. K. Waldor.** 2000. CTX prophages in classical biotype *Vibrio cholerae*: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. *J. Bacteriol.* **182**:6992-8.
33. **Diaz, E., E. Garcia, C. Ascaso, E. Mendez, R. Lopez, and J. L. Garcia.** 1989. Subcellular localization of the major pneumococcal autolysin: a peculiar mechanism of secretion in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**:1238-44.
34. **Diaz, E., M. Munthali, H. Lunsdorf, J. V. Holtje, and K. N. Timmis.** 1996. The two-step lysis system of pneumococcal bacteriophage EJ-1 is functional in gram-negative bacteria: triggering of the major pneumococcal autolysin in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**:667-81.
35. **Dibbens, J. A., and J. B. Egan.** 1992. Control of gene expression in the temperate coliphage 186. IX. B is the sole phage function needed to activate transcription of the phage late genes. *Mol. Microbiol.* **6**:2629-42.

36. **Dibbens, J. A., S. L. Gregory, and J. B. Egan.** 1992. Control of gene expression in the temperate coliphage 186. X. The CI repressor directly represses transcription of the late control gene *B*. *Mol. Microbiol.* **6**:2643-50.
37. **Dodd, I. B., and J. B. Egan.** 1996. DNA binding by the coliphage 186 repressor protein CI. *J. Biol. Chem.* **271**:11532-40.
38. **Dodd, I. B., and J. B. Egan.** 1990. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**:5019-26.
39. **Dodd, I. B., B. Kalionis, and J. B. Egan.** 1990. Control of gene expression in the temperate coliphage 186. VIII. Control of lysis and lysogeny by a transcriptional switch involving face-to-face promoters. *J. Mol. Biol.* **214**:27-37.
40. **Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper.** 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* **59**:4310-7.
41. **Egan, J. B., and I. B. Dodd.** 1994. P2, P4 And Related Bacteriophages, p. 1003-1009. *In* R. G. Webster and A. Granoff (eds.), *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, London.
42. **Espósito, D., W. P. Fitzmaurice, R. C. Benjamin, S. D. Goodman, A. S. Waldman, and J. J. Socca.** 1996. The complete nucleotide sequence of bacteriophage HP1 DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**:2360-8.
43. **Espósito, D., J. C. Wilson, and J. J. Socca.** 1997. Reciprocal regulation of the early promoter region of bacteriophage HP1 by the Cox and CI proteins. *Virology.* **234**:267-76.
44. **Faruque, S. M., K. M. Ahmed, A. R. Abdul Alim, F. Qadri, A. K. Siddique, and M. J. Albert.** 1997. Emergence of a new clone of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor displacing *V. cholerae* O139 Bengal in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* **35**:624-30.
45. **Faruque, S. M., M. J. Albert, and J. J. Mekalanos.** 1998. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1301-14.
46. **Faruque, S. M., Asadulghani, M. Kamruzzaman, R. K. Nandi, A. N. Ghosh, G. B. Nair, J. J. Mekalanos, and D. A. Sack.** 2002. RS1 element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTXphi. *Infect. Immun.* **70**:163-70.
47. **Fitzmaurice, W. P., A. S. Waldman, R. C. Benjamin, P. C. Huang, and J. J. Socca.** 1984. Nucleotide sequence and properties of the cohesive DNA termini from bacteriophage HP1c1 of *Haemophilus influenzae* Rd. *Gene.* **31**:197-203.
48. **Fujisawa, H., and M. Morita.** 1997. Phage DNA packaging. *Genes Cells.* **2**:537-45.
49. **Funnell, B. E., and R. B. Inman.** 1983. Bacteriophage P2 DNA replication. Characterization of the requirement of the gene *B* protein *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **167**:311-34.
50. **Gerdes, J. C., and W. R. Romig.** 1975. Complete and Defective Bacteriophages of Classical *Vibrio cholerae*: Relationship to the Kappa Type Bacteriophage. *J. Virol.* **15**:1231-1238.
51. **Goldberg, S., and J. R. Murphy.** 1983. Molecular epidemiological studies of United States Gulf Coast *Vibrio cholerae* strains: integration site of mutator vibriophage VcA-3. *Infect. Immun.* **42**:224-30.
52. **Grimberg, J., S. Maguire, and L. Belluscio.** 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:8893.
53. **Grundling, A., M. D. Manson, and R. Young.** 2001. Holins kill without warning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:9348-52.
54. **Grunenfelder, B., G. Rummel, J. Vohradsky, D. Roder, H. Langen, and U. Jenal.** 2001. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:4681-6.

55. **Guidolin, A., and P. A. Manning.** 1985. Bacteriophage CP-T1 of *Vibrio cholerae*. Identification of the cell surface receptor. *Eur. J. Biochem.* **153**:89-94.
56. **Guidolin, A., G. Morelli, M. Kamke, and P. A. Manning.** 1984. *Vibrio cholerae* bacteriophage CP-T1: characterization of bacteriophage DNA and restriction analysis. *J. Virol.* **51**:163-9.
57. **Haggard-Ljungquist, E., C. Halling, and R. Calendar.** 1992. DNA sequences of the tail fiber genes of bacteriophage P2: evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages. *J. Bacteriol.* **174**:1462-77.
58. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-80.
59. **Hava, D. L., and A. Camilli.** 2001. Isolation and characterization of a temperature-sensitive generalized transducing bacteriophage for *Vibrio cholerae*. *J. Microbiol. Methods.* **46**:217-25.
60. **Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, e. K. Hickey, J. D. Peterson, U. L., S. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, d. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishman, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* **406**:477-483.
61. **Hendrix, R. W., J. G. Lawrence, G. F. Hatfull, and S. Casjens.** 2000. The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends Microbiol.* **8**:504-8.
62. **Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford, and G. F. Hatfull.** 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:2192-7.
63. **Henrich, B., B. Binishofer, and U. Blasi.** 1995. Primary structure and functional analysis of the lysis genes of *Lactobacillus gasseri* bacteriophage phi adh. *J. Bacteriol.* **177**:723-32.
64. **Honma, Y., M. Ikema, C. Toma, M. Ehara, and M. Iwanaga.** 1997. Molecular analysis of a filamentous phage (fsl) of *Vibrio cholerae* O139. *Biochim. Biophys. Acta.* **1362**:109-15.
65. **Hovde, C. J., S. B. Calderwood, J. J. Mekalanos, and R. J. Collier.** 1988. Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:2568-72.
66. **Ikema, M., and Y. Honma.** 1998. A novel filamentous phage, fs-2, of *Vibrio cholerae* O139. *Microbiology.* **144**:1901-6.
67. **Ilyina, T. V., and E. V. Koonin.** 1992. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**:3279-85.
68. **Julio, S. M., D. M. Heithoff, D. Provenzano, K. E. Klose, R. L. Sinsheimer, D. A. Low, and M. J. Mahan.** 2001. DNA adenine methylase is essential for viability and plays a role in the pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **69**:7610-5.
69. **Kaper, J. B., A. Fasano, and M. Trucksis.** 1994. Toxins of *Vibrio cholerae*, p. 145-176. *In* I. K. Wachsmuth, P. A. Blake, and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspective. ASM, Washington, D.C.
70. **Kaper, J. B., J. G. Morris, Jr., and M. M. Levine.** 1995. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:48-86.
71. **Kar, S., R. K. Ghosh, A. N. Ghosh, and A. Ghosh.** 1996. Integration of the DNA of a novel filamentous bacteriophage VSK from *Vibrio cholerae* 0139 into the host chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:17-22.

72. **Karaolis, D. K., J. A. Johnson, C. C. Bailey, E. C. Boedeker, J. B. Kaper, and P. R. Reeves.** 1998. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:3134-9.
73. **Karaolis, D. K., R. Lan, and P. R. Reeves.** 1994. Molecular evolution of the seventh-pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other pandemic and epidemic *V. cholerae* isolates. *J. Bacteriol.* **176**:6199-206.
74. **Karaolis, D. K., R. Lan, and P. R. Reeves.** 1995. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxicogenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **177**:3191-8.
75. **Karaolis, D. K., and J. B. Kaper.** 1999. Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements of *Vibrio cholerae*, p. 167-187. *In* J. B. Kaper and J. Hacker (eds.), *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. ASM, Washington D.C.
76. **Kay, B. A., C. A. Bopp, and J. G. Wells.** 1994. Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* O1 from Fecal Specimens, p. 3-25. *In* I. K. Wachsmuth, P. A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspective. ASM, Washington, D.C.
77. **Kliem, M., and B. Dreiseikelmann.** 1989. The superimmunity gene *sim* of bacteriophage P1 causes superinfection exclusion. *Virology.* **171**:350-5.
78. **Koonin, E. V., and T. V. Ilyina.** 1993. Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *Biosystems.* **30**:241-68.
79. **Kosykh, V. G., S. L. Schlagman, and S. Hattman.** 1995. Phage T4 DNA [*N*6-adenine]methyltransferase. Overexpression, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **270**:14389-93.
80. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.
81. **Lamont, I., H. Richardson, D. R. Carter, and J. B. Egan.** 1993. Genes for the establishment and maintenance of lysogeny by the temperate coliphage 186. *J. Bacteriol.* **175**:5286-8.
82. **Lazar, S., and M. K. Waldor.** 1998. ToxR-independent expression of cholera toxin from the replicative form of CTXphi. *Infect. Immun.* **66**:394-7.
83. **Lee, S. H., S. M. Butler, and A. Camilli.** 2001. Selection for *in vivo* regulators of bacterial virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:6889-94.
84. **Lengyel, J. A., R. N. Goldstein, M. Marsh, M. G. Sunshine, and R. Calendar.** 1973. Bacteriophage P2 head morphogenesis: cleavage of the major capsid protein. *Virology.* **53**:1-23.
85. **Lin, W., K. J. Fullner, R. Clayton, J. A. Sexton, M. B. Rogers, K. E. Calia, S. B. Calderwood, C. Fraser, and J. J. Mekalanos.** 1999. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:1071-6.
86. **Linderoth, N. A., B. Julien, K. E. Flick, R. Calendar, and G. E. Christie.** 1994. Molecular cloning and characterization of bacteriophage P2 genes R and S involved in tail completion. *Virology.* **200**:347-59.
87. **Linderoth, N. A., R. Ziermann, E. Haggard-Ljungquist, G. E. Christie, and R. Calendar.** 1991. Nucleotide sequence of the DNA packaging and capsid synthesis genes of bacteriophage P2. *Nucleic Acids Res.* **19**:7207-14.
88. **Liu, Y., and E. Haggard-Ljungquist.** 1994. Studies of bacteriophage P2 DNA replication: localization of the cleavage site of the A protein. *Nucleic Acids Res.* **22**:5204-10.

89. **Liu, Y., S. Saha, and E. Haggard-Ljungquist.** 1993. Studies of bacteriophage P2 DNA replication. The DNA sequence of the cis-acting gene *A* and *ori* region and construction of a P2 mini-chromosome. *J. Mol. Biol.* **231**:361-74.
90. **Loessner, M. J., S. K. Maier, H. Daubek-Puza, G. Wendlinger, and S. Scherer.** 1997. Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J. Bacteriol.* **179**:2845-51.
91. **Lu, M. J., and U. Henning.** 1989. The immunity (*imm*) gene of *Escherichia coli* bacteriophage T4. *J. Virol.* **63**:3472-8.
92. **Lucchini, S., F. Desiere, and H. Brussow.** 1999. Similarly organized lysogeny modules in temperate *Siphoviridae* from low GC content gram-positive bacteria. *Virology.* **263**:427-35.
93. **Malone, T., R. M. Blumenthal, and X. Cheng.** 1995. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *J. Mol. Biol.* **253**:618-32.
94. **Maniloff, J., and H. W. Ackermann.** 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order *Caudovirales*. *Arch. Virol.* **143**:2051-63.
95. **Manning, P. A., U. H. Stroehrer, and R. Morona.** 1994. Molecular Basis for O-Antigen Biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Ogawa-Inaba Switching, p. 77-94. In I. K. Wachsmuth, P. A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives. ASM, Washington D.C.
96. **Manoil, C., N. Sinha, and B. Alberts.** 1977. Intracellular DNA-protein complexes from bacteriophage T4-infected cells isolated by a rapid two-step procedure. Characterization and identification of the protein components. *J. Biol. Chem.* **252**:2734-41.
97. **McClelland, M., M. Nelson, and E. Raschke.** 1994. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **22**:3640-59.
98. **Mekalanos, J. J.** 1983. Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. *Cell.* **35**:253-63.
99. **Merrell, D. S., S. M. Butler, F. Qadri, N. A. Dolganov, A. Alam, M. B. Cohen, S. B. Calderwood, G. K. Schoolnik, and A. Camilli.** 2002. Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature.* **417**:642-5.
100. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575-83.
101. **Mooi, F. R., and E. M. Bik.** 1997. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. *Trends Microbiol.* **5**:161-5.
102. **Moyer, K. E., H. H. Kimsey, and M. K. Waldor.** 2001. Evidence for a rolling-circle mechanism of phage DNA synthesis from both replicative and integrated forms of CTXphi. *Mol. Microbiol.* **41**:311-23.
103. **Mulligan, M. E., D. K. Hawley, R. Entriken, and W. R. McClure.** 1984. *E. coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA-polymerase selectivity. *Nucleic Acid Res.* **12**:789-800.
104. **Myung, H., and R. Calendar.** 1995. The Old exonuclease of bacteriophage P2. *J. Bacteriol.* **177**:497-501.
105. **Nakayama, K., S. Kanaya, M. Ohnishi, Y. Terawaki, and T. Hayashi.** 1999. The complete nucleotide sequence of phi CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **31**:399-419.
106. **Nandi, B., R. K. Nandy, A. C. Vicente, and A. C. Ghose.** 2000. Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (TcpA) in a toxigenic non-O1/Non-O139 strain of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **68**:948-52.

107. **Nesper, J., J. Blass, M. Fountoulakis, and J. Reidl.** 1999. Characterization of the major control region of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139: immunity, exclusion, and integration. *J. Bacteriol.* **181**:2902-13.
108. **Nesper, J., D. Kapfhammer, K. E. Klose, H. Merkert, and J. Reidl.** 2000. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 antigen as the bacteriophage K139 receptor and identification of *IS1004* insertions aborting O1 antigen biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**:5097-104.
109. **Nesper, J., A. Kraiss, S. Schild, J. Blabeta, K. E. Klose, J. Bockemuhl, and J. Reidl.** 2002. Comparative and genetic analyses of the putative *Vibrio cholerae* lipopolysaccharide core oligosaccharide biosynthesis (*wav*) gene cluster. *Infect. Immun.* **70**:2419-33.
110. **Nesper, J., C. M. Lauriano, K. E. Klose, D. Kapfhammer, A. Kraiss, and J. Reidl.** 2001. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**:435-45.
111. **Neufing, P. J., K. E. Shearwin, J. Camerotto, and J. B. Egan.** 1996. The CII protein of bacteriophage 186 establishes lysogeny by activating a promoter upstream of the lysogenic promoter. *Mol. Microbiol.* **21**:751-61.
112. **Neve, H., K. I. Zenz, F. Desiere, A. Koch, K. J. Heller, and H. Brussow.** 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**:61-72.
113. **Nilsson, A. S., and E. Haggard-Ljungquist.** 2001. Detection of homologous recombination among bacteriophage P2 relatives. *Mol. Phylogenet. Evol.* **21**:259-69.
114. **Odegrip, R., and E. Haggard-Ljungquist.** 2001. The two active-site tyrosine residues of the A protein play non-equivalent roles during initiation of rolling circle replication of bacteriophage P2. *J. Mol. Biol.* **308**:147-63.
115. **Odegrip, R., S. Schoen, E. Haggard-Ljungquist, K. Park, and D. K. Chatteraj.** 2000. The interaction of bacteriophage P2 B protein with *Escherichia coli* DnaB helicase. *J. Virol.* **74**:4057-63.
116. **Pajni, S., N. R. Chowdhury, A. Ghosh, S. Kar, and R. K. Ghosh.** 1995. Characterization of phage phi O139, a *Vibrio cholerae* O139 temperate bacteriophage with cohesive DNA termini. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:69-74.
117. **Pearson, W. R., and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:2444-8.
118. **Piekarowicz, A., and J. Bujnicki.** 1999. Cloning of the *dam* methyltransferase gene from *Haemophilus influenzae* bacteriophage HP1. *Acta Microbiol. Pol.* **48**:123-9.
119. **Portelli, R., I. B. Dodd, Q. Xue, and J. B. Egan.** 1998. The late-expressed region of the temperate coliphage 186 genome. *Virology.* **248**:117-30.
120. **Pountney, D. L., R. P. Tiwari, and J. B. Egan.** 1997. Metal- and DNA-binding properties and mutational analysis of the transcription activating factor, B, of coliphage 186: a prokaryotic C4 zinc-finger protein. *Protein Sci.* **6**:892-902.
121. **Reed, M. R., K. E. Shearwin, L. M. Pell, and J. B. Egan.** 1997. The dual role of Apl in prophage induction of coliphage 186. *Mol. Microbiol.* **23**:669-81.
122. **Reidl, J., and K. E. Klose.** 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:125-39.
123. **Reidl, J., and J. J. Mekalanos.** 1995. Characterization of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139 and use of a novel mini-transposon to identify a phage-encoded virulence factor. *Mol. Microbiol.* **18**:685-701.
124. **Rose, R. E.** 1988. The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res.* **16**:356.

125. **Rose, R. E.** 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* **16**:355.
126. **Rowe, B., and J. A. Frost.** 1992. *Vibrio* phages and phage-typing, p. 95-105. In D. Barua and W. B. Greenough (eds.), *Cholera*. Plenum Medical Book Company, New York.
127. **Rubin, E. J., W. Lin, J. J. Mekalanos, and M. K. Waldor.** 1998. Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol. Microbiol.* **28**:1247-54.
128. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 ed. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
129. **Sandmeier, H.** 1994. Acquisition and rearrangement of sequence motifs in the evolution of bacteriophage tail fibres. *Mol. Microbiol.* **12**:343-50.
130. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-7.
131. **Schnos, M., and R. B. Inman.** 1971. Starting point and direction of replication in P2 DNA. *J. Mol. Biol.* **55**:31-8.
132. **Sengupta, A., P. Ray, and J. Das.** 1985. Characterization and physical map of cholera phage phi 149 DNA. *Virology.* **140**:217-29.
133. **Shearwin, K. E., A. M. Brumby, and J. B. Egan.** 1998. The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. *J. Biol. Chem.* **273**:5708-15.
134. **Shearwin, K. E., and J. B. Egan.** 2000. Establishment of lysogeny in bacteriophage 186. DNA binding and transcriptional activation by the CII protein. *J. Biol. Chem.* **275**:29113-22.
135. **Shearwin, K. E., and J. B. Egan.** 1996. Purification and self-association equilibria of the lysis-lysogeny switch proteins of coliphage 186. *J. Biol. Chem.* **271**:11525-31.
136. **Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist.** 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
137. **Sivaprasad, A. V., R. Jarvinen, A. Puspurs, and J. B. Egan.** 1990. DNA replication studies with coliphage 186. III. A single phage gene is required for phage 186 replication. *J. Mol. Biol.* **213**:449-63.
138. **Skerra, A.** 1994. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene.* **151**:131-5.
139. **Skowronek, K., and S. Baranowski.** 1997. The relationship between HP1 and S2 bacteriophages of *Haemophilus influenzae*. *Gene.* **196**:139-44.
140. **Skowronek, K., and A. Piekarowicz.** 1996. Determination of the *cos* sequence of the mature genome of S2/HP1 type B bacteriophage of *Haemophilus influenzae*. *Gene.* **172**:71-3.
141. **Slauch, J. M., M. J. Mahan, P. Michetti, M. R. Neutra, and J. J. Mekalanos.** 1995. Acetylation (O-factor 5) affects the structural and immunological properties of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen. *Infect. Immun.* **63**:437-41.
142. **Sonnhammer, E. L., G. von Heijne, and A. Krogh.** 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **6**:175-82.
143. **Sternberg, N., and J. Coulby.** 1990. Cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (*pac*) is regulated by adenine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:8070-4.
144. **Stormo, G. D., T. D. Schneider, and L. M. Gold.** 1982. Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **10**:2971-96.

145. **Stroecher, U. H., L. E. Karageorgos, R. Morona, and P. A. Manning.** 1992. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**:2566-70.
146. **Susskind, M. M., and D. Botstein.** 1978. Molecular genetics of bacteriophage P22. Microbiol. Rev. **42**:385-413.
147. **Tatusova, T. A., and T. L. Madden.** 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett. **174**:247-50.
148. **Tinoco, I., Jr., P. N. Borer, B. Dengler, M. D. Levin, O. C. Uhlenbeck, D. M. Crothers, and J. Bralla.** 1973. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nat. New. Biol. **246**:40-1.
149. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**:4350-4.
150. **Tsai, C. M., and C. E. Frasch.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **119**:115-9.
151. **Vostrov, A. A., O. A. Vostrukhina, A. N. Svarchevsky, and V. N. Rybchin.** 1996. Proteins responsible for lysogenic conversion caused by coliphages N15 and phi80 are highly homologous. J. Bacteriol. **178**:1484-6.
152. **Waldor, K. W., and J. J. Mekalanos.** 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. **272**:1910-1914.
153. **Waldor, M. K., and J. J. Mekalanos.** 1994. ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. Infect. Immun. **62**:72-8.
154. **Walia, K., S. Ghosh, H. Singh, G. B. Nair, A. Ghosh, G. Sahni, H. Vohra, and N. K. Ganguly.** 1999. Purification and characterization of novel toxin produced by *Vibrio cholerae* O1. Infect. Immun. **67**:5215-22.
155. **Wang, I. N., D. L. Smith, and R. Young.** 2000. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. Annu. Rev. Microbiol. **54**:799-825.
156. **Wood, L. F., N. Y. Tszine, and G. E. Christie.** 1997. Activation of P2 late transcription by P2 Ogr protein requires a discrete contact site on the C terminus of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J. Mol. Biol. **274**:1-7.
157. **Yamamoto, K., Y. Takeda, T. Miwatani, and J. P. Craig.** 1983. Purification and some properties of a non-O1 *Vibrio cholerae* enterotoxin that is identical to cholera enterotoxin. Infect. Immun. **39**:1128-35.
158. **Young, I., I. Wang, and W. D. Roof.** 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. Trends Microbiol. **8**:120-8.
159. **Ziermann, R., B. Bartlett, R. Calendar, and G. E. Christie.** 1994. Functions involved in bacteriophage P2-induced host cell lysis and identification of a new tail gene. J. Bacteriol. **176**:4974-84.

G. Anhang

G.1. Abkürzungsverzeichnis

2D SDS-PAGE	zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ap ^r /Ap ^s	Ampicillin-resistent/-sensitiv
AS	Aminosäure
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
Cm ^r /Cm ^s	Chloramphenicol-resistent/-sensitiv
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Acetat
EM	Elektronenmikroskop
kb	Kilobasenpaare
Km ^r /Km ^s	Kanamycin-resistent/-sensitiv
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	"Matrix-Assisted-Laser-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry"
Mbp	Megabasenpaare
MCS	"Multiple Cloning Site"
Min.	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
OD ₅₀₀ /OD ₅₇₈	Optische Dichte bei 500/578 nm Wellenlänge
ORF	"Open Reading Frame"
Orfx	Genprodukt des putativen Gens x
<i>orfx</i>	putatives Gen x
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
pfu	"Plaque-forming Units"
RBS	Ribosomen Bindungsstelle
RF	Replikative Form
rpm	"Rounds Per Minute"
RT	Raumtemperatur
SD	Shine-Dalgarno
SDS	"Sodium Dodecyl Sulfate"
Sek.	Sekunde
Sm ^r /Sm ^s	Streptomycin-resistent/-sensitiv
ss	einzelsträngig
Std.	Stunde
TB	"Tryptone Broth"
T _M	"Melting Temperature"
TRIS	Trishydroxylmethylaminomethan
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur

36	28913	29434	20.3	4.5	6	Schwanzfaser- "Assembly"	z55f <i>V. cholerae</i> Gp29 HK97	AJ231114 AAF31112.1	69% 26%	9e-12 0.02		
37	29440	30330	31.9	7.1	6		Orf33 HP1 Orf33 HP2	P51737 AAK37817	26% 27%	1e-10 3e-10		
38	30321	30791	17.5	8.8	7		Orf34 HP2 Orf34 HP1	AAK37818 P51738	34% 34%	1e-21 1e-21	54%	6e-9 1e-9
39	30791	32419	60.3	5.5	0		Orf35 HP2 Orf35 HP1	AAK37819 P51739	33% 33%	1e-91 2e-90	58%	1e-23 1e-21
					(GTG)						54%	

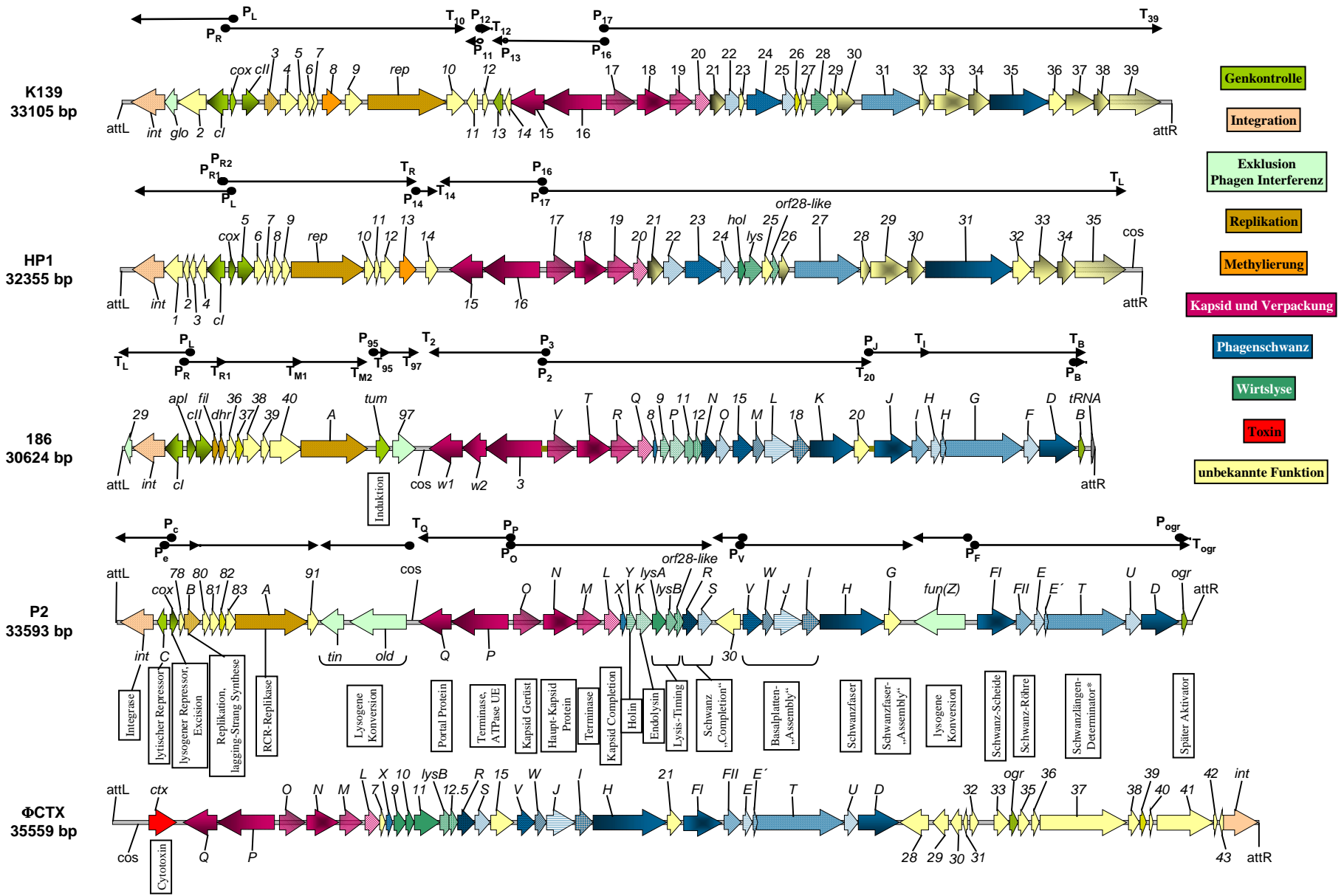
Tab. G.1: Eigenschaften der ORFs des K139 Genoms, Identitäten der BlastX und FastA Datenbanksuche und Ergebnisse der Motivsuche. * RBS Regeln nach Stormo (144); + identifizierte ORFs bei der MALDI-TOF Analyse; SP = Signalpeptid; TMH = Transmembran-Helix; # Der e-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, nach der eine Zufallssequenz derselben Länge wie die in der Datenbank gefundene die gleiche Identität zur Ausgangssequenz aufweist.

ORF	MW (kDa)	pI	RBS*	Funktion	Sequenz	Accession-Nr.	Identität BlastX	e-Wert	Identität FastA	e-Wert	Motiv
O395: Orf10	20.1	7.8	7	Regulator	Orf10 K139 MW0374 <i>S. aureus</i> Alr1266 <i>Nostoc</i> spec. FN0677 <i>Fusobacterium</i> nucl.	BAB94239 BAB73223 AAL94873	100% 35% 30% 21%	e-101 4e-6 7e-4 7e-4	100%	2e-134	HTH Zn-Finger
Orf11	12.6	8.0	6		Orf11 K139		98%	8e-55	97%	2e-82	
Orf12	8.8	5.0	7		Orf12 K139		97%	3e-37	99%	2e-61	
Orf13	9.2	8.8	4		Orf13 K139		98%	1e-43	98%	1e-65	
Orf14a	18.5	9.0	7 (TTG)		RSc0964 <i>R. solanacearum</i>	CAD14666	35%	7e-5	54%	1e-4	
					Orf34 ΦCTX	BAA36262	28%	0.001			
					yhaV <i>E. coli</i>	P42901	45%	1e-23			
Orf14b	7.3	5.8	5		Slr0725 <i>Synechocystis</i> spec.	BAA16672	36%	6e-17			
Orf35	67	5.3	3		Schwanzfaser Protein	Orf35 K139		77%	0	91%	
Orf36	20	4.5	6	Schwanzfaser "Assembly"	Orf31 HP1	P51735	32%	2e-33	72%	2e-11	
					Orf31 HP2	AAK37815	31%	2e-32			
					Atu1187 <i>A. tumefaciens</i> Orf36 K139	AAL42199	33% 89%	1e-9 1e-87			90%
Ch457: Orf12	7.9	4.5	7	Regulator	Orf12 K139		50%	4e-8	90%	3e-51	Zn-Finger
Orf13	9.3	8.5	4		Orf13 K139		92%	3e-41			
Orf14d	21.4	5.2	0.5		RSc0964 <i>R. solanacearum</i>	CAD14666	35%	7e-5			
					Orf34 ΦCTX	BAA36262	30%	3e-4			
					MM3036 <i>M. mazei</i>	NP_635060	29%	7e-13			
Orf14e	10.4	8.7	0.5	RSp1626 <i>R. solanacearum</i>	CAD18777	31%	2e-7			Pfam: Acetyltransf	
Orf35	66	5.7	3	Schwanzfaser Protein	Orf35 K139		74%	0	92%	3e-218	
Orf36	20	4.6	6	Schwanzfaser "Assembly"	Z55f <i>V. cholerae</i>	AJ231114	93%	2e-33	91%	1e-115	
					Orf31 HP1	P51735	33%	3e-34			
					Orf31 HP2	AAK37815	32%	1e-32			
					Atu1187 <i>A. tumefaciens</i> Orf36 K139	AAL42199	32% 89%	2e-14 7e-88			
E8498: Orf10a	28.2	9.1	5 (TTG)	Regulator	Orf12 K139		50%	2e-8	92%	5e-56	Zn-Finger
Orf12	8.0	4.7	7		Orf13 K139		93%	9e-42			
Orf13	9.3	8.2	4		RSc0964 <i>R. solanacearum</i>	CAD14666	35%	1e-4			
Orf14	8.0	5.0	6		Orf34 ΦCTX	BAA36262	28%	0.001			
					Orf14 K139		95%	4e-33			
Orf35			3	Schwanzfaser Protein	VCA0868 <i>V. cholerae</i> siehe Orf35 K139		55% 100%	8e-12			
Orf36	20	4.5	6	Schwanzfaser "Assembly"	siehe Orf36 K139						

Tab. G.2: Eigenschaften der ORFs der K139-verwandten Phagensequenzen, Identitäten der BlastX und FastA Datenbanksuche und Ergebnisse der Motivsuche. * RBS Regeln nach Stormo (144).

G.3. Genomorganisation der P2-Phagen

Siehe folgende Seite



G.4. Erklärungen

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, daß die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Juli 2002

Dagmar Kapfhammer

G.5. Publikationen

1. **Nesper, J., Kapfhammer, D., Klose, K. E., Merkert, H. and Reidl, J.** (2000). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 antigen as bacteriophage K139 receptor, and identification of IS1004 insertions aborting O1 antigen biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**:5097-5104.
2. **Nesper, J., Lauriano, C., Klose, K. E., Kapfhammer, D., Kraiß, A. and Reidl, J.** (2000). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**:435-445.
3. **Kapfhammer, D., Blaß, J., Evers, S., Reidl, J.** (2002). *Vibrio cholerae* Phage K139: complete phage genome sequence and comparative genomics of related phages. *J. Bacteriol.* In Überarbeitung.

G.6. Lebenslauf

Name:	Dagmar Kapfhammer	
Geburtsdatum:	20.05.1970	
Geburtsort:	Hammelburg, Kreis Bad Kissingen	
Wissenschaftliche Anstellung:	seit Okt. 1998	Universität Würzburg; Experimentelle Arbeiten zur Biologie des <i>V. cholerae</i> Phagen K139, über dieses Thema Dissertation am Zentrum für Infektionsforschung in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Joachim Reidl
Studium:	WS 1992 - SS 1998	Studium der Biologie an der Universität Würzburg; Diplomprüfung in den Fächern Tierökologie, Mikrobiologie und Biochemie; Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie bei Prof. Hacker in der Arbeitsgruppe von Dr. Bettina Brand; Thema: "Identifizierung und Charakterisierung von Motilitäts-assoziierten Genen in <i>Legionella pneumophila</i> "
	SS1992	Studium der Indologie an der Universität Würzburg
Berufstätigkeit:	Jan. - April 1992	Medizinisch-technische Assistentin im Labor von Dr. Hermann/Holzer in Würzburg
Berufsausbildung:	Nov. 1989 - Okt. 1991	Zweijährige Ausbildung an der Berufsfachschule für Medizinisch-technische Assistenten in Würzburg
Schulbildung:	1980-1989	Frobenius-Gymnasium Hammelburg; Abschluß: Abitur
	1976-1980	Grundschule Elfershausen-Langendorf